



**Universidad de Granada**  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

**UTILIZACIÓN DE  $\alpha$ -AMILASAS EN  
LA FORMULACIÓN DE  
DETERGENTES INDUSTRIALES**

Doctorando

**Juan Francisco Martínez Gallegos**

Directores de la Tesis

**Dr. Vicente Bravo Rodríguez**

**Dra. Antonia Reyes Requena**

**Dra. Encarnación Jurado Alameda**

Granada, Septiembre 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan Francisco Martínez Gallegos  
D.L.: Gr. 1242- 2005  
ISBN: 84-338-3533-5



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

18071 GRANADA

**UTILIZACIÓN DE  $\alpha$ -AMILASAS EN LA FORMULACIÓN  
DE DETERGENTES INDUSTRIALES**

Memoria que presenta el Ingeniero Químico **D. Juan Francisco Martínez Gallegos**  
para aspirar al Grado de Doctor en Ingeniería Química

Granada, Julio 2005

Fdo. Juan Francisco Martínez Gallegos

Los Directores de la Tesis:

**Dr. Vicente Bravo Rodríguez**

**Dra. Antonia Reyes Requena**

**Dra. Encarnación Jurado Alameda**

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral, "Utilización de  $\alpha$ -Amilasas en la Formulación de Detergentes Industriales", ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por el Ingeniero Químico D. Juan Francisco Martínez Gallegos bajo nuestra dirección.

Los resultados expuestos en esta Memoria corresponden fielmente a los obtenidos. La presente Memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada por el Ingeniero Químico D. Juan Francisco Martínez Gallegos para aspirar al Grado de Doctor en Ingeniería Química.

Fdo. Dr. Vicente Bravo Rodríguez

Fdo. Dra. Antonia Reyes Requena

Fdo. Dra. Encarnación Jurado Alameda





UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

18071 GRANADA

**UTILIZACIÓN DE  $\alpha$ -AMILASAS EN LA FORMULACIÓN  
DE DETERGENTES INDUSTRIALES**

Memoria que presenta el Ingeniero Químico **D. Juan Francisco Martínez Gallegos**  
para aspirar al Grado de Doctor en Ingeniería Química

Granada, Julio 2005

Fdo. Juan Francisco Martínez Gallegos

**Dra. Encarnación Jurado Alameda**, en calidad de Directora del Departamento de  
Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:**

Que la presente Tesis Doctoral, “Utilización de  $\alpha$ -Amilasas en la Formulación de  
Detergentes Industriales”, ha sido realizada en este Departamento por el Ingeniero  
Químico D. Juan Francisco Martínez Gallegos bajo la dirección del Dr. Vicente  
Bravo Rodríguez, de la Dra. Antonia Reyes Requena y de la Dra. Encarnación Jurado  
Alameda.

Granada, Julio 2005



Fdo. Encarnación Jurado Alameda



## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Vicente Bravo Rodríguez, a la Dra. Antonia Reyes Requena y a la Dra. Encarnación Jurado Alameda, por su dirección, dedicación e interés que han resultado imprescindibles para la realización de este trabajo.

A mis compañeros becarios del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, por su amistad, ayuda y apoyo ofrecidos durante este trabajo.

Al resto de miembros del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, por su disponibilidad y amabilidad en todo momento.

Y en especial a mis padres, a mi hermana, a mi querida novia Carol y a toda mi familia por su apoyo, cariño, comprensión y paciencia.



# **ÍNDICE**



<b>1 . OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2 . RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>3 . INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
3.1 . ALMIDÓN: PROPIEDADES, COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA.....	23
3.1.1 . <i>Amilosa</i> .....	25
3.1.2 . <i>Amilopectina</i> .....	26
3.1.3 . <i>Distribución de la amilosa y la amilopectina en el grano de almidón...</i>	28
3.2 . HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN .....	29
3.2.1 . <i>Enzimas específicas del enlace <math>\alpha(1-4)</math></i> .....	34
3.2.2 . <i>Enzimas específicas del enlace <math>\alpha(1-6)</math></i> .....	36
3.2.3 . <i>Enzimas específicas de los enlaces <math>\alpha(1-4)</math> y <math>\alpha(1-6)</math></i> .....	37
3.2.4 . <i>Métodos de medida de la actividad amilolítica</i> .....	37
3.2.4.1 . <i>Métodos Sacarogénicos</i> .....	38
3.2.4.2 . <i>Métodos Cromogénicos</i> .....	39
3.2.4.3 . <i>Métodos Amiloclásticos</i> .....	39
3.3 . ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DETERGENTES.....	40
3.4 . SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA DE LOS DETERGENTES .....	45
3.5 . FORMULACIONES DETERGENTES .....	50
3.5.1 . <i>Tensioactivos</i> .....	54
3.5.1.1 . <i>Tensioactivos aniónicos</i> .....	54
3.5.1.2 . <i>Tensioactivos catiónicos</i> .....	55
3.5.1.3 . <i>Tensioactivos no iónicos</i> .....	56
3.5.1.3.1 . <i>Alcoholes grasos etoxilados</i> .....	58

3.5.1.3.2 . Alquilpoliglucósidos .....	60
3.5.1.4 . Tensioactivos anfotéricos .....	66
3.5.2 . <i>Las enzimas en la industria de los detergentes</i> .....	66
3.5.2.1 . Enzimas para formulaciones detergentes .....	68
3.5.2.1.1 . Proteasas .....	69
3.5.2.1.2 . Amilasas .....	69
3.5.2.1.3 . Celulasas .....	70
3.5.2.1.4 . Lipasas .....	70
3.5.2.1.5 . Enzimas Redox .....	71
3.5.2.2 . Aplicaciones de los detergentes enzimáticos.....	71
3.5.2.2.1 . Detergentes para ropa .....	72
3.5.2.2.2 . Detergentes para la vajilla.....	72
3.5.2.2.3 . Detergentes para la industria alimentaria .....	73
3.5.2.3 . Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática.....	74
3.6 . INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO.....	76
3.6.1 . <i>Estudio de las interacciones mediante medidas de tensión superficial.</i> ..	76
3.6.2 . <i>Isotermas de enlace</i> .....	83
3.6.2.1 . Ligandos específicos .....	83
3.6.2.2 . Ligandos no específicos .....	85
3.6.2.3 . Isotermas tensioactivo-almidón.....	89
<b>4 . MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>93</b>
4.1 . HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN .....	95
4.1.1 . <i>Caracterización del almidón</i> .....	95
4.1.1.1 . Determinación de la humedad.....	95
4.1.1.2 . Análisis elemental .....	95
4.1.1.3 . Proporción amilosa/amilopectina .....	98
4.1.1.3.1 . Equipos necesarios.....	98
4.1.1.3.2 . Reactivos.....	99
4.1.1.3.3 . Procedimiento de medida.....	99
4.1.1.3.4 . Resultados obtenidos .....	101
4.1.2 . <i>Seguimiento de la reacción y medida de la actividad enzimática</i> .....	101

4.1.2.1 . Método yodométrico .....	101
4.1.2.1.1 . Equipos necesarios .....	101
4.1.2.1.2 . Reactivos .....	102
4.1.2.1.3 . Preparación de la disolución de almidón .....	103
4.1.2.1.4 . Selección de la longitud de onda de medida .....	104
4.1.2.1.5 . Recta patrón .....	105
4.1.2.1.6 . Experimentos de hidrólisis .....	107
4.1.2.1.7 . Cálculo de la actividad y de la conversión .....	109
4.1.2.1.8 . Representatividad de la conversión obtenida por el método yodométrico. ....	110
4.1.2.2 . Medida de actividad enzimática en presencia de tensioactivos: Tabletas Phadebas® .....	118
4.1.2.2.1 . Equipos necesarios .....	118
4.1.2.2.2 . Reactivos .....	119
4.1.2.2.3 . Recta patrón .....	122
4.1.2.2.4 . Medida de actividad en presencia de tensioactivos. Cálculo de la actividad relativa .....	124
4.2 . INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO .....	125
4.2.1 . <i>Medida de tensión superficial</i> .....	125
4.2.1.1.1 . Equipos necesarios .....	126
4.2.1.1.2 . Reactivos .....	126
4.2.1.1.3 . Procedimiento de medida .....	127
<b>5 . RESULTADOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>129</b>
5.1 . HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN .....	131
5.1.1 . <i>Influencia de la concentración de enzima</i> .....	131
5.1.2 . <i>Influencia del pH</i> .....	133
5.1.3 . <i>Influencia de la temperatura</i> .....	134
5.1.4 . <i>Influencia de la concentración de sustrato</i> .....	141
5.1.5 . <i>Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática</i> .....	149
5.2 . INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO .....	151
5.2.1 . <i>Tensiones superficiales en presencia y ausencia de almidón</i> .....	151

<b>6 . DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>159</b>
6.1 . HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN .....	161
6.1.1 . <i>Influencia de la concentración de enzima</i> .....	161
6.1.2 . <i>Influencia del pH</i> .....	167
6.1.3 . <i>Influencia de la temperatura: Desactivación térmica</i> .....	172
6.1.4 . <i>Influencia de la concentración de sustrato: Modelo cinético</i> .....	183
6.1.5 . <i>Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática</i> .....	197
6.2 . INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO.....	199
6.2.1 . <i>Tensiones superficiales en presencia y ausencia de almidón</i> .....	199
6.2.1.1 . <i>Isotermas tensioactivo-almidón</i> .....	216
<b>7 . CONCLUSIONES .....</b>	<b>227</b>
<b>8 . NOMENCLATURA .....</b>	<b>235</b>
<b>9 . BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>241</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>269</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>277</b>
<b>ANEXO: DOCTORADO EUROPEO.....</b>	<b>285</b>
OBJECTIVES .....	289
SUMMARY.....	291
CONCLUSIONS.....	301

## **1. OBJETIVOS**



La Industria de Detergentes y Productos de Limpieza en España supone una facturación total de 1450 millones de euros al año, con una producción anual estimada de 2.025 millones de toneladas, según datos de la Encuesta Industrial de Productos del Instituto Nacional de Estadística correspondientes al año 2003. Se trata pues de una actividad industrial de gran volumen, con una amplia diversificación de productos, que genera miles de puestos de trabajo y con un importante impacto en la actividad económica del conjunto de la Industria Química.

El sector alimentario tiene la obligación de sacar al mercado productos de alta calidad, exentos de gérmenes patógenos y toxinas; por tanto es imprescindible la realización de ciclos de limpieza y desinfección de forma regular y en intervalos cortos de tiempo (*Wildbrett 2000*). Dentro del sector de detergentes existe un subsector, que representa un 10 % del mercado total, que fabrica productos especiales para su aplicación en la industria, colectividades, restauración y hostelería. Estos detergentes industriales, son productos altamente contaminantes, debido a su especial composición química, y su efecto sobre las aguas residuales es bastante intenso si se tiene en cuenta la cantidad vertida y la frecuencia con que se vierte. Ello puede ocasionar por ejemplo problemas de eutrofización, de ecotoxicidad, efectos sobre la salud humana, etc. En la Tabla 1.1 se recogen los agentes químicos de limpieza más empleados en la industria así como las posibles amenazas o peligros que puede originar su uso y vertido a la red fluvial.

La industria alimentaria invierte anualmente millones de euros en prevenir la contaminación de productos por microorganismos patógenos, siendo de fundamental importancia un sistema de limpieza eficaz. El consumo de sustancias limpiadoras y desinfectantes, simples o combinadas es muy elevado; valga como ejemplo las 130000 Tm/año que se consumen en Alemania según *Kiermeier y col. 1996*. En la Tabla 1.2 se recogen los desinfectantes más empleados para combatir los microorganismos. Por otra parte los consumidores reclaman cada vez más productos de gran calidad organoléptica y microbiana, las disposiciones legales son más exigentes y los impuestos que deben soportar estas industrias sobre los vertidos de aguas residuales son mayores.

Sustancia	Amenaza/Peligro
<b>Ácidos y Bases</b>	
Hidróxido potásico	Irritante
Hidróxido sódico	Corrosión
Ácido fosfórico	Irritante/Corrosión
Ácido nítrico	Irritante/Necrosante/Corrosión
Ácido clorhídrico	Problemas respiratorios/Irritante/Corrosión
Ácido sulfámico	Irritante
<b>Secuestrantes</b>	
Tri- y di- fosfato sódico	Eutrofización/Secuestra metales pesados
Ácido nitrilo triacético	Eutrofización/Secuestra metales pesados
<b>Tensioactivos</b>	
<i>Aniónicos</i>	
Alquilbenceno sulfonato lineal	Espumas/Biodegradabilidad
Alquilsulfato	
Alquilétersulfato	
<i>Catiónicos</i>	
Haluro de trialquilbencilamonio	Incompatibilidad con aniónicos/Presencia de cloro/Biodegradabilidad
Haluro de Alquilpiridinio	
<i>No iónicos</i>	
Alquilfenol etoxilado	Productos tóxicos en la biogradación

**Tabla 1.1. Agentes químicos más empleados para la limpieza en la industria**

Sustancia	
<b>Ácidos y Bases</b>	
Guanidinas	
Compuestos fenólicos	
Halógenos y sus compuestos	Cloro
	Dióxido de cloro
	Compuestos generadores de cloro
	Yodo, Bromo y Flúor
Agentes oxidantes productores de oxígeno	Peróxido de hidrógeno
	Perácidos
	Percompuestos orgánicos
Aldehídos	Formaldehído
Tensioactivos	Compuestos de amonio cuaternario
	Tensioactivos anfóteros

**Tabla 1.2. Desinfectantes más empleados en la industria.**

El futuro de la producción y consumo de estos detergentes y productos de limpieza durante los próximos años va a estar pues fuertemente condicionado fundamentalmente por factores ecológicos, sanitarios y energéticos. Al detergente se le exige un balance óptimo de comportamiento en cuanto a precio, acción a baja temperatura (ahorro energético), máximo rendimiento para distintas superficies y suciedades, no toxicidad, no irritabilidad, que sea altamente biodegradable, etc. Todo ello conlleva que la formulación de detergentes requiera en la actualidad de una investigación fundamental y aplicada extraordinariamente elevada. Esto está llevando al replanteamiento de las formulaciones actuales en el ámbito de la hostelería y de la industria agroalimentaria, buscando otras alternativas menos perjudiciales para el medioambiente y que a la vez sean suficientemente eficaces. El empleo de enzimas en estas nuevas formulaciones permite disminuir la presencia de otros componentes químicos más agresivos y también conseguir rendimientos apropiados a temperaturas inferiores. La sustitución de los clásicos tensioactivos por otros más respetuosos con la naturaleza y que a su vez sean compatibles con esas enzimas es otra de las alternativas posibles.

Los objetivos de la presente tesis doctoral se enmarcan dentro de los proyectos de investigación, “Formulaciones de detergentes líquidos específicos para el sector industrial agroalimentario y hostelería” (1FD97-0931, Fondos FEDER), “Preparaciones enzimáticas para la degradación de residuos alimentarios” (PB98-1293, Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento) y “Formulación específica de detergentes biodegradables de base enzimática” (Plan Andaluz de Investigación 2002-2003, Proyectos de Cooperación con Empresas) de los Grupos de Investigación “Ingeniería de Interfases y Tecnología Bioquímica” y “Tensioactivos, Enzimas y Emulsiones” del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, dirigidos a investigar una posible nueva formulación de detergentes enzimáticos líquidos industriales, en la que se eviten o atenúen los efectos nocivos medioambientales y sanitarios derivados del vertido y de la ingestión involuntaria de estos productos, así como una reducción en los costes energéticos mediante la disminución de la temperatura de lavado. En concreto en la presente tesis doctoral se pretende caracterizar  $\alpha$ -amilasas y sus interacciones con tensioactivos no iónicos como los alcoholes grasos etoxilados y los alquilpoliglucósidos que podrían

incluirse en formulaciones detergentes destinadas a la eliminación de suciedades de origen amiláceo sobre superficies duras.

Así pues los objetivos pretendidos son:

- Estudiar la hidrólisis enzimática de almidón mediante una  $\alpha$ -amilasa comercial empleada en formulaciones detergentes. Se considerará la influencia de la concentración de enzima, pH, temperatura y concentración de sustrato sobre la reacción enzimática. Con los resultados obtenidos se propondrá un modelo cinético para la hidrólisis.
- Determinar la influencia sobre la actividad enzimática de la presencia de tensioactivos como los alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos comerciales. Comparar los resultados obtenidos con otros tensioactivos clásicos como los alquilbenceno sulfonatos lineales y los alquil fenoles etoxilados.
- Analizar las interacciones que puedan aparecer entre la suciedad, almidón, y los tensioactivos con el fin de determinar su posible influencia sobre las propiedades deterativas de estos.

Con todo ello se dispondría de la información más significativa con vistas a la planificación y desarrollo de un posterior estudio, mediante ensayos de lavado, sobre la eliminación de suciedades de origen amiláceo sobre superficies duras.

## **2. RESUMEN**



En la presente tesis doctoral en primer lugar se comenzó por caracterizar el sustrato origen de la suciedad que se pretende eliminar, el almidón. Para la investigación se empleó un almidón de patata soluble de la casa Panreac. Se determinó su humedad mediante una balanza de infrarrojos obteniéndose un valor del 16.0 %. A continuación se sometió el almidón a un análisis elemental a fin de constatar la presencia de posibles impurezas, determinándose en función de la composición experimental obtenida que no existían diferencias con respecto a la teórica y que por tanto de existir impurezas serían despreciables. Finalmente se analizó la proporción existente de los dos polímeros de glucosa que constituyen el almidón, la amilosa y la amilopectina. Para ello se determinó espectrofotométricamente la cantidad de amilosa según el método descrito por *McGrance y col. 1998* para la determinación de amilosa en almidón, obteniéndose un porcentaje en amilosa del  $19.8 \pm 0.2$  %. Por tanto el contenido en amilopectina sería del  $80.2 \pm 0.2$  %.

La enzima que se investigó para su aplicación en nuevas formulaciones detergentes es una  $\alpha$ -amilasa comercial de origen bacteriano (*bacillus licheniformis*): Termamyl® 300 L Type DX de la casa Novozymes A/S.

Para el seguimiento de la reacción y medida de la actividad enzimática en ausencia de tensioactivos se realizó la puesta a punto de un procedimiento analítico basado en el método yodométrico de medida de actividad de amilasas descrito por *Fuwa 1954*. El método yodométrico está basado en la capacidad que tiene la amilosa para ligar yodo dando lugar a un complejo de color azul cuya absorbancia puede medirse espectrofotométricamente. A fin de comprobar que el almidón se disuelve correctamente se realizaron una serie de experimentos, en los que diferentes alícuotas de una disolución madre de almidón fueron sometidas a ebullición durante periodos de tiempo distintos y posteriormente se realizó un barrido de longitud de onda de estas disoluciones previamente teñidas con disolución de yodo. Se comprobó que un tiempo de ebullición de 3 minutos era suficiente, obteniéndose una disolución completamente transparente una vez disuelto el almidón. El siguiente paso fue seleccionar la longitud de onda a la que se mediría la absorbancia ya que, para el complejo yodo-almidón, ésta depende del grado de polimerización de la amilosa

(John y col. 1983). Dado que el grado de polimerización del almidón no es fijo sino que varía dentro de un amplio rango existen múltiples longitudes de onda a las que absorbe la luz. A partir de barridos de longitud de onda de disoluciones de almidón se seleccionó como longitud de onda óptima la correspondiente a la máxima absorbancia (ésta a su vez corresponde a la fracción de amilosa cuyo grado de polimerización es mayoritario), resultando ser 575 nm.

Una vez establecido como se analizaría el almidón se definió el procedimiento para la realización de los distintos experimentos de hidrólisis. Se estableció el procedimiento de parada de la reacción enzimática mediante bajada del pH y posterior ebullición a fin de desactivar la  $\alpha$ -amilasa.

La elección de 575 nm como longitud de onda de medida requiere comprobar si la absorbancia a dicha longitud de onda es representativa a lo largo de la hidrólisis no sólo del polímero que absorbe específicamente a esa  $\lambda$  sino de todas las restantes fracciones, es decir, es representativa del área bajo la curva para un intervalo de longitud de onda dado. Con este fin se realizaron experimentos a distintas condiciones de pH, temperatura y concentración de enzima, midiendo la absorbancia a 575 nm y realizando además un barrido de longitudes de onda a distintos tiempos de reacción. Se definieron intervalos de longitud de onda centrados en 575 nm de diferente tamaño, comprobándose que la absorbancia a 575 nm es representativa del área bajo la curva para los distintos intervalos. Por tanto para medir la concentración total de almidón a distintos tiempos de reacción no es preciso hacer un barrido y medir áreas, bastará con medir la absorbancia a 575 nm. Con respecto a la conversión se demostró que la conversión media de las cadenas de almidón mayoritarias que absorben dentro de un rango de longitudes de onda sería prácticamente equivalente a la conversión calculada a la longitud de onda de 575 nm y por lo tanto ésta es representativa no sólo del polímero que absorbe específicamente a esa  $\lambda$  sino de la media de todas las restantes fracciones que tengan distintos grados de polimerización.

Comprobada la idoneidad y representatividad de método yodométrico se pasó a estudiar la influencia de la concentración de enzima, pH, temperatura y

concentración de sustrato sobre la reacción enzimática de hidrólisis del almidón soluble con la  $\alpha$ -amilasa.

Para analizar la influencia de la concentración de enzima se realizaron experimentos a 37 °C y pH = 6, a tiempos de reacción 0, 10, 20 y 30 minutos, y a distintas concentraciones iniciales de enzima, manteniendo constante la concentración inicial de almidón en aproximadamente 1 g/L. De acuerdo con la definición de actividad amilásica, UA, establecida en la Ecuación (4.6),

$$UA = \frac{(S_i - S)}{e_0 \cdot t_r} \quad \text{Ec. (4.6)}$$

se observó que para cada concentración inicial de enzima no existe una variación definida de la actividad con respecto al tiempo y que también permanece constante independientemente de la concentración de enzima inicial, resultando un valor medio de 1.88 UA para la enzima ensayada. Todo ello sugirió que era aceptable la no desactivación de la enzima a pH = 6 y 37 °C. En tal caso se puede definir la intensidad de tratamiento,  $y$ , como el producto de la concentración inicial de enzima por el tiempo de reacción,  $e_0 \cdot t_r$ . Al representar el producto de la conversión por la concentración inicial de almidón (es decir, la concentración de almidón hidrolizado) frente a la intensidad de tratamiento, se observó que todos los puntos experimentales se ajustaban aceptablemente a una línea recta que pasa por el origen, incluyendo datos hasta conversiones de aproximadamente 0.8, de forma que la pendiente determina el valor de la última derivada de la Ecuación (6.2)

$$\frac{r}{e_0} = \frac{S_i \cdot dx}{e_0 \cdot dt} = \frac{d(x \cdot S_i)}{dy} = f(x, S_i) \quad \text{Ec. (6.2)}$$

y por lo tanto del cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima, que resultó de 1.90 g almidón / (g enzima · min).

El estudio de la influencia del pH se hizo a valores comprendidos entre 5 y 9. Los tiempos de hidrólisis fueron 0, 10, 20 y 30 minutos, y la temperatura fue de 37°C; la concentración inicial de almidón fue aproximadamente 1 g/L. Los valores obtenidos para el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima se representaron frente al pH. Se observa que los valores de  $r/e_0$  presentan un máximo, 18.2 min<sup>-1</sup>, a pH igual a 7.5 con reducciones muy significativas a pH inferiores, 2.2 min<sup>-1</sup> a pH igual a 7, y menos acusadas a pH superiores, 12.3 min<sup>-1</sup> a pH igual a 9. También se calculó para cada pH el valor de la actividad correspondiente a cada intensidad de tratamiento, deduciéndose que no existen variaciones definidas, por lo que se determinó un valor medio para cada pH y se representó la actividad relativa ( $\text{Actividad}_{\text{media}}/\text{Actividad}_{\text{máxima}} \cdot 100$ ) frente al pH, obteniéndose una variación de la actividad con el pH análoga a la establecida para el cociente  $r/e_0$ . De estos resultados se deduce que el control del pH tendrá que ser muy eficiente, especialmente para que no se produzcan disminuciones, ya que conducirían a reducciones drásticas de la velocidad de reacción.

Para analizar la influencia de la temperatura y determinar una posible desactivación térmica de la enzima, inicialmente se realizaron dos series de experimentos, a 65 y 75 °C, a pH de 7.5, con una concentración inicial de almidón,  $S_1'$ , de aproximadamente 1 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima y diferentes tiempos de reacción. De acuerdo con *Camacho Rubio y col. 1988*, si se representan los resultados obtenidos para cada temperatura en un gráfico de  $x$  frente a  $e_0 \cdot t_r$ , puede resultar que los puntos experimentales se agrupan en una línea única, lo que indicaría o que no existe desactivación ( $y = e_0 \cdot t_r$ ) o que la reacción de desactivación es de segundo orden, o bien pueden resultar líneas distintas para cada valor de  $e_0$ , lo que indicaría desactivación con un orden distinto a 2. Para las dos temperaturas ensayadas, 65 y 75 °C, se observó que todos los puntos se alineaban en una única tendencia y por tanto o no hay desactivación o bien el orden de la reacción de desactivación es 2. Para comprobar si existe desactivación se pueden realizar experimentos con tiempo previo,  $t_p$ , es decir, mantener la enzima durante un tiempo previo a la reacción a la temperatura de ésta; posteriormente se comparan los resultados obtenidos para una misma concentración inicial de enzima y distintos tiempos previos. Con este objetivo se realizaron experimentos en las mismas

condiciones de pH, con  $S_i$  aproximadamente igual a 1 g/L, a las temperaturas de 60, 65, 70 y 75 °C, y diferentes tiempos de reacción, para varios tiempos previos. A todas las temperaturas ensayadas se observó que existían diferentes tendencias en función del tiempo previo, lo cual indicaba que existía desactivación y que por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos realizados sin tiempo previo, que el orden de dicha desactivación debía ser muy próximo a 2. Para poder calcular la constante de desactivación,  $k_d$ , y comprobar el orden de reacción se replanteó el procedimiento propuesto a partir del trabajo de *Camacho Rubio y col. 1988*, considerando en las ecuaciones el tiempo previo. Para comprobar que el orden de desactivación es 2 y obtener el valor de  $k_d$  para cada temperatura se partió de la Ecuación (6.15) y se aplicó como método de optimización de los parámetros  $k_d$  y  $n$  el método unidireccional alternante, tomando como valor inicial del orden de desactivación  $n = 2$  (realmente se utilizó  $n = 1.99999$  para evitar la indeterminación que supone  $n = 2$ ) y un valor inicial estimado que se calculó para  $k_d$ .

$n \neq 1, n \neq 2$

$$y = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) \cdot k_d} \cdot \left\{ \left[ 1 - (1-n) e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t_p \right]^{2-n} - \left[ 1 - (1-n) e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot (t_r + t_p) \right]^{2-n} \right\}$$

**Ec. (6.15)**

Se dedujo que  $n$  era prácticamente igual a 2 y se repitió el proceso de optimización pero fijando este valor, variando  $k_d$  y calculando la intensidad de tratamiento con la Ecuación (6.14),

$$n = 2 \quad y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left[ \frac{1 + k_d \cdot e_0 \cdot (t_r + t_p)}{1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_p} \right]$$

**Ec. (6.14)**

obteniéndose finalmente  $k_d$  para cada una de las temperaturas ensayadas.

Se realizó un ajuste tipo Arrhenius de la constante de desactivación térmica en función de la temperatura, resultando una energía de activación de 172 kJ/mol y un factor preexponencial de  $2.01 \cdot 10^{28}$  L/(g·min).

Seguidamente se analizó la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática. Existen estudios de numerosos autores sobre la cinética de la hidrólisis de almidón con  $\alpha$ -amilasas. La mayoría de ellos ajusta la cinética a la ecuación de Michaelis-Menten calculando los parámetros  $K_M$  y  $k$  por el método de las velocidades iniciales de reacción y posterior linealización de Lineweaver-Burk. La aplicación del método de las velocidades iniciales de reacción facilita la interpretación de los resultados experimentales, sin embargo el modelo cinético obtenido sólo es válido para los momentos iniciales de la reacción, pudiendo no serlo a tiempos de reacción superiores. Para comprobar la validez del modelo cinético obtenido a tiempos superiores en la presente tesis se aplicó el método integral para la evaluación de  $K_M$  y  $k$  a diferentes temperaturas de operación y pH constante. Suponiendo pues, que la cinética corresponde a la ecuación de Michaelis-Menten, y conocida la cinética de desactivación térmica de la enzima, la Ecuación (6.20) define el modelo cinético planteado para la hidrólisis.

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) = \frac{1}{k} \cdot \left[ K_M \cdot \ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right) + S_i \cdot (x-x_0) \right] \quad \text{Ec. (6.20)}$$

Esta ecuación se puede reordenar en la forma:

$$A = \frac{K_M}{k} \cdot B + \frac{1}{k} \quad \text{Ec. (6.21)}$$

$$A = \frac{1}{k_d \cdot S_i \cdot (x-x_0)} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) \quad \text{Ec. (6.22)}$$

$$B = \frac{\ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right)}{S_i \cdot (x-x_0)} \quad \text{Ec. (6.23)}$$

Por tanto si se representa A frente a B se debe obtener una línea recta de cuya pendiente y ordenada en el origen se puede obtener  $K_M$  y  $k$  respectivamente.

Se realizaron experimentos a 37, 55, 65 y 75 °C, a un pH de 7.5, con diferentes concentraciones iniciales de almidón,  $S_i$ , 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima y con diferentes tiempos de reacción. Los valores resultantes de  $K_M$  y  $k$  a cada temperatura se ajustaron mediante la ecuación de Arrhenius obteniéndose una energía de activación de 24.4 y de 41.7 kJ/mol y unos factores preexponenciales de 735 g/L y  $1.74 \cdot 10^8 \text{ min}^{-1}$  para  $K_M$  y  $k$  respectivamente.

Con los valores de las energías de activación y de los factores preexponenciales de la ecuación de Arrhenius para los tres parámetros cinéticos,  $K_M$ ,  $k$  y  $k_d$  y mediante la Ecuación (6.20) se puede comprobar como se ajusta el modelo cinético a los resultados experimentales, representando la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción,  $e_0 \cdot t_r$ . Se observó como el modelo cinético propuesto se ajustaba razonablemente bien a los resultados experimentales obtenidos a las temperaturas ensayadas de 37, 55, 65 y 75 °C, a las que se alcanzaron conversiones de hasta 0.95. Sólo en el caso de 75 °C a concentraciones iniciales de sustrato de 0.88 g/L (en base seca) existió una desviación significativa del modelo cinético respecto de los resultados experimentales cuando la conversión es superior a 0.3.

La hidrólisis enzimática en presencia de tensioactivos puede ser influenciada por la interacción del tensioactivo tanto con la enzima como con el sustrato de la reacción. Para analizar la influencia de la presencia de tensioactivos sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa se realizaron experimentos a 37 °C y un pH de 7.3, empleando el método de las tabletas Phadebas®. La capacidad manifiesta de formación de complejos entre tensioactivos y almidón determinó que el método yodométrico dejara de ser válido para el seguimiento de la reacción enzimática, ya que la formación de dichos complejos interfiere con la formación del complejo yodo-almidón (*Kim y Robinson 1979, Moulik y Gupta 1979*). Como tensioactivos no iónicos se emplearon alquilpoliglucósidos, GlucoPON® 215 CS UP, GlucoPON® 600 CS UP y GlucoPON® 650 EC de la casa comercial Henkel-Cognis, alcoholes grasos etoxilados, Findet 10/15 y Findet 1214N/23 de Kao Corporation S.A., y nonilfenol etoxilado (con 9.5 moles de óxido de etileno) cuyo nombre comercial es Findet 9Q/21.5NF de Kao Corporation S.A. Además también se empleó un tensioactivo aniónico, el LAS

(alquilbenceno sulfonato lineal) de Kao Corporation S.A. Para cada tensioactivo se midió la actividad relativa de la enzima a dos concentraciones diferentes de tensioactivo. Todos los tensioactivos no iónicos ensayados, a excepción del Findet 10/15, no produjeron una pérdida significativa en la actividad enzimática, lo cual concuerda con el hecho de la no existencia de interacciones electrostáticas que pudieran desnaturalizar la enzima, tal y como señalaron *Russell y Britton 2002*; además estos autores indicaron que la presencia de alcoholes etoxilados estabilizan proteasas en presencia de tensioactivos aniónicos como el LAS, impidiendo de esta forma la pérdida de actividad enzimática. También es conocido el hecho de que los alquilpoliglucósidos estabilizan las enzimas en formulaciones de detergentes líquidos (*von Rybinski y Hill 1998*), por lo que era de esperar que no se produjera pérdida de actividad. A su vez se comprobó como el LAS, además de su ya señalada capacidad para desestabilizar proteasas, también fue capaz de producir una pérdida significativa de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estudiada, muy probablemente debida a las interacciones electrostáticas propias de su carácter aniónico. Con respecto al Findet 10/15, por tratarse de un alcohol graso etoxilado y tener carácter no iónico era de esperar que no afectase a la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, sin embargo se observó que sí producía pérdida de actividad y que ésta aumentaba conforme lo hacía la concentración del tensioactivo en el medio. De todos los tensioactivos no iónicos ensayados el Findet 10/15 es el que presenta menor HLB, siendo ligeramente inferior a 10, es decir los grupos lipofílicos predominan sobre los hidrofílicos, por lo que por su mayor carácter hidrofóbico puede determinar una mayor interacción con la enzima y por lo tanto una reducción de la actividad enzimática que resultó ser más significativa cuanto mayor era su concentración.

Otro de los factores que puede ejercer su influencia sobre la limpieza de las superficies manchadas con almidón y sobre la hidrólisis enzimática en presencia de tensioactivos es la propia interacción del tensioactivo con el almidón. A fin de cuantificar estas posibles interacciones entre el almidón y diferentes tensioactivos no iónicos, alquilpoliglucósidos (Glucopon® 215 CS UP, Glucopon® 600 CS UP y Glucopon® 650 EC), alcoholes grasos etoxilados (Findet 10/15 y Findet 1214N/23), nonilfenol etoxilado (Findet 9Q/21.5NF), y entre el almidón y el tensioactivo aniónico

LAS, se realizaron medidas de tensiones superficiales a diferentes concentraciones de tensioactivo en presencia y en ausencia de almidón. La medida de la tensión superficial se ha aplicado en el estudio de estas interacciones polímero-tensioactivo (*Jones 1967, Goddard 1986a, Goddard 1986b*). Todos los tensioactivos no iónicos ensayados formaron complejos con el almidón, por lo que en su presencia se produjo un aumento de la tensión superficial para la misma concentración de tensioactivo con respecto a los experimentos sin almidón. Al comparar los tres alquilpoliglucósidos, dado que la interacción hidrofóbica es la responsable de la formación de los complejos (*French y Murphy 1977, Hui y col. 1983, Goddard 1986a*), se observó como GlucoPON 215 al tener un HLB más elevado (más hidrofílico) tenía una capacidad menor para ligarse que GlucoPON 600 y GlucoPON 650 que presentan HLB más bajos y muy parecidos entre sí. Cuando se compararon los alcoholes grasos etoxilados se obtuvo un resultado análogo, Findet 10/15 tiene un HLB mucho más bajo que Findet 1214N/23 y por tanto aquel mostró una mayor capacidad para ligarse. Empleando el criterio del HLB no se pueden comparar directamente los alquilpoliglucósidos con los alcoholes grasos etoxilados ni con el nonilfenol pues, aparte del HLB, su naturaleza y estructuras químicas diferentes también influyen sobre su capacidad de formar complejos. Según los resultados obtenidos se pueden ordenar los tensioactivos de menor a mayor capacidad para formar complejos: Findet 9Q/21.5NF < GlucoPON® 215 < GlucoPON® 600 < Findet 1214N/23 < Findet 10/15 < GlucoPON® 650.

También se ha comprobado que, para todos los sistemas tensioactivo no iónico-almidón ensayados, existe una relación de proporcionalidad directa entre las concentraciones de tensioactivo ligado y total, de manera que la formación del complejo tensioactivo-almidón continúa hasta que se alcanza la tensión superficial mínima sin que se detecte una saturación del almidón previa a la formación de micelas del tensioactivo.

En el caso del LAS, al ser un tensioactivo aniónico se produjeron interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de la amilopectina, que al tener la carga eléctrica del mismo signo debe impedir la formación del complejo (*Goddard 1986b*).

Para el Glucocon 650 se hicieron experimentos a dos concentraciones diferentes de almidón siendo una de ellas tres veces superior a la otra. De acuerdo con *Goddard 1986a* se observó que la cantidad máxima de tensioactivo ligado era directamente proporcional a la cantidad de almidón.

Se comprobó también que la presencia de sales modifica la capacidad de formar complejos (*Goddard 1986a*). Ello se reflejó en experimentos realizados con Findet 1214N/23 con y sin tampón fosfato, donde se comprobó que la presencia del tampón produce una disminución de las concentraciones micelares críticas, tanto en presencia como en ausencia de almidón, y que la cantidad máxima de tensioactivo ligado aumenta. Mediante los gráficos de Scatchard se dedujo de acuerdo con *McGhee y Von Hippel 1974* que el aumento puede ser debido bien a un aumento en el parámetro de cooperatividad,  $w$ , o bien a un descenso en el número de unidades de glucosa,  $n_m$ , necesarias para ligar el tensioactivo por parte de la amilosa.

Además, a partir de las medidas de tensión superficial se pudieron constatar otros hechos relevantes no relacionados con la formación de complejos, sino con respecto a los valores de las concentraciones micelares críticas de los tensioactivos ensayados. Se comprobó que al aumentar el tamaño de la cadena alquílica en una serie homóloga de tensioactivos disminuye su valor. Findet 1214N/23 presenta una longitud de cadena alquílica superior a Findet 10/15 y por tanto su cmc resultó ser menor. Ahora bien según *Valea y Gozález 1990* la cmc aumenta con el número de moles de óxido de etileno en los tensioactivos no iónicos, y en ese caso Findet 10/15 debería presentar menor cmc. Por los resultados obtenidos se dedujo que tenía mayor peso la influencia del tamaño de la cadena que el número de moles de óxido de etileno. Por su parte al considerar la longitud de las cadenas alquílicas de los alquilpoliglucósidos se obtuvieron resultados análogos, siendo la cmc de Glucocon 600 menor que la de Glucocon 650 y ésta a su vez menor que la de Glucocon 215, ya que este mismo orden se corresponde con el de mayor a menor la longitud de cadena alquílica. Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de *von Rybinski y Hill 1998*. Cuando se compararon las cmc de los tensioactivos no iónicos con la del tensioactivo aniónico LAS también se comprobó que la cmc de este es muy superior a la de aquellos (*Harris y Brown 1950, von Rybinski y Hill 1998*). Además la tensión

superficial correspondiente para el LAS a concentraciones iguales o superiores a la cmc también es superior a la de los Findet o los Glucocon. Por tanto con dosis inferiores de alcoholes grasos etoxilados o alquilpoliglucósidos se conseguirán mejores propiedades de mojado que con dosis superiores de LAS siendo de esperar pues un mejor rendimiento en el lavado por parte de aquellos.

Debido a la formación del complejo almidón-tensioactivo, a la hora de emplear uno de estos tensioactivos para la formulación de un detergente se ha de tener en cuenta, además de la tensión superficial que determinan en el baño de lavado, dos aspectos:

- La formación de complejos puede aumentar la solubilidad de los polímeros (*Goddard 1986a*).
- La formación de complejos, a concentraciones por debajo de la micelar crítica, disminuye la actividad superficial para una concentración definida de tensioactivo.

Por tanto habrá que atender a ambos factores, pues un aumento en la solubilidad del almidón facilitará su eliminación y dificultará fenómenos de redeposición, sin embargo la disminución de la actividad superficial hará perder eficacia detergente al tensioactivo. Se deduce pues que un tensioactivo con buena capacidad de formar complejos con el almidón ayudará a la limpieza de superficies manchadas con almidón, aunque requerirá mayor concentración de tensioactivo para alcanzar la concentración micelar crítica. Ese tensioactivo podría ser el Glucocon 600 o el Glucocon 650, los cuales además no afectan apreciablemente a la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, por lo que podrían ser adecuados para la formulación de detergentes industriales de base enzimática.

Al representar las isotermas de enlace y los gráficos de Scatchard para los distintos tensioactivos se comprobó que los alcoholes grasos etoxilados y los alquilpoliglucósidos se unen a la amilosa por enlace cooperativo positivo y por enlace no cooperativo tipo Langmuir a la amilopectina. De acuerdo con las isotermas de

enlace para el Findet 1214N/23 y para el Glucocon 600 se dedujo que al aumentar la concentración de alcoholes grasos etoxilados o de alquilpoliglucósidos en una disolución de almidón, estos primeramente se unirán a la amilosa hasta que se sature para posteriormente unirse a la amilopectina hasta que se alcance la concentración micelar crítica. Conforme a los resultados obtenidos para los tensioactivos no iónicos ensayados y en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores para otros ligandos, se deduce que el nonilfenol etoxilado presentará un comportamiento análogo a estos a la hora de unirse al almidón.

### **3. INTRODUCCIÓN**



### 3.1. ALMIDÓN: PROPIEDADES, COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

El almidón se encuentra ampliamente distribuido en los órganos de las plantas, como carbohidrato de reserva. Es también, como componente de gran cantidad de alimentos, la fuente más importante de carbohidratos en la alimentación humana. Además los almidones y sus derivados tienen gran significación en diferentes ramas de la industria, tales como la alimentaria, textil y del papel. Su obtención se lleva a cabo principalmente a partir de maíz, mijo, patata, trigo, mandioca, batata, arroz y palmera de sago (*Belitz y Grosch 1988*).

El almidón se presenta en forma de gránulos, que habitualmente ofrecen una forma redondeada, irregular, con tamaños que oscilan entre 2 y 100  $\mu\text{m}$ . Tanto la forma como el tamaño de los gránulos son característicos de la especie vegetal y pueden utilizarse para identificar su origen (*Coultate 1997*).

Respecto a su composición química, el almidón es un polímero de glucosa anhidra, formado por dos componentes: amilosa y amilopectina. El contenido en amilosa varía según la fuente de origen y suele estar comprendido entre el 17 y el 35 % en peso (*Munck y col. 1988, Buleon y col. 1990*). La Tabla 3.1 recoge la composición de diversos almidones (*Belitz y Grosch 1988*).

<b>Fuente</b>	<b>% Amilosa</b>	<b>% Amilopectina</b>
Trigo	26	74
Cebada	22	78
Maíz	28	72
Amilomaíz	51-65	49-35
Maíz céreo	1	99
Avena	27	73
Arroz	18	82
Arroz céreo	1	99
Mijo	25	75
Mijo céreo	1	99
Patata	23	77
Alubia	24	76
Guisante	35	65

**Tabla 3.1 Porcentaje de amilosa y amilopectina de almidones de diferente origen.**

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, debido a la fuerza de cohesión de los puentes de hidrógeno, que mantienen unidas las cadenas pero, a medida que la temperatura se eleva hasta lo que se conoce como temperatura inicial de gelatinización, comienzan a absorber agua. La gelatinización corresponde a los fenómenos de hinchamiento irreversible y solubilización observados cuando los granos de almidón se calientan a temperaturas superiores a 60 °C en presencia de exceso de agua. Las temperaturas iniciales de gelatinización son características de cada tipo concreto de almidón, pero generalmente se hallan en el intervalo 55-70 °C. A medida que los granos absorben agua se produce una pérdida progresiva de la birrefringencia y de su cristalinidad. La solubilización del almidón conduce a la destrucción parcial de la estructura granular dependiendo de la especie botánica y del tipo cristalino del almidón nativo. Conforme prosigue el hinchamiento aumenta espectacularmente la viscosidad de la suspensión-disolución; las moléculas de amilosa son lixiviadas de los granos hinchados y contribuyen también a la viscosidad. Si se sigue calentando mientras se agita, la viscosidad comienza pronto a decaer a medida que los granos pierden su integridad. Si se deja que la pasta se enfríe, la viscosidad vuelve a elevarse, a medida que las uniones a través de puentes de hidrógeno entre la amilopectina y la amilosa se restablecen para dar un producto de consistencia tipo gel (*Coultate 1997*).

Los geles obtenidos tienen estructuras tridimensionales y porosas (*Leloup y col. 1991a*). Esquemáticamente estos geles se forman a partir de una matriz continua de uno de los polímeros que retienen pequeñas gotas del otro polímero. La composición de cada una de las dos fases depende principalmente del grado de gelatinización (parcial/total) y de la relación amilosa/amilopectina en el grano de almidón. Resumiendo, las características del gel de almidón dependen, entre otros factores, del tamaño, de la estructura morfológica de los granos, de la relación amilosa/amilopectina, de la temperatura y del tiempo de cocción (*Tester y Morrison 1990, Leloup y col. 1991b*).

Debido a los cambios morfológicos que se producen durante la gelatinización del almidón, éste adquiere una estructura más asequible al ataque enzimático (*Zeleznač y Hoseneý 1987, Slaughter y col. 2001*).

Cuando se dejan en reposo durante unas horas, las disoluciones de almidón o las pastas de esta sustancia, comienzan a mostrar cambios en sus propiedades reológicas; las disoluciones diluidas pierden viscosidad pero las pastas concentradas y los geles se tornan gomosos y exudan agua. Los dos tipos de cambios señalados se deben al fenómeno denominado retrogradación, que afecta a las moléculas de amilosa. Éstas en el transcurso del tiempo se asocian y cristalizan (*Coultate 1997*).

La tendencia a la retrogradación se ve incrementada por las bajas temperaturas, especialmente alrededor de los 0 °C, el pH neutro, las altas concentraciones de almidón y la ausencia de tensioactivos. También depende del peso molecular y del tipo de almidón (*Belitz y Grosch 1988*).

El fenómeno de recristalización de la amilosa en la retrogradación dificulta la hidrólisis enzimática del almidón por las amilasas (*Fuwa 1954, Cairns y col. 1990, Colonna P y col. 1992, Slaughter y col. 2001*).

### **3.1.1. Amilosa**

La amilosa es un polímero lineal formado de unidades D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$  (Figura 3.1). Debido a su carácter prácticamente lineal y a la presencia casi exclusiva de los enlaces  $\alpha(1-4)$ , es susceptible de complejar moléculas hidrófobas (yodo, ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas); su capacidad de fijación de yodo es del orden de 20 mg por 100 mg de amilosa (*Cluskey y col. 1980*). Esta propiedad se debe a la conformación en hélice de esta macromolécula, en la cual todos los grupos hidrófilos están orientados hacia el exterior mientras que los grupos hidrófobos lo están hacia el interior. Esto forma una cavidad hidrófoba de un diámetro de 4,6 Å que puede ser ocupada por diversos compuestos. Esta capacidad de fijación del yodo es la base la cuantificación analítica del almidón (*Fuwa 1954*), de la caracterización de la amilosa (*John y col. 1983*) y de la determinación de su proporción en el almidón en relación a la amilopectina (*McGrance y col. 1998*).

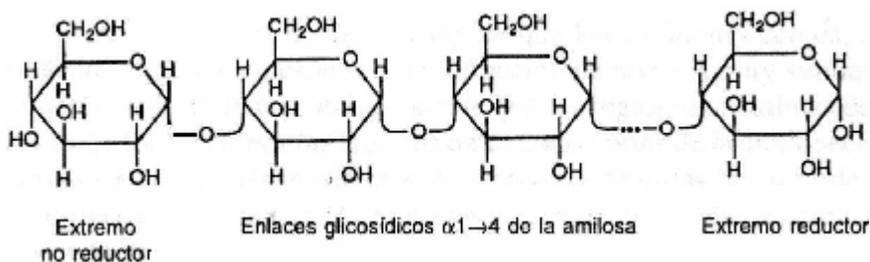


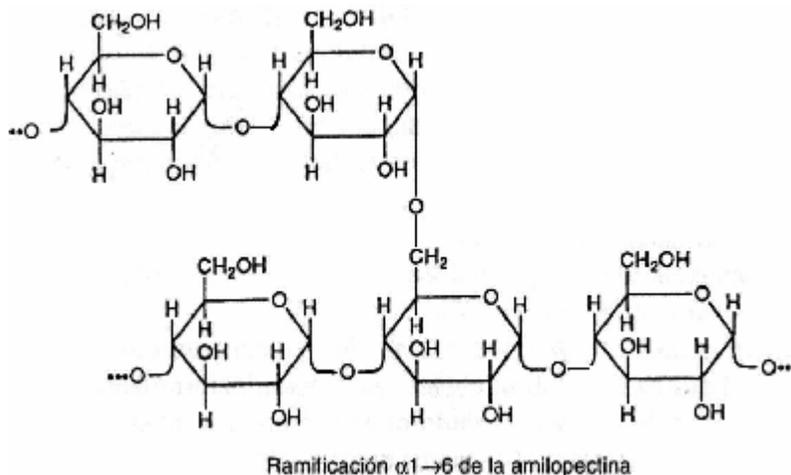
Figura 3.1 Amilosa.

El tamaño molecular de la amilosa es muy variable; así en los cereales presenta un grado de polimerización entre 1000 y 2000, mientras que en la patata puede alcanzar los 4500. Ello determina pesos moleculares comprendidos entre 150.000 y 750.000 Dalton (*Belitz y Grosch 1988*).

### 3.1.2. Amilopectina

La amilopectina es el polímero mayoritario del almidón, ya que supone entre el 70 y el 80 % en peso. Se trata de una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa anhidra (D-glucosa) están principalmente unidas por enlaces  $\alpha$ (1-4) cuando forman parte de cadenas lineales y por enlaces  $\alpha$ (1-6) cuando actúan como nexo de unión entre dos cadenas para formar ramificaciones (Figura 3.2). El grado de polimerización es aproximadamente de  $10^6$  unidades de glucosa, oscilando su peso molecular en el intervalo comprendido entre  $10^6$ - $10^7$  Dalton (*Belitz y Grosch 1988*).

Alrededor del 4-5% de las unidades de glucosa están implicadas en los enlaces  $\alpha$ (1-6) (*Coultate 1997*). Las ramificaciones tienen una longitud de cadena media de 20-25 unidades de glucosa (*Adkins y col. 1966, Whistler y Daniel 1984*).



**Figura 3.2 Amilopectina.**

A lo largo del tiempo se han formulado muchas hipótesis para describir la disposición de las ramificaciones de las cadenas de amilopectina y, durante mucho tiempo, se aceptó la estructura arbórea propuesta originalmente por *Meyer y Bernfeld 1940*. Sin embargo, la enzima pululanasa, que hidroliza específicamente los enlaces  $\alpha(1-6)$  y los métodos de filtración en gel, que permiten determinar las longitudes de cadena de las fracciones resultantes (*Lee y col. 1968, Whistler y Daniel 1984*), han proporcionado nuevos puntos de vista. La Figura 3.3 representa la disposición de las cadenas que va siendo cada vez más aceptada. Se trata, en esencia, de un esqueleto de cadenas monorramificadas de aproximadamente 40 unidades de glucosa que llevan consigo familias (“clusters”) de cadenas, en su mayor parte no ramificadas de unas 15 unidades de longitud. La estructura de la amilopectina que se representa se basa en los estudios de *Robin 1981* sobre almidón de patata. Generalmente se supone que las cadenas de amilopectina se orientan radialmente en el gránulo de almidón, con sus extremos no reductores proyectados hacia la superficie. La flecha indica regiones concéntricas, separadas aproximadamente unas 6  $\mu\text{m}$ , en las que se concentra la ramificación.

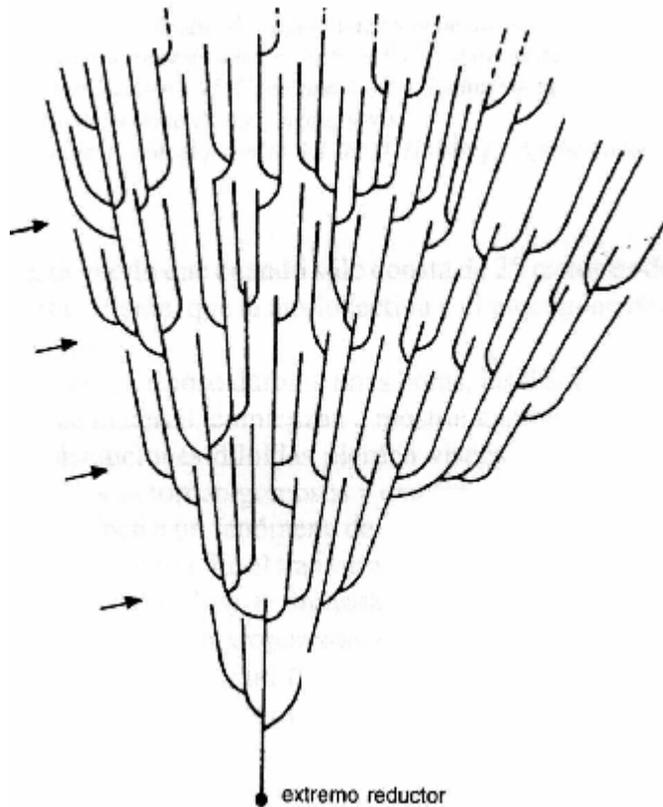


Figura 3.3 Estructura ramificada de la amilopectina.

### **3.1.3. Distribución de la amilosa y la amilopectina en el grano de almidón**

La organización de las moléculas de amilosa y amilopectina dentro de los granos del almidón es un tema muy discutido y parece variar según el origen del almidón (*Borglum 1981, Blanshard 1987*). Al microscopio de polarización, se observa el clásico esquema de la “Cruz de Malta”, característico de los materiales birrefringentes. Esto indica la existencia de un grado elevado de orientación molecular, pero no proporciona más detalles. La cristalinidad queda confirmada por los esquemas de difracción de rayos X, los cuales también revelan que los granos de almidón de las raíces son más cristalinos que los de los cereales. Un aspecto más

inesperado de la cristalinidad es que se debe más a la amilopectina ramificada que a la amilosa lineal, como parece indicar la observación de que los almidones céreos, que carecen prácticamente de amilosa, dan un esquema de difracción de rayos X muy similar al de un almidón normal. Parece más probable que las regiones cristalinas de la molécula estén formadas por las familias de cadenas cortas de la amilopectina. Es más, posiblemente sean estas familias la causa de las capas concéntricas de material cristalino relativamente resistente al ácido que se observan al seccionar un gránulo (Coulter 1997).

### **3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN**

El comienzo del desarrollo de la hidrólisis del almidón tuvo lugar en el siglo XVIII. Por aquel entonces, debido al bloqueo al que se veía sometida Europa por Napoleón, ésta se encontraba sin acceso a sus fuentes tradicionales de azúcar. Se ofrecieron pues recompensas a aquellos que desarrollaran métodos para encontrar un sustituto (Fullbrook 1984). El químico alemán Kirchhoff descubrió que hirviendo almidón en medio ácido y neutralizándolo posteriormente aquel podía ser convertido en azúcar (Schwardt 1990). Sin embargo, la acción catalítica no específica del ácido daba lugar a la formación de productos de sabor y color indeseables. Además, el sirope obtenido tenía un contenido salino relativamente alto. Estas características indeseables en los siropes causadas por la hidrólisis ácida dieron lugar al desarrollo de tecnologías enzimáticas que solventan estos problemas. Así la historia moderna de las enzimas comienza en 1833, cuando el francés Payen logró aislar el componente activo ( $\alpha$ -amilasa) en la malta, el cual llamó diastasa. Takamine, en 1894, utilizó una mezcla enzimática procedente del *Aspergillus oryzae* como suplemento alimenticio para la población asiática que tenía dificultades para digerir el arroz (en concreto el almidón) (Fullbrook 1984). Este preparado constituye posiblemente el primer producto enzimático de origen microbiano (los anteriores fueron obtenidos de tejidos animales o vegetales). La identificación y el uso de esas enzimas del *Aspergillus oryzae* permitió la producción de siropes de las características deseadas y que no eran factibles con la hidrólisis ácida. El verdadero impulso en términos industriales se

produjo a mediados de la década de los 60, con el desarrollo de la amiloglicosidasa, la cual hizo posible que el almidón fuera completamente hidrolizado a glucosa (Luenser 1983). Finalmente en 1973 se optimizó el proceso enzimático a nivel industrial cuando se introdujo una amilasa obtenida del *Bacillus licheniformis*, que era estable a altas temperaturas. El uso de esta enzima permitió la producción de siropes con un contenido en glucosa de hasta el 98%, que eran el sustrato ideal para que la glucosa isomerasa convirtiera la glucosa en fructosa (Long 1986).

Las enzimas responsables de la degradación del almidón son las Glucosil Hidrolasas (Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica), y su acción irreversible sobre un sustrato se puede esquematizar como sigue:



donde R y R' son cadenas que contienen de 1 a n moléculas de glucosa anhidra.

Obtener una ecuación cinética que reproduzca las conversiones en función del tiempo y de las condiciones experimentales de la reacción es difícil, debido, fundamentalmente, a las siguientes causas:

- El almidón es una mezcla de amilopectina y amilosa (20-25%); ello conlleva a una estructura compleja en donde existen ramificaciones y diferentes tipos de enlaces,  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$ , que son hidrolizados por distintas enzimas.
- La mezcla de almidón y productos de reacción varía en función del tiempo de hidrólisis y está formada por sacáridos de diferentes pesos moleculares.
- Durante el proceso de hidrólisis pueden producirse reacciones de reversión.

Por estas razones, la mayoría de los autores que estudian la hidrólisis del almidón con diferentes enzimas, se limitan a evaluar las velocidades de reacción aplicando la ecuación de Michaelis-Menten y determinan los parámetros  $K_M$  y  $r_m$ , o proponen modelos empíricos que de alguna forma explican sus resultados experimentales (*Nouri 1993*).

Durante la hidrólisis enzimática se rompen los enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$  presentes en el almidón para liberar cadenas más cortas: dextrinas, maltosa y glucosa. Las enzimas actúan específicamente sobre un tipo de enlaces o en algunos casos sobre los dos. En la Tabla 3.2 se clasifican las enzimas utilizadas en la hidrólisis del almidón (*Mercier 1982*).

Enzima	Tipo de enlace	Tipo de ataque	Productos Terminales	
			Amilosa	Amilopectina
$\alpha$ -amilasa E.C.3.2.1.1	$\alpha(1-4)$	Endo	Glucosa Maltosa	Dextrinas
$\beta$ -amilasa E.C.3.2.1.2	$\alpha(1-4)$	Exo	Glucosa Maltosa	Maltosa Dextrinas
Pululanasa E.C.3.2.1.41	$\alpha(1-6)$	Endo	Ninguno	Dextrinas
Isoamilasa E.C.3.2.1.60	$\alpha(1-6)$	Endo	Ninguno	Dextrinas
Amiloglucosidasa E.C.3.2.1.3	$\alpha(1-4)$ $\alpha(1-6)$	Exo	Glucosa	Glucosa

**Tabla 3.2 Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón.**

En las Tablas 3.3 (amiloglucosidasas) y 3.4 ( $\alpha$  y  $\beta$  amilasas) (*Pandey y col. 2000*) y en la Tabla 3.5 (isoamilasas y pululanasas) (*Atkinson y Mavituna 1991*) se recogen el origen y las propiedades de algunas de estas enzimas

Source	No. of forms	Molecular mass (Da)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Raw starch digestion
<i>Aspergillus awamori</i>	1	83 700	4.5	60	+
<i>A. awamori</i>	2	110 000, 86 000	-	-	-
<i>A. awamori</i> var. <i>kawachi</i>	3	57 000-90 000	3.8-4.5	-	+
<i>A. niger</i>	2	74 000, 96 000	4.2, 4.5	60, 65	+
<i>A. niger</i>	4	61 000-112 000	4.4	60	+
<i>A. niger</i>	6	58 400-99 500	3.5-5.0	-	+
<i>A. niger</i>	2	99 000-112 000	4.5-5.0	-	0
<i>A. niger</i>	3	70 000-90 000	3.5-4.0	50-60	0
<i>A. oryzae</i>	3	38 000-76 000	4.5	50, 60	+
<i>A. phoenicis</i>	1	-	4.5	60	0
<i>A. sativi</i>	1	90 000	4.5	-	0
<i>A. terreus</i>	1	70 000	5.0	60	0
<i>Cephalosporium charicoida</i>	1	-	5.4	60	0
<i>Coniophora cerebella</i>	1	-	4.0-4.5	-	0
<i>Cordicum rajfsi</i>	1	-	4.5	40-50	0
<i>Clostridium</i>	1	77 000	4.5	65	0
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	1	75 000	5.0	70	+
<i>Endomyces</i> sp.	-	55 000	-	-	0
<i>Endomyces</i> sp.	-	53 000	-	-	0
<i>E. capsularis</i>	2	-	4.5	40-50	0
<i>Humicola lanuginosa</i>	2	48 000, 68 000	4.9, 6.6	65, 70	0
<i>Monascus kaolingang</i>	2	49 000, 59 000	4.5	50	0
<i>Mucor rouxiatus</i>	2	69 000	4.7	55	+
<i>Paecilomyces varioti</i>	1	84 000, 86 000	5.0	-	0
<i>Penicillium oxalicum</i>	2	94 000	4.6	55-60	+
<i>Piricularia oryzae</i>	3	58 600-74 000	4.5	50-55	0
<i>Rhizopus</i> sp.	1	100 000	4.5-5.0	-	+
<i>R. delemar</i>	5	-	4.5	40	0
<i>R. niveus</i>	1	66 000	4.5-6.0	-	+
<i>Sclerotophyllum commune</i>	1	37 000	5.0	40	+
<i>Termonyces lanuginosa</i>	1	-	-	70	0

<sup>a</sup> Raw-starch digestion only by one form.

**Tabla 3.3** Propiedades y origen de algunas amiloglucosidasas (Pandey y col. 2000).

Source	No. of forms	$K_m$ value for starch	Molecular mass (Da)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)
<b>Bacterial <math>\alpha</math>-amylase</b>					
<i>Aliyidiobacillus acidocaldarius</i>	1	–	160000	3.0	75
<i>Alteromonas haloplanctis</i>	1	–	49 340	–	–
<i>Bacillus</i> sp.	3	–	110000–140000	5.5	90
<i>Bacillus</i> sp.	1	–	97000	11.0–12.0	60
<i>Bacillus</i> sp.	2	–	150000, 42000	9.0	70
<i>B. flavothermus</i>	1	2.2 mg/ml	–	5.5–6.0	60
<i>B. licheniformis</i>	1	0.9 g/l	58000	6.0–6.5	90
<i>B. licheniformis</i> <sup>a</sup>	1	–	64000	6.0–8.0	50
<i>B. lentus</i>	1	–	42000	6.1	70
<i>B. megaterium</i>	1	–	59000	–	–
<i>B. subtilis</i>	1	–	54780	5.6	80
<i>B. subtilis</i>	1	–	–	5.4–6.4	50
<i>B. subtilis</i> <sup>a</sup>	1	3.85 mg/ml	57700	6.5	50
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1	2.4 g/l	66000	5.5	50
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	1	–	210000	7.5	71
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1	3.6 g/l	84000	5.6	45
<i>C. perfringens</i>	1	–	76000	6.5	30
<i>Cytophaga</i> sp.	1	–	59000	4.5–6.5	50–60
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1	–	140000	5.5	60–65
<i>L. brevis</i>	1	0.27 mg/ml	75900	6.5	55
<i>L. plantarum</i>	3	2.38 g/l	50000	5.5	65
<i>Micrococcus luteus</i>	1	–	56000	6.0	30
<i>M. varians</i>	3	0.5 mg/ml	14000–56000	7.0	45
<i>Myxococcus coraloides</i>	1	$2 \times 10^{-3}$ g/l	22500	8.0	45
<i>Pyrococcus furiosus</i>	1	–	66000	–	100
<i>P. woesei</i>	1	–	70000	–	130 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus bovis</i>	1	0.88 mg/ml	77000	5.0–6.0	50
<i>Thermococcus profundus</i>	1	–	42000	5.5–6.0	80
<i>Thermus</i> sp.	1	–	59000	5.5–6.5	70
<i>T. filiformis</i>	1	5.0 mg/ml	60000	5.5–6.0	95
<b>Fungal and yeast <math>\alpha</math>-amylase</b>					
<i>Aspergillus</i> sp.	1	2.5 mg/ml	56000	5.5	40
<i>A. flavus</i>	1	0.5 g/l	52500	6.0	55
<i>A. flavus</i>	1	–	75000	7.0	30
<i>A. fumigatus</i>	1	0.42 mg/ml	65000	5.5	40
<i>A. oryzae</i>	1	–	50000	5.25	44
<i>A. oryzae</i>	1	0.22%	52000	4–5	50
<i>Cryptococcus</i> sp.	1	–	66000	–	–
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	1	2 mg/ml	56000	5.6	45
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	1	0.8 g/l	76000	4.5–5.0	70
<i>Nocardia asteroides</i>	2	–	65000, 56000	6.9	50
<i>Rhizopus</i> sp.	2	5.0 mg/ml	64000	4.0–5.6	60–65
<i>Scytalidium</i> sp.	1	–	87000	6.5	50
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	1	–	53000	4.8–6.0	62.5
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	–	–	4.6–5.2	60
<i>Thermotoga maritima</i> <sup>a</sup>	1	–	61000	7.0	85–90
<b><math>\beta</math>-Amylase</b>					
<i>Bacillus circulans</i>	1	0.9 mg/ml	64000	7.0	50
<i>B. polymyxa</i>	1	–	53000	5.5	45
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	1	–	180000	6.0	70
<i>Hendersonula tonkoidea</i>	1	0.3 mg/ml	60000	6.0	60
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	–	–	5.0	60

<sup>a</sup> Expressed in *E. coli*.

<sup>b</sup> Hyper-active.

Tabla 3.4 Propiedades y origen de  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas (Pandey y col. 2000).

	pH optimum	Temperature optimum (°C)	Molecular weight	Inhibited by pCMB	Stabilized by calcium
<b>Pullulanase</b>					
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6.5	50	143000	-*	
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	6.0-6.5	50	112000 ± 20000	+	+
<i>Bacillus polymyxa</i>	6.0-7.0	45	48000	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	4.5-5.5	60			
<i>Bacillus</i> sp. No. 202-1	8.5-9.0	55	92000	-	
<i>Streptomyces</i> sp. No. 280	5.0-6.0	50			
<b>Isoamylase</b>					
<i>Cytophaga</i> sp.	5.5	40	120000	-	+
<i>Escherichia coli</i>	5.6-6.4	45-50		+	
<i>Pseudomonas amyloclavata</i>	3.0-4.0	90000	+		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.0	25		+	

\* Totally inhibited by phenylmercuriacetate.

Tabla 3.5 Propiedades y origen de algunas isoamilasas y pululanazas (Atkinson y Mavituna 1991).

### 3.2.1. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1-4)$

Se llaman genéricamente Amilasas y fueron clasificadas en  $\alpha$  y  $\beta$  por *Khun* en 1925. Las  $\alpha$ -amilasas liberan productos de reacción que tienen el grupo -OH situado en el carbono C<sub>1</sub> en configuración  $\alpha$ , mientras que en las  $\beta$ -amilasas se encuentra en configuración  $\beta$ .

Las  $\alpha$ -amilasas son las más utilizadas a escala industrial y su origen puede ser vegetal, animal o microbiano (bacterias, mohos y levaduras). Se caracterizan por hidrolizar al azar los enlaces  $\alpha(1-4)$  presentes en las cadenas de amilosa y amilopectina produciendo como sustancias terminales, en el primer caso, glucosa y maltosa, y en el segundo, además de los sacáridos anteriores, cadenas más o menos ramificadas llamadas  $\alpha$ -dextrinas límite (*Mercier 1985, Leloup y col. 1991a*). Las  $\alpha$ -amilasas atacan al almidón al azar y nunca por los extremos, lo que permite clasificarlas como endoenzimas. Este ataque sobre las regiones interiores del sustrato causa un rápido descenso en la viscosidad de los almidones hinchados y también un cambio en la coloración del complejo yodo-almidón (*John y col. 1983, Luenser 1983, Fullbrook 1984*).

Las  $\alpha$ -amilasas comerciales pueden ser de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amiloliquefaciens*,...) o de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*,...). Las de origen bacteriano son más termoestables que las fúngicas (ver Tabla 3.4).

Hasta 1971, la única endo-amilasa que se utilizaba comercialmente era la obtenida a partir de *Bacillus amiloliquefaciens*. Posteriormente (Madsen y col. 1973, Slott y col. 1974) consiguieron aislar  $\alpha$ -amilasas de cepas del *Bacillus licheniformis*, que son más termoestables y que han sido rápidamente introducidas en los procesos industriales por ser más activas en un intervalo de pH más amplio y por presentar una estabilidad térmica menos dependiente de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que las del *Bacillus amiloliquefaciens*.

Las  $\alpha$ -amilasas termolábiles de origen fúngico se utilizan fundamentalmente para la obtención de productos que contienen unas elevadas proporciones en maltosa (Barfoed 1976).

La utilización de enzimas termoestables presenta muchas ventajas, entre ellas se eliminan riesgos de contaminación por microorganismos y disminuyen la viscosidad del medio ya que actúan a altas temperaturas. Sin embargo, las  $\alpha$ -amilasas fúngicas son más eficaces cuando no es necesario gelatinizar previamente el almidón además de que ofrecen la posibilidad de trabajar a bajas temperaturas.

Las  $\beta$ -amilasas son exo-enzimas que atacan las cadenas de almidón por sus extremos no reductores. Convierten la amilosa en  $\beta$ -maltosa si estas cadenas contienen un número par de unidades de glucosa anhidra, mientras que los productos de reacción son  $\beta$ -maltosa y glucosa cuando el número de unidades de glucosa es impar. Estas  $\beta$ -amilasas se extraían tradicionalmente a partir de vegetales (cebada, boniato); sin embargo a partir de 1974 se preparan fundamentalmente a partir de microorganismos, tales como *B. polymxa*, *B. megaterium*, *B. cereus* y ciertas especies de *Streptomyces* y *Pseudomonas* (Mercier 1982). Estas  $\beta$ -amilasas bacterianas presentan múltiples ventajas sobre las de origen vegetal. Producidas en mayores

cantidades por el microorganismo, pueden ser fácilmente purificadas y actúan a temperaturas entre 60 y 70 °C y a un pH comprendido entre 7 y 7.5, más elevado que el de sus equivalentes vegetales.

Las  $\beta$ -amilasas tienen un pH óptimo más elevado que las  $\alpha$ -amilasas y no requieren de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para su estabilización térmica o para el aumento de su actividad (Pandey y col. 2000).

Existen numerosas aplicaciones industriales y biotecnológicas de las  $\alpha$ -amilasas, entre ellas las más importantes son producción de azúcares, siropes y alcohol. También se utilizan en la decoloración de las telas, en la industria panadera, en detergentes, en la producción de adhesivos, en la industria farmacéutica y en el tratamiento de residuos (Vihinen y Mantsala 1989). Por su parte, las  $\beta$ -amilasas se usan principalmente en industrias donde se convierte el almidón en azúcares fermentables, como destilerías, panificadoras, alcoholeras (Brena y col. 1996).

### **3.2.2. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1-6)$**

Son las llamadas enzimas desramificantes. Las más importantes son la pululanasa, descubierta por Bender y Wallenfels 1961 a partir de un cultivo de *Enterobacter aerogenes*, y la isoamilasa, descubierta por Harada y col. 1968 en Japón y Parrish y col. 1970 en EEUU a partir de cultivos de *Pseudomonas* y *Citofaga* respectivamente. Sus parámetros de actividad óptima están situados a pH=5-6.5 y T=40-50 °C. La pululanasa hidroliza la amilopectina del almidón, pero es incapaz, debido a su gran volumen, de hidrolizar completamente el glucógeno (polímero de reserva dos veces más ramificado que la amilopectina). La isoamilasa tiene una actividad complementaria a la pululanasa ya que desramifica tanto la amilopectina como el glucógeno. Ambas enzimas completan al 100% las acciones dextrinizantes y sacarificantes de las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas cuando actúan sobre el almidón, consiguiendo hidrolizados con alta conversión en maltosa.

### **3.2.3. Enzimas específicas de los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$**

El descubrimiento en los años 50 y 60 de enzimas microbianas capaces de hidrolizar los dos tipos de enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$  ha mejorado la industria del almidón, ya que la comercialización de estas enzimas, a partir de 1960, permitió la producción industrial de dextrosa o D-glucosa por vía enzimática en vez del proceso clásico e hidrólisis ácida. Estas enzimas se denominan Amiloglucosidasas o Glucoamilasas. Son exo-enzimas que tienen una actividad óptima a pH=4.5-5 y T=50-60 °C. Liberan  $\beta$ -D-glucosa por hidrólisis repetitiva de los enlaces glucosídicos, empezando por sus extremos no reductores (*Ducroo 1982, Mercier 1982*). Proviene de microorganismos del género *Rhizopus* y *Aspergillus*, y por su forma de actuar, aunque varía según el origen de estas enzimas, parece ser que tienen más facilidad para unirse a las cadenas largas que a las cortas e hidrolizan antes los enlaces  $\alpha(1-4)$  que  $\alpha(1-6)$  (*Luenser 1983*).

La amiloglucosidasa presenta un efecto sinérgico con la  $\alpha$ -amilasa. Esta sinergia disminuye conforme lo hace el peso molecular del sustrato de modo que por debajo de los 5000 Dalton puede desprejarse la acción de la  $\alpha$ -amilasa. El papel de la  $\alpha$ -amilasa es la aceleración de la velocidad de formación de glucosa suministrando, al hidrolizar el almidón, nuevas moléculas que sirven de sustrato a la amiloglucosidasa (*Fujii y Kawamura 1985, Fujii y col. 1988*).

### **3.2.4. Métodos de medida de la actividad amilolítica**

Dada la gran variedad de técnicas de medida de la actividad de las amilasas que han sido desarrolladas, la elección de la más adecuada depende de los requerimientos del caso concreto al que vaya a aplicarse. Los métodos más comúnmente utilizados para la determinación de la actividad de las amilasas pueden ser clasificados en: sacarogénicos, cromogénicos y amiloclásticos (*Okuda y col. 1988*). Los métodos amiloclásticos miden la degradación del almidón por viscosimetría, turbidimetría, yodometría (*Fuwa 1954*) y nefelometría (*Ohnishi y*

*Hiromi 1988*). Los métodos sacarogénicos representan una medida directa de la hidrólisis mediante la determinación del número de extremos reductores generados en ella (*Nelson 1944, Park y Johnson 1949, Somogyi 1952, Dubois y col. 1956, Miller 1959, Dygert y col. 1965, Robyt y col. 1972, Robyt y Whelan 1972, Sinner y Puls 1978, Hizukuri y col. 1981, Ohura y col. 1998*). Los métodos cromogénicos se basan en el uso de sustratos coloreados (*Ceska y col. 1969a, Ceska y col. 1969b, Ceska y col. 1969c, McCleary y Sheehan 1987, Sheehan y McCleary 1988, Okuda y col. 1988, Novozymes A/S 2002b*).

#### 3.2.4.1. Métodos Sacarogénicos

Durante la hidrólisis del almidón se van generando nuevos grupos reductores, uno por cada enlace hidrolizado. Este incremento de extremos reductores viene determinado por la oxidación del carbono anomérico situado en el extremo reductor. La subsiguiente reducción de un ion metálico o de un compuesto da lugar a la aparición de una coloración, ya sea por el estado reducido de dicha sustancia o por formación de un complejo coloreado. La determinación colorimétrica de la formación de extremos reductores ha venido siendo realizada en condiciones alcalinas principalmente mediante el uso de tres reactivos oxidantes: cobre (*Nelson 1944, Somogyi 1952, Dygert y col. 1965, Sinner y Puls 1978*), ferrocianuro (*Park y Johnson 1949, Robyt y col. 1972, Hizukuri y col. 1981*), ácido 3,5-dinitrosalicílico (*Miller 1959*). Además de la determinación colorimétrica también se han empleado métodos potenciométricos (*Ohura y col. 1998*). Para la cuantificación de la cantidad de extremos reductores generados se ha venido tomando como referencia la maltosa para realizar las rectas patrón. A la hora de utilizar estos métodos se han de tomar precauciones pues en algunos de ellos el poder reductor de los azúcares disminuye al aumentar el grado de polimerización de la glucosa (*Duedahl-Olesen y col. 2000*). Tal es el caso por ejemplo del método del DNS (*Miller 1959*) en el cual obtendríamos que la actividad de la amilasa disminuiría al aumentar el grado de polimerización del azúcar usado como referencia (glucosa, maltosa, maltotriosa). En el caso del método del  $\text{CuSO}_4$ /biquinolina (*Sinner y Puls 1978*), la maltopentosa, maltotetrosa, maltotriosa y maltosa darían curvas patrón idénticas y diferentes a la glucosa (mayor

cantidad de azúcares reductores). Investigaciones sobre el método de Somogyi-Nelson (*Nelson 1944, Somogyi 1952*) han demostrado que no existen diferencias en las curvas patrón obtenidas al usar glucosa o maltosa como referencia (*Duedahl-Olesen y col. 2000*). Estos resultados fueron confirmados por el hallazgo de que dicho método da equivalentes reductores equimolares para extremos reductores equimolares de malto-oligosacáridos. Estudios del método del ferrocianuro (*Robyt y col. 1972*) también han puesto de manifiesto un mayor poder reductor de la glucosa respecto a otros malto-oligosacáridos. Así el método fue modificado (*Hizukuri y col. 1981*) para obtener el mismo poder reductor para la glucosa y maltosacáridos hasta un grado de polimerización igual a 40.

#### 3.2.4.2. Métodos Cromogénicos

En ellos se usan bien complejos insolubles del sustrato, los cuales liberan fragmentos coloreados al ser hidrolizados (*Ceska y col. 1969a, Ceska y col. 1969b, Ceska y col. 1969c, Okuda y col. 1988, Novozymes A/S 2002b*), o bien paranitrofenol derivados de los maltosacáridos (maltopentosa, maltohexosa, maltoheptosa) los cuales liberan el paranitrofenol al ser hidrolizados por una mezcla de la amilasa problema con  $\alpha$ -glucoamilasa, pudiendo medirse aquel espectrofotométricamente (*McCleary y Sheehan 1987, Sheehan y McCleary 1988, Brena y col. 1996*). El uso de  $\alpha$ -glucoamilasa limita el rango de aplicación de este método a pH 5.0-6.0. Además la actividad enzimática obtenida para sustratos de cadena corta (por ejemplo maltopentosa) puede conducir a resultados no aplicables para sustratos de cadena larga como el almidón nativo, el cual puede variar en estructura y presentar múltiples ramificaciones, debido a que la actividad de la  $\alpha$ -glucoamilasa puede variar dependiendo de la longitud de cadena del sustrato, presentando menor actividad en sustratos de cadena larga que en los de cadena corta (*Fogarty y Kelly 1979*).

#### 3.2.4.3. Métodos Amiloclásticos

Entre ellos los más utilizados son el método yodométrico (*Fuwa 1954, John y col. 1983*), basado en color azul que desarrolla el complejo yodo-almidón, métodos

basados en la medida de los cambios en la viscosidad de la disolución de almidón al ir hidrolizándose (*Robyt 1984*), turbidimetría, y nefelometría (*Ohnishi y Hiromi 1988*)

El método yodométrico se basa en el hecho conocido de la formación de un complejo de inclusión de  $I_2$ ,  $I_3^-$  e  $I_5^-$  en la estructura helicoidal de la amilosa al añadir sobre una disolución de almidón una disolución de yodo-yoduro potásico. La capacidad de ligar yodo es de 20-22 mg por 100 mg de amilosa (*Cluskey y col. 1980*). Este complejo da una coloración azul medible espectrofotométricamente (*Fuwa 1954*, *John y col. 1983*). Conforme se hidroliza el almidón, por la acción de la amilasa, la intensidad de la coloración azul disminuye. La longitud de onda a la cual absorbe el complejo yodo-amilosa disminuye conforme lo hace el grado de polimerización de la amilosa, existiendo un límite correspondiente a 20 unidades de glucosa por debajo del cual no se produce coloración (*John y col. 1983*).

### 3.3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS DETERGENTES

El primer agente limpiador fabricado por el hombre fue el jabón. La primera referencia histórica aparece en las Tablas de Lagas de los Sumerios en el año 2500 a.C., que lo utilizaban para el lavado de sus ropas. Las tablas sumerias describen de manera detallada el procedimiento de fabricación del jabón, llegando incluso a definir las cantidades en que deben ser mezclados los dos componentes principales, aceite y cenizas de madera (*Gómez Antón 1996*).

En los papiros de Ebers, que se remontan al año 1500 a.C., se recoge como los egipcios utilizaron para la fabricación del jabón grasas animales o aceites vegetales y cenizas de una sustancia existente en el Nilo llamada trona, de composición similar al carbonato sódico; estos lo usaron tanto para tratar enfermedades cutáneas como para lavar la ropa (*Dobolyi 1980*).

En el año 600 a.C., los fenicios obtuvieron jabón mezclando grasa de cabra con cenizas de madera. Los mercaderes fenicios que surcaban todo el Mediterráneo

introdujeron el jabón entre los griegos y los romanos, y según el escritor romano Plinio el Viejo (año 70 a.C.), lo vendieron como laxante a los galos (*Panati 1989*).

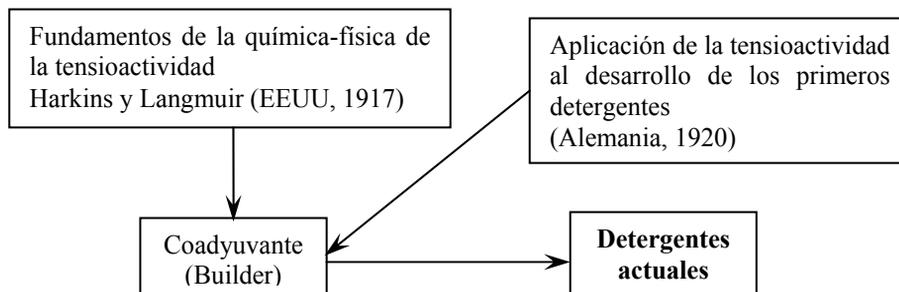
De acuerdo con una antigua leyenda romana, el jabón, soap en inglés, debe su nombre al monte Sapo donde se sacrificaban animales. La lluvia arrastraba la mezcla de grasa animal y cenizas de madera hasta las orillas del río Tiber. Las mujeres se dieron cuenta que al emplear esta mezcla para lavar obtenían mejores resultados y con menor esfuerzo (*Dobolyi 1980*).

La importancia del jabón para el lavado y la limpieza en general no fue reconocida hasta el siglo II d.C., al ser recuperado por el médico griego Galeno, quien aseguró que no sólo era capaz de curar sino también de eliminar la suciedad del cuerpo y de las ropas (*Gómez Antón 1996*).

La utilización de cal viva como componente cáustico en sustitución de las cenizas es atribuida a los árabes en el siglo VII d.C.; este descubrimiento permitió fabricar jabones más fuertes. Fueron los árabes los que lo introdujeron en España extendiéndose desde aquí a todos los países mediterráneos (*Gómez Antón 1996*). La fabricación de jabón fue un negocio floreciente en la Venecia del siglo XI, y en cierto momento el impuesto sobre el jabón llegó a ser tan alto que la gente fabricaba en secreto sus pastillas y barras amparándose en la oscuridad nocturna (*Panati 1989*). Sin embargo en el resto de Europa su introducción fue lenta, siendo un gran desconocido hasta el siglo XII d.C.

En la segunda mitad del siglo XVIII y comienzos del siglo XIX coincidieron dos situaciones, basadas en el conocimiento científico, que impulsaron el avance y desarrollo de la fabricación del jabón: el estudio de la estructura de las grasas de *Chevreul* en 1823 y el desarrollo del proceso tecnológico de obtención de carbonato sódico realizado por *Leblanc* en 1791. Este desarrollo científico-técnico permitió que un artículo considerado de lujo hasta entonces, estuviera al alcance de todo el mundo. Ello propició una mejora sustancial en las condiciones de higiene y un crecimiento exponencial en la población europea debido a la disminución de las tasas de mortalidad (*Gómez Antón 1996*).

En el siglo XIX, el barón *Justus von Liebig*, químico alemán, aseguraba que la riqueza de una nación y su grado de civilización podían medirse por la cantidad de jabón que consumía. En tiempos de von Liebig apareció el primer limpiador comercial. La adición al jabón de sustancias abrasivas e insolubles, tan finas como el talco o el yeso, o tan ásperas como la piedra pómez o el cuarzo molido daba lugar a productos excelentes para efectuar limpiezas a fondo. Para entonces, los químicos ya habían comenzado a descifrar el misterio de cómo limpia el jabón: éste lo forman moléculas con dos “brazos” muy diferentes; a uno le “agrada” agarrar las moléculas del agua, en tanto que el otro “teme” al agua y se aferra a moléculas de grasa o suciedad; por tanto, el agua del escurrido o aclarado se lleva consigo grasa y suciedad. Los químicos catalogaron como “hidrófilo” el primer brazo y como “hidrofóbico” el segundo. Pero la preeminencia del jabón como agente limpiador universal no tardaría en verse amenazada (*Panati 1989*). En 1890, *A. Krafft*, un químico alemán dedicado a la investigación, observó que ciertas moléculas de cadena corta, que no eran sustancias jabonosas, producían espuma como el jabón al unirse con alcohol. *Krafft* había producido el primer detergente del mundo, pero en aquel momento este descubrimiento no interesó a nadie y permaneció como mera curiosidad química. Las nuevas generaciones de detergentes surgieron de las investigaciones de dos norteamericanos, *Harkins* y *Langmuir*, que descubrieron sustancias sintéticas equiparables a los jabones y dotadas de la propiedad de acumularse preferentemente en las superficies, así como de las investigaciones realizadas en Alemania a principios del siglo XX. Los detergentes actuales están basados en estos conocimientos y en la incorporación de los coadyuvantes o builders. En la Figura 3.4 se observa el ciclo seguido en las investigaciones para el desarrollo actual de los detergentes (*García Domínguez 1986*):



**Figura 3.4** Ciclo de la investigación en el desarrollo de los detergentes actuales.

En Alemania en 1907, Henkel introduce el primer detergente en polvo bajo la marca Persil. Con el incremento de la importancia de las fibras sintéticas la demanda de detergentes se volvió más exigente, solicitándose detergentes con determinadas propiedades y que fueran menos sensibles a la dureza del agua.

Después de la primera guerra mundial, el bloqueo aliado privó a Alemania del suministro de grasas naturales utilizadas para fabricar lubricantes. Las grasas de los jabones fueron sustituidas, y el propio jabón se convirtió en un artículo difícil de conseguir en el país. Dos químicos, *H. Günther* y *M. Hetzer* de BASF, recordaron entonces el curioso hallazgo de *Krafft* y elaboraron el primer detergente sintético comercial, el *Nekal*, conseguido a partir de la alquilación y sulfonación del naftaleno, creyendo que serviría como sustituto del jabón tan sólo en tiempos de guerra. El *Nekal* era una sustancia de alto poder espumante con buenas propiedades de mojado, constituyéndose en el primer intento de sustitución del jabón. Sin embargo las cadenas alquílicas del alquilnaftaleno sulfonato eran demasiado cortas y no conseguían suficiente carácter tensioactivo. En 1928 *H. Bertsch* consiguió la sulfonación de un alcohol graso obteniendo un producto que unía a las buenas propiedades humectantes una excelente detergencia. De esta forma se descubrió el primer agente activo sintético para la limpieza. Las ventajas del detergente respecto al jabón no tardaron en manifestarse. A comienzos de los años 1930, gran parte del mundo industrializado fabricaba una amplia gama de detergentes sintéticos (también llamados syndets) que no dejaban poso ni residuo alguno, y que en muchos aspectos eran muy superiores al jabón. El primer detergente formulado con sulfatos de

alcoholes grasos fue introducido en el mercado por Henkel (Alemania) en 1932 y por Procter & Gamble en EEUU en 1933. Por necesidades de mercado, que precisaba un mayor volumen de producción, aparecieron los alquilbencenos sulfonatos; uno de ellos el tetrapropilbenceno sulfonato satisfacía el 65 % de la demanda mundial en 1959 (*Jakobi y Loehr 1987*). Sin embargo numerosas investigaciones demostraron que la biodegradación de este tensioactivo se hacía muy lenta por la presencia de carbono terciario, es decir, una ramificación de cadena lateral. Como consecuencia lagos y ríos empezaron a exhibir una espuma persistente, se redujo la cantidad de oxígeno disuelto en ellos y empezaron a desaparecer especies animales y vegetales. En 1960, a fin de solventar estos problemas y bajo la presión de las leyes se desarrollaron los alquilbencenos sulfonatos lineales, LAS, más biodegradables (*Jakobi y Loehr 1987, Jensen J 1999, Scott y Jones 2000*).

Otro grupo de tensioactivos muy utilizados fueron los alquilfenoles de cadena ramificada, APE. A partir 1984 se restringió su uso debido a que producían subproductos de biodegradación tóxicos (*Scott y Jones 2000*). Como alternativas a los APE ramificados están los de cadena lineal, los alcoholes grasos etoxilados, FAEO, y los alquilpoliglucósidos, estos últimos con excelentes propiedades ecológicas (*García y col. 1997, Eichhorn y Knepper 1999*).

Durante el desarrollo de los detergentes también cabe reseñar la sustitución del carbonato sódico, utilizado inicialmente como coadyuvante, por los difosfatos sódicos y posteriormente por los tripolifosfatos sódicos. En la actualidad debido a los problemas de eutrofización por los polifosfatos (*Dobolyi 1980, Pitter 1993, Sachdev y Krishnan 1997, Negulescu y Negulescu 2004*) su uso ha sido eliminado en múltiples países y se encuentra limitado en otros muchos. Alternativas a estos productos son las zeolitas, el ácido cítrico, el ácido nitrilotriacético, los secuestrantes subestequiométricos (fosfonatos, poliacrilatos y copolímeros), etc. (*Jenkins y col. 1974, Fischer y col. 1978, Bressan 1987, Guerrero Conejo y col. 1988, Patino y col. 1990*). A lo largo del siglo XX también se fueron introduciendo otros componentes que ayudaron a mejorar la eficacia de lavado, como son los controladores de espuma, las enzimas, los agentes antirredeposición, los abrillantadores ópticos y los activadores de blanqueo.

La tecnología de los detergentes ha venido creciendo en paralelo con la de las máquinas de lavar y con los tipos de sustratos, cuyo desarrollo ha exigido una potenciación de las propiedades de los detergentes. Hoy día los requisitos que en general se le exigen a un detergente son: tiempos de lavado cortos, acción a bajas temperaturas, biodegradabilidad, baja toxicidad, no irritabilidad para la piel, bajo precio, etc. Por tanto es preciso una investigación fundamental y aplicada extraordinaria para satisfacer todas estas demandas.

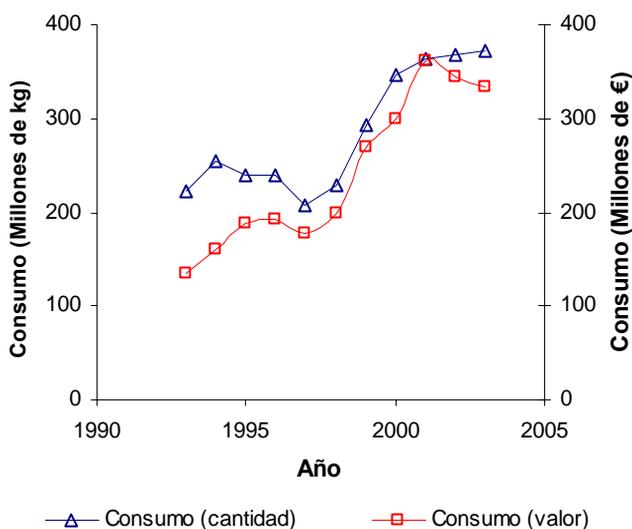
### **3.4. SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA DE LOS DETERGENTES**

Actualmente la demanda de tensioactivos está acaparada por menos de diez tipos de tensioactivos, siendo los más importantes los alquilbenzeno sulfonatos (LAS), los sulfatos de alcoholes grasos (FAS), los étersulfatos de alcoholes grasos (FAES), los alcoholes grasos etoxilados (FAEO) y los jabones (Tabla 3.6). Estos tensioactivos son utilizados en distintos sectores por la fabricación de productos de consumo (detergentes y cosméticos) y para aplicaciones industriales (textiles, alimentos, plásticos y polímeros, pieles, etc.) (*Bailón Moreno 2003*).

<b>JABONES</b>	En 1994, el consumo mundial total fue de 4.5 millones Tm, de los cuales 2 millones Tm se utilizaron en detergentes. La demanda se concentró en Asia y Sudamérica. Los restantes 2.5 millones Tm se emplearon en la fabricación de jabón de tocador
<b>LAS</b>	Son los principales componentes de la industria de detergentes. En Latino América y Asia está permitido el consumo de alquilbenzeno sulfonatos de cadena ramificada, sin embargo en la mayoría de los países se sustituyen por los de cadena lineal, debido a que los ramificados no son biodegradables.
<b>FAS</b>	Los sulfatos de alcoholes grasos, aumentan en importancia, especialmente combinados como cosurfactantes en diferentes formulaciones. Se espera que sustituyan a los jabones en Asia lo que incrementaría su consumo y utilización en un futuro próximo.
<b>FAES</b>	Están experimentando una velocidad de crecimiento media en los últimos años del 4.5 %. Se utilizan fundamentalmente para la fabricación de detergentes líquidos, champús y geles de baño
<b>FAEO</b>	Experimentan un crecimiento anual del 4 %, debido a la sustitución de los alquilfenoles etoxilados por motivos ecológicos.

**Tabla 3.6. Tensioactivos más empleados (*Bailón Moreno 2003*).**

Con respecto al mercado español, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (*INE 2005*), la evolución del consumo de tensioactivos (excluidos jabones) como materia prima pasa de una cantidad de 222 millones de kg en 1993 a 371 millones de kg en 2003, es decir un incremento del 67% durante este periodo (Figura 3.5). No obstante, durante los años 1994-1997 el consumo descendió hasta 207 millones de kg, coincidiendo exactamente con la recesión económica de esos años. Por tanto el consumo de tensioactivos podría considerarse con un índice de la situación económica.

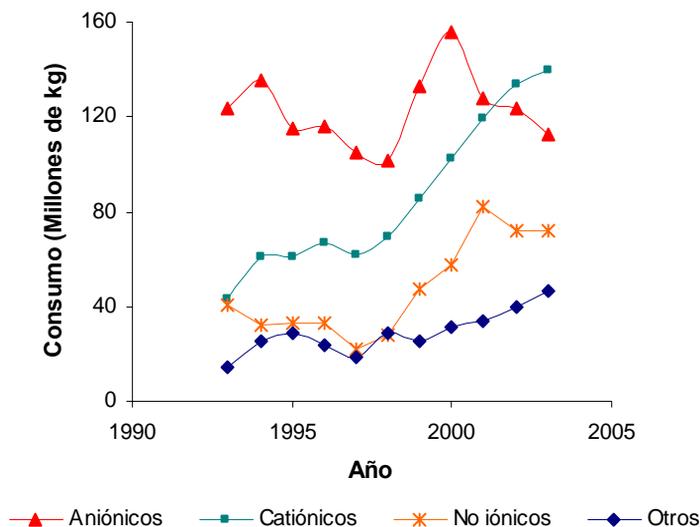


**Figura 3.5 Consumo total de tensioactivos en España en el periodo 1993-2003.**

Si se observa la curva de consumo expresada ahora en millones de euros (Figura 3.5), vemos que tiene un perfil similar a la de cantidades consumidas, pero en el período de crisis económica se produce un acercamiento a ella. Evidentemente este dato indica que la recesión vino acompañada de una fuerte inflación de los precios en este mercado (*Bailón Moreno 2003*). Transcurrida la crisis económica el mercado aumenta considerablemente su consumo hasta el año 2000, a partir del cual se

mantiene estable entorno a los 370 millones de kg, produciéndose sin embargo una bajada de los precios entre los años 2001 a 2003, como lo indica el descenso en el consumo expresado en euros.

Para el mismo periodo de tiempo, años 1993 a 2003, considerando ahora la cantidad consumida de tensioactivos según su tipo, aniónicos, catiónicos, no iónicos y otros (INE 2005), representada en la Figura 3.6, se observa como el consumo de los tensioactivos aniónicos presenta un valor oscilante, mientras que para todos los demás tensioactivos se produce un aumento constante, presentando un mayor empuje los catiónicos que a partir del año 2002 pasan a ocupar el primer lugar en cantidad consumida.

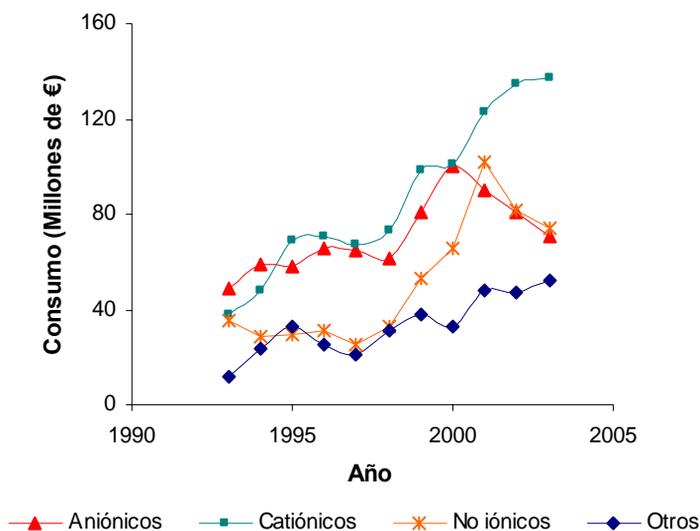


**Figura 3.6 Cantidad de tensioactivos por tipos consumida en España en el periodo 1993-2003.**

De acuerdo con *Bailón Moreno 2003*, esta situación llama la atención, si se tiene en cuenta que los tensioactivos aniónicos son la base lavante de la mayor parte de los detergentes (textiles, lavavajillas, limpiadores en general, geles de baño,

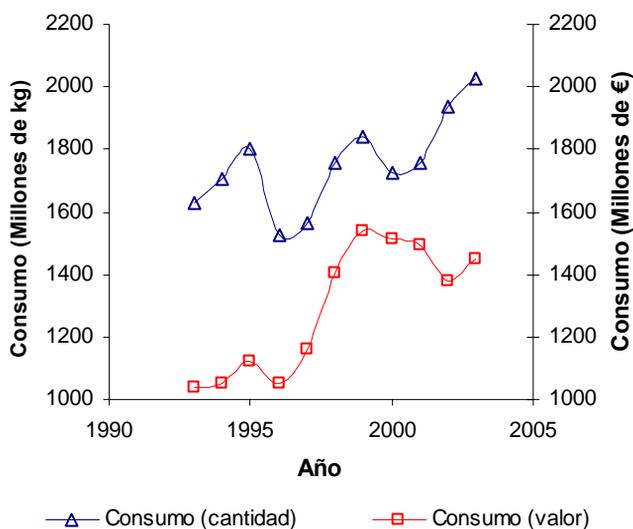
champús, etc.). En cambio los catiónicos se aplican fundamentalmente en suavizantes y pequeñas cantidades en desinfectantes y champús acondicionadores. Por tanto se deduce que se emplea más tensioactivo en suavizar que en lavar. Teniendo en consideración que los tensioactivos catiónicos, aún siendo biodegradables, son los más difíciles de biodegradar, y que son mucho más tóxicos que los aniónicos (Scott y Jones 2000) es previsible que aparezcan problemas de tipo medioambiental a medio y largo plazo si se mantiene esta tendencia.

Con respecto a los datos del INE del valor monetario de las cantidades consumidas para el mismo periodo de tiempo (Figura 3.7), se observa al comparar con los datos cantidades consumidas de la Figura 3.6 que los tensioactivos aniónicos, además de haber sido los más consumidos hasta el año 2001, son también los más baratos, siendo tanto los catiónicos como los no iónicos más caros, si bien estos últimos parecen estar moderando sus precios a partir del año 2001.



**Figura 3.7 Gasto económico en tipo de tensioactivo consumido en España en el periodo 1993-2003.**

Otro aspecto importante a tener en consideración es que los tensioactivos no son consumidos por los usuarios finales como tales, sino que llegan al mercado como componente de una gran variedad de productos comerciales. Los sectores más íntimamente relacionados con los tensioactivos son los de la detergencia y la cosmética. La perfumería se relaciona como rama auxiliar de éstos y en menor proporción los sectores de la alimentación y de los fármacos. A título de ejemplo se muestra en la Figura 3.8 la evolución del consumo de detergentes y productos limpiadores en España desde 1993 hasta 2003. Se observa que el valor de la cantidad consumida ha aumentado desde los 1037 millones de euros del año 1993 hasta los 1450 millones de euros del año 2003. Con respecto a la cantidad consumida en peso, se observa una mayor oscilación, si bien el consumo ha subido a lo largo de dicho periodo pasando de 1631 millones de kg en 1993 a 2026 millones de kg en 2003.



**Figura 3.8 Consumo de detergentes y productos limpiadores en España en el periodo 1993-2003.**

Como conclusión se puede decir, que independientemente de los ciclos económicos, tanto el consumo de tensioactivos propiamente dicho como el de

productos detergentes y de limpieza han sufrido un considerable aumento durante los últimos años en España. Dentro del tipo de tensioactivo considerado, los tensioactivos catiónicos, no iónicos y anfotéricos cada vez se consumen más en detrimento de los aniónicos.

### **3.5. FORMULACIONES DETERGENTES**

La definición oficial de detergente, según la Norma ISO 862-1984 de la Organización Internacional de Normalización, es la siguiente: “Un detergente es un producto especialmente formulado para la limpieza mediante un proceso que desarrolle fenómenos de detergencia”. Según *García Domínguez 1986*, la detergencia es “el proceso por el cual las suciedades son separadas del sustrato sobre el que estaban retenidas y puestas en estado de disolución o dispersión”.

Un detergente está formado por uno o varios tensioactivos, que constituyen la materia activa, y por un conjunto de componentes complementarios: coadyuvantes (builders), aditivos y auxiliares de presentación o cargas (*García Domínguez 1986*, *Ochoa Gómez 1996*, *Novozymes A/S 2002c*). El resultado final es un producto que además de producir una limpieza eficiente, ejerce un efecto de protección sobre las superficies a las cuales se aplica y proporciona al objeto lavado una serie de características deseadas en cuanto a color, olor, tacto, etc.

Los tensioactivos o surfactantes son compuestos químicos con actividad superficial, por lo que se concentran en las interfases (aire/agua, agua/superficie) disminuyendo la tensión superficial del agua facilitando el mojado de la superficie por parte de la fase acuosa.

Los coadyuvantes son compuestos que mejoran o protegen la eficacia detergente del tensioactivo. Entre sus funciones están las siguientes:

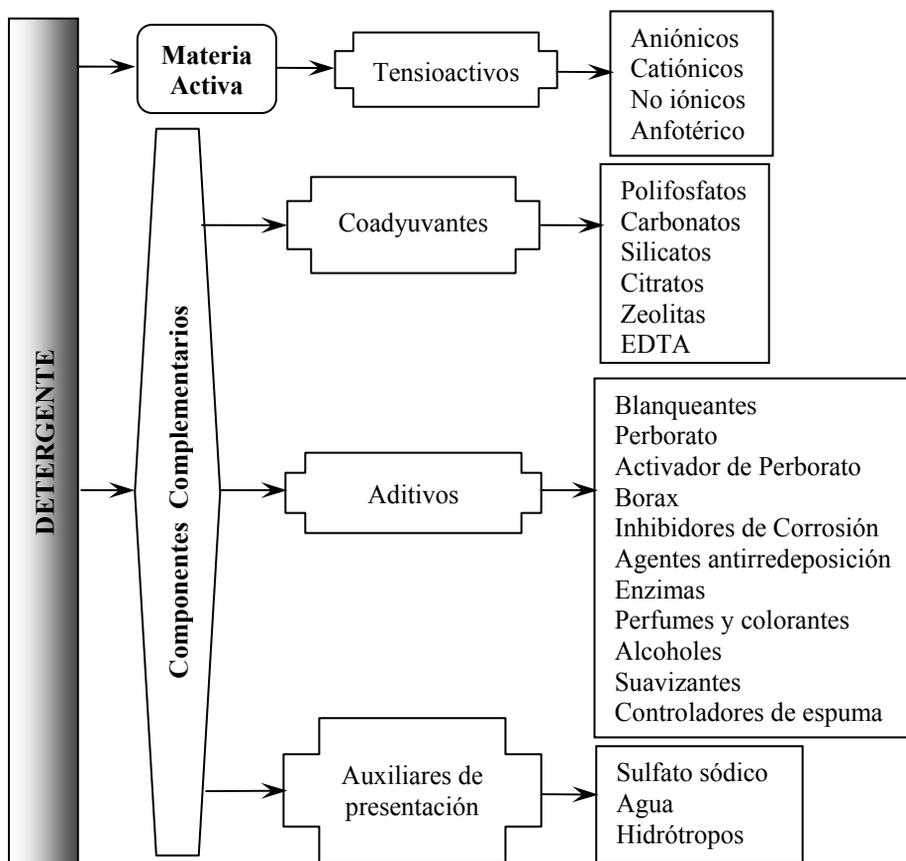
- Ablandar el agua de lavado, mediante precipitación, secuestro de iones metálicos e intercambio iónico.
- Actuar como emulsionante de la grasa y como dispersante de las partículas sólidas de la suciedad, impidiendo su redeposición.
- Proporcionar la alcalinidad adecuada para el lavado.
- Ejercer una acción sinérgica con los tensioactivos, mejorando el efecto de lavado.

Los aditivos son componentes complementarios de un detergente, que se incluyen en pequeñas concentraciones, y que aportan propiedades ajenas a la acción detergente específica.

Los auxiliares de presentación o cargas son generalmente sales inorgánicas o agua, que se añaden para ajustar el nivel de ingredientes activos por dosis recomendada, evitar el apelmazamiento de las partículas, mejorar las propiedades de escurrido, controlar la densidad, evitar la formación de polvo y aumentar la solubilidad y miscibilidad de todos los componentes.

Los principales componentes de la formulación de un detergente se recogen en la Figura 3.9.

Actualmente, la composición de los detergentes es una mezcla muy compleja de todos los componentes enumerados, siendo el número de formulaciones detergentes muy elevado, variando no sólo según su aplicación y forma de presentación (polvo, líquido, tabletas), sino también según la zona geográfica (las formulaciones varían según sean en Japón, Europa o EEUU) bien por su naturaleza (dureza del agua, posibilidad de secado al sol, etc.) o bien por los diferentes hábitos de las personas (*Novozymes A/S 2002c*).



**Figura 3.9 Componentes de las formulaciones detergentes.**

Según *García Domínguez, 1986* las formulaciones de uso más frecuente pueden incluirse en los cuatro grupos siguientes:

1. Detergentes para el lavado doméstico a máquina de prendas textiles, conocidos también como Heavy Duty Detergents.
2. Detergentes para lavado a mano de vajillas, llamados Light Duty Detergents. A veces se incluyen en este grupo ciertos detergentes destinados al lavado a mano de ropas delicadas o poco sucias.

3. Detergentes para limpieza de superficies duras que no sean las de los componentes de las vajillas.
4. Detergentes para máquinas lavavajillas automáticas.

En la Tabla 3.7 se recoge la composición aproximada de formulaciones de diversos detergentes utilizados en textiles y superficies duras (*Bailón Moreno 2003*). La composición de los detergentes para el lavado de superficies duras difiere de la de textiles debido a las distintas características que se le exigen a estos productos. Por ejemplo, en el caso de detergentes para lavavajillas automáticos, los residuos alimentarios (especialmente las suciedades de tipo proteico) generan espumas que causan la disminución de la presión de lavado y de la energía cinética de los chorros. De acuerdo con *Kissa 1987*, para evitar este efecto, los detergentes para lavavajillas están formados principalmente por coadyuvantes y tensioactivos con poder espumante reducido, tales como los no iónicos.

Producto	Composición
<b>Detergente textil lavadora</b>	Tensioactivos aniónicos, jabones, álcalis, secuestrantes, dispersantes, blanqueantes basados en oxígeno, activadores, blanqueantes ópticos, enzimas, colorantes, perfume, cargas.
<b>Suavizante textil</b>	Tensioactivos catiónicos, perfume, colorante.
<b>Lavavajillas manual</b>	Tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, conservante, perfume, colorante.
<b>Lipiahogar</b>	Tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, glicoles, secuestrantes, perfume, colorante.
<b>Limpiacristales</b>	Alcoholes, tensioactivos aniónicos, perfume
<b>Lavavajillas de máquina</b>	Tensioactivos no iónicos, álcalis, secuestrantes, dispersantes, oxidantes, colorantes.

**Tabla 3.7 Composición de algunos detergentes.**

### 3.5.1. Tensioactivos

Existen cuatro grandes grupos de tensioactivos según sea la naturaleza del grupo hidrofílico: Aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos.

#### 3.5.1.1. Tensioactivos aniónicos

Son tensioactivos que poseen uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga negativa que son responsables de la actividad superficial. A nivel mundial son sin duda alguna los más utilizados. En la Figura 3.10 se muestran las principales familias de tensioactivos aniónicos (*García Domínguez 1986*).

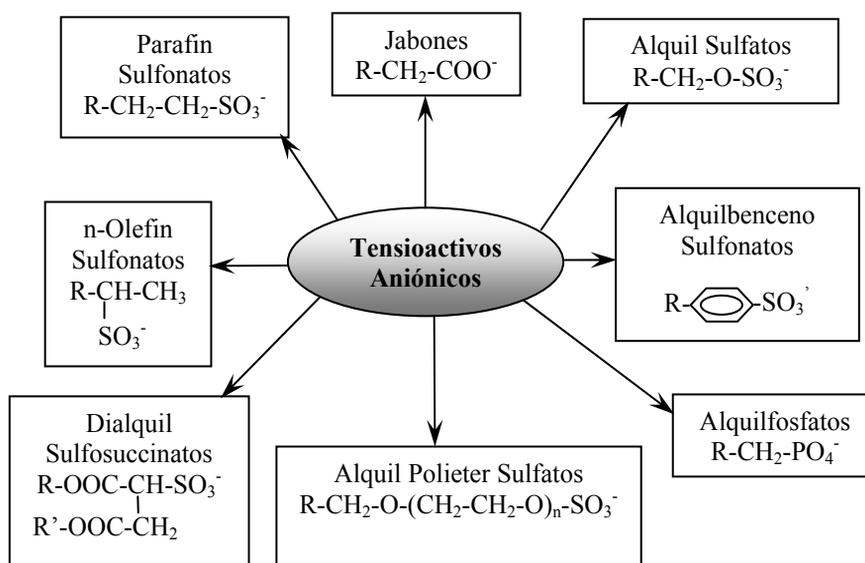
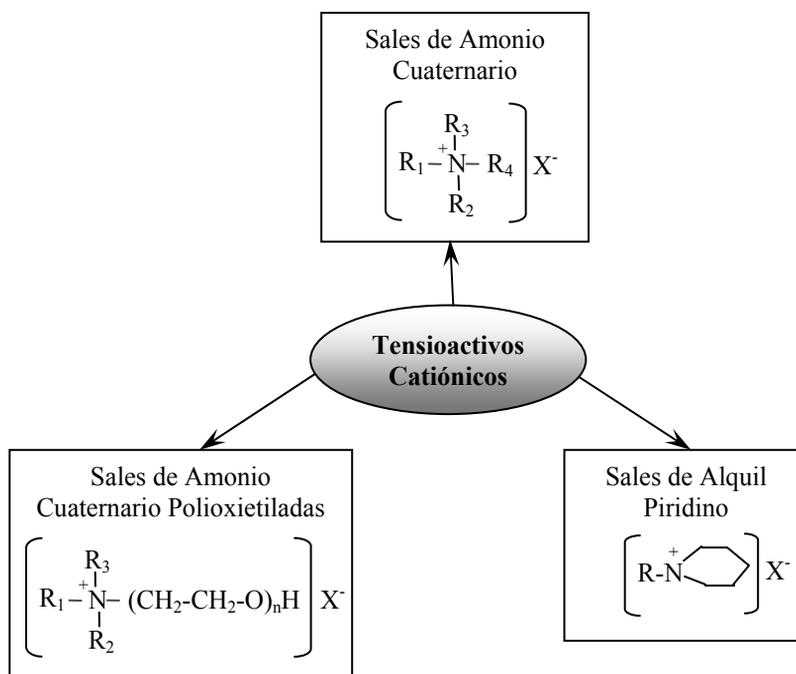


Figura 3.10. Principales familias de tensioactivos aniónicos.

Entre ellos destacan los alquilbenceno sulfonatos lineales (especialmente el dodecilbenceno sulfonato lineal), LAS, que representan más del 40% de todos los tensioactivos utilizados (*Scott y Jones 2000*). El LAS es el producto derivado de la sulfonación y posterior neutralización del alquilbenceno lineal, siendo la sal más comúnmente utilizada la sal sódica. Normalmente la cadena alquílica lineal tiene un número de átomos de carbono comprendido entre 11 y 14. Presenta la desventaja de que disminuye la actividad enzimática debido a las interacciones electrostáticas que pueden desnaturalizar la enzima, tal y como señalaron *Russell y Britton 2002*. Además este efecto se ve potenciado por la presencia de iones calcio provenientes de la dureza del agua (*Novozymes A/S 2002c*). Sin embargo, la presencia de iones calcio puede ser favorable en el caso de las  $\alpha$ -amilasas ya que estabilizan las estructuras secundarias y terciarias de la proteína frente a la desactivación térmica (*Rosendal y col. 1979, Violet y Meunier 1989, Tanaka y Hoshino 2002a*), si bien a concentraciones elevadas de calcio se produce una pérdida de actividad enzimática por inhibición competitiva apareciendo un punto de unión secundario del calcio a la enzima y que resulta ser coincidente con el sitio activo de la enzima. Esa estabilización de la estructura de la enzima a concentraciones no elevadas de ión calcio hace del calcio un estabilizante de las amilasas en formulaciones detergentes (*Upadek y Kottwitz 1997, Novozymes A/S 2002c*).

#### 3.5.1.2. Tensioactivos catiónicos

Son tensioactivos que poseen uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga positiva que son responsables de la actividad superficial. Estos tensioactivos debido a su carga positiva se adhieren o absorben fácilmente en la mayoría de las superficies sólidas (generalmente cargadas negativamente). Presentan el inconveniente de que son incompatibles con los tensioactivos aniónicos. Debido a su actividad antimicrobiana algunos son utilizados como agentes bactericidas y desinfectantes (*Stephan 1992, Yadav y Vyas 1999, Tatsumi y col. 2001*). En la Figura 3.11 se muestran las principales familias de tensioactivos catiónicos (*García Domínguez 1986*).



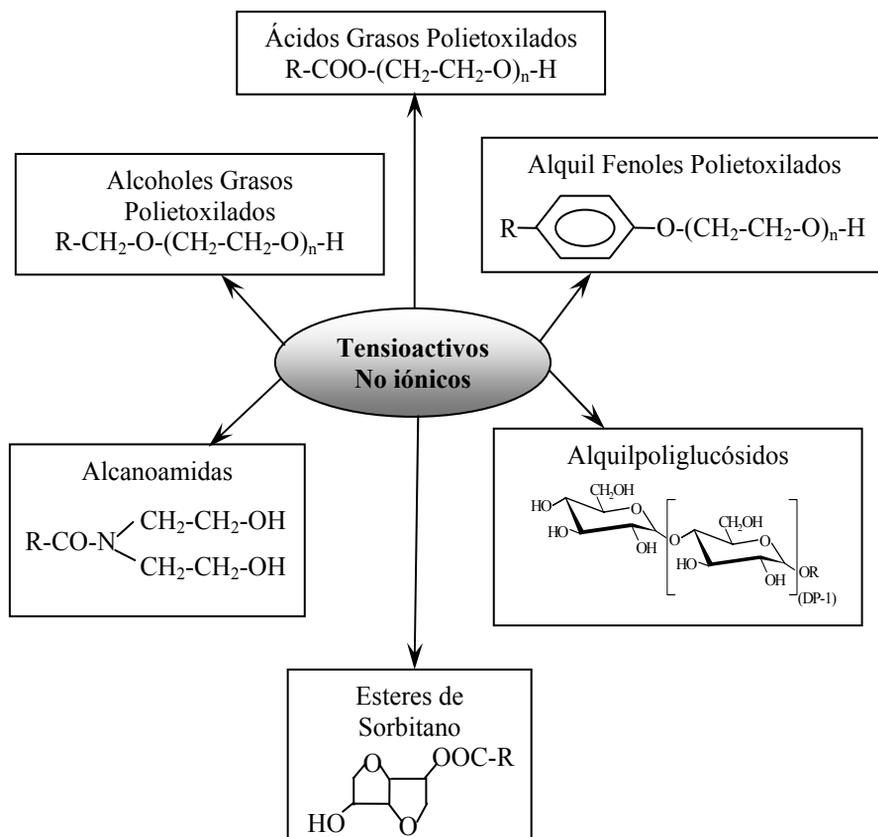
**Figura 3.11 Principales familias de tensioactivos catiónicos.**

### 3.5.1.3. Tensioactivos no iónicos

Son tensioactivos que no se disocian en disolución acuosa. Su hidrofilia proviene de la hidratación de los grupos polares presentes en la molécula (grupos hidroxilo, aminas o amida, éteres), siendo su solubilidad función de la relación existente entre el número de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Cuando el número de grupos polares es suficientemente alto en la molécula, su solubilidad en agua es comparable a la de los tensioactivos iónicos por formación de puentes de hidrógeno (*Gómez Antón 1996*).

En los últimos 40 años los tensioactivos no iónicos han ido ganado mayor importancia, hasta llegar al 35 % del mercado mundial que ocupan hoy día (*Fernández y col. 2004*). Tienen numerosas aplicaciones, destacando por ser buenos agentes humectantes y emulsionantes, siendo compatibles con todos los tipos de

tensioactivos y de un poder espumante reducido. Además son mucho menos sensibles que los tensioactivos aniónicos a la dureza del agua. La Figura 3.12 muestra las principales familias de tensioactivos no iónicos (García Domínguez 1986) a las que se han añadido los alquilpoliglucósidos.



**Figura 3.12 Principales familias de tensioactivos no iónicos.**

Otra propiedad a destacar de los tensioactivos no iónicos es que sufren el proceso de solubilidad inversa, es decir, son más solubles en frío que en caliente. A partir de una cierta temperatura se alcanza el punto de enturbiamiento (cloud point) en el que el tensioactivo se vuelve insoluble en el baño de lavado. Por tanto se

recomienda usar temperaturas de lavado justo por debajo del punto de enturbiamiento. Este punto generalmente disminuye al aumentar la concentración de tensioactivo (McFarland y Kinkel 1964).

#### 3.5.1.3.1. Alcoholes grasos etoxilados

Son el grupo de tensioactivos no iónicos más importante (Przondo 1996). Los alcoholes grasos etoxilados (FAEO) se obtienen a partir de alcoholes derivados principalmente del aceite de coco, de sebo, o sintéticos de cadena lineal, a los que se acopla un nivel dado de moles de óxido de etileno.

Las propiedades de estos tensioactivos varían según el número de unidades etoxi y el número de átomos de carbono de la cadena hidrofóbica. Generalmente los productos comerciales consisten en mezclas de varios homólogos con número de unidades etoxi diferentes, siendo el número de átomos de carbono en la cadena alquílica y el de unidades etoxi de entre 8 y 18, y entre 1 y 20, respectivamente. Recientemente se han introducido nuevos tipos de catalizadores en su fabricación consiguiendo un mejor control de la reacción lo cual ha permitido una distribución del unidades etoxi próximas entre si.

Los FAEO se degradan más fácilmente que los alquilfenoles polietoxilados (APE). Los APE no son tóxicos en si mismos, pero sus productos de degradación sí, especialmente los nonil y octil fenoles que presentan propiedades similares a las de los estrógenos lo que conlleva una disminución en la calidad del esperma de diferentes especies así como efectos carcinogénicos (Scott y Jones 2000). Es por ello que los FAEO se han convertido en una alternativa al empleo de APE.

Los FAEO están presentes en mayor o menor extensión en prácticamente todas las formulaciones detergentes actuales, tanto domésticas como industriales (Jakobi y Loehr 1987). Ello es debido a sus excelentes propiedades de lavado, buen precio, proceso de fabricación sencillo, estabilización de enzimas, buena solubilización de suciedades oleosas, etc.

Según *Harris y Brown 1950* los FAEO presentan mayor capacidad de solubilización de suciedades grasas que los tensioactivos aniónicos, favoreciendo la detergencia. Además también tienen una concentración micelar crítica inferior a la de los tensioactivos aniónicos, y el tamaño de las micelas aumenta de forma acusada con la temperatura.

Otro aspecto a reseñar es la capacidad que tiene los FAEO para interactuar con otros tensioactivos en los detergentes comerciales. *Aronson y col. 1983* observaron un efecto sinérgico negativo con respecto a la interacción con el tensioactivo aniónico LAS, de modo que su presencia puede inhibir la detergencia de suciedades grasas cuando en el baño de lavado se dispone de tensioactivos no iónicos eficaces.

En relación a su efecto sobre las enzimas *Russell y Britton 2002* indicaron que la presencia de alcoholes etoxilados estabilizaban proteasas en presencia de tensioactivos aniónicos como el LAS, impidiendo de esta forma la pérdida de actividad enzimática.

Con respecto a su biodegradabilidad, los FAEO puede ser eliminados de las aguas residuales mediante los procesos biológicos tradicionales o por procesos más avanzados como la ozonización (*Brambilla y col. 1993*) y la adsorción sobre carbón activo. La biodegradación primaria puede llegar a alcanzar valores superiores al 97 % (*Szymanski y col. 2000, Battersby y col. 2001*), aunque la degradación última puede ser significativamente inferior. *Siegfried y Baumann 1993* observaron que la facilidad de biodegradación de alcoholes etoxilados ramificados aumenta con el número de unidades etoxi en la molécula. Bajo condiciones anaerobias, la biodegradación de los FAEO presenta comportamientos diferenciados en función del número de moles de oxido de etileno y del tamaño de la cadena carbonada (*Mezzanotte y col. 2002*).

### 3.5.1.3.2. Alquilpoliglucósidos

Los alquilpoliglucósidos, APG, tienen un amplio abanico de aplicaciones, empleándose en cosmética, detergentes, productos de limpieza industrial y en productos para la agricultura (pesticidas).

El primer alquilglucósido, fue sintetizado por *Emil Fischer* en 1883 mediante el proceso conocido como glicosilación de Fischer. Sin embargo durante muchos años estos productos sólo tuvieron interés académico. La primera patente que describe el empleo de un alquilglucósido en detergentes fue presentada en Alemania unos 40 años más tarde. Sin embargo pasaron otros 40-50 años hasta que varias compañías se interesaron por los alquilpoliglucósidos y desarrollaron procesos comerciales para su fabricación (*von Rybinski y Hill 1998*).

En el curso de su desarrollo, los trabajos iniciales de Fischer en los que se hacía reaccionar glucosa con alcoholes como metanol, etanol, glicerol, etc., se aplicaron para hacer reaccionar alcoholes hidrofóbicos de cadenas alquílicas de  $C_8$  a  $C_{10}$ , los típicos alcoholes grasos. En los procesos industriales no se obtienen alquilmonoglucósidos puros sino una mezcla de mono-, di-, tri- y oligoglucósidos. Por eso estos productos reciben el nombre de alquilpoliglucósidos. Estos productos están caracterizados por la longitud de la cadena alquílica y por el grado de polimerización (DP) de la glucosa. Así para formulaciones detergentes suelen emplearse aquellos con una cadena alquílica de  $C_{12}$ - $C_{14}$  y un grado de polimerización alrededor de 1.42 (*von Rybinski y Hill 1998*).

Rohm & Haas (EEUU) fue la primera compañía en comercializar un alquilpoliglucósido con una cadena alquílica de  $C_8$ - $C_{10}$  a finales de los años 1970, seguida por BASF (Alemania) y posteriormente SEPPIC (Francia). Sin embargo debido a que sus prestaciones como tensioactivo no eran del todo satisfactorias por la corta longitud de la cadena alquílica, y debido también a su pobre calidad en cuanto a color, sus aplicaciones se quedaron reducidas a pequeños segmentos comerciales. Hace pocos años se mejoró la calidad de estos APG de  $C_8$ - $C_{10}$ , comercializándose hoy día por diversos fabricantes. A principios de 1980 se idearon programas para la

producción industrial de APGs de cadenas alquílicas largas,  $C_{12}$ - $C_{14}$ , para su uso en las industrias cosméticas y de detergentes. En 1998-1999 Henkel puso en marcha la primera planta piloto para su producción con una capacidad de 5000 Tm/año. En 1992 Henkel inaugura la primera planta industrial en EEUU, con una producción de 25000 Tm/año, y en 1995 abre una segunda planta de iguales características en Alemania, suponiendo el despegue comercial definitivo de estos productos (*von Rybinski y Hill 1998, Schmid y Tesmann 2001*).

Los alquilpoliglucósidos se obtienen por reacción mediante catálisis ácida de carbohidratos con alcoholes grasos. Actualmente se está investigando el empleo de enzimas en su síntesis pero todavía se encuentra en fase de laboratorio no habiéndose pasado aún a escala industrial. Por tanto los fabricantes se basan en la síntesis de Fischer para la fabricación de los APG. Hoy día es posible ajustar la cantidad de alquilmonoglucósidos y alquiloligoglucósidos jugando con las cantidades de glucosa y alcoholes grasos en la mezcla de reacción. Por tanto es posible fabricarlos con unas propiedades determinadas, como por ejemplo hidrofobicidad, sin necesidad de recurrir a procesos finales de purificación (*Schulz 1992*).

Con respecto a sus propiedades físico-químicas hay que destacar los siguientes puntos:

- Su concentración micelar crítica es comparable a la de los típicos tensioactivos no iónicos. La cmc desciende al aumentar la longitud de la cadena alquílica, siendo el efecto de dicha longitud mucho más fuerte que la influencia que pueda tener el grado de polimerización sobre la cmc (*von Rybinski y Hill 1998*).
- El incremento en longitud de la cadena alquílica aumenta la hidrofobicidad.
- Los APG presentan un efecto sinérgico con otros tensioactivos (*Andree y Middelhaue 1991*), especialmente los aniónicos (*Florescu y col. 1997*). Por ejemplo, al mezclar APG con tensioactivos aniónicos como

los alcoholes grasos sulfatados o alquilbencenos sulfonatos los valores de tensión superficial son muy similares a los de los APG a pesar de que se empleen altas concentraciones de tensioactivos aniónicos (*Nickel y col. 1992, Wüstneck y Wasow 1996*). Este comportamiento se corresponde con las observaciones encontradas en mezclas de tensioactivos aniónicos y no iónicos con cmc considerablemente diferentes (*Jost y col. 1988*). Según *Nieendick y Schmid 1995* los APG en combinación con tensioactivos aniónicos debido a un fuerte sinergismo mejoran las prestaciones de estos. La mejora de la eficacia de detergentes con tensioactivos aniónicos empleados en lavavajillas a los que se añade APG lleva al empleo de menores cantidades de tensioactivo y por tanto menor coste.

- Presentan una alta compatibilidad con electrolitos (*Helme y col. 1996*), siendo los únicos tensioactivos no iónicos que aportan buenas propiedades de mojado, tensión interfacial y emulsificación en estos sistemas (*Lachut 2001*).
- Son estables a pH alcalino (*Helme y col. 1996*).
- La adsorción de los tensioactivos sobre las superficies sólidas afecta directamente a los fenómenos de limpieza y lavado. La dependencia con la temperatura de la adsorción de APG sobre superficies sólidas es muy pequeña. En comparación los alcoholes grasos etoxilados incrementan notablemente su adsorción con la temperatura, especialmente a valores superiores a la temperatura del punto de enturbiamiento, cloud point (*von Rybinski y Hill 1998*).
- La temperatura del punto de enturbiamiento depende fuertemente de la longitud de la cadena alquílica, disminuyendo conforme aumenta ésta. Este efecto es mucho más acentuado que en otros tensioactivos como los alquilpoliglicol éteres (*Balzer 1993, von Rybinski y Hill 1998*). Análogamente, el grado de polimerización de las unidades de glucosa de

los APG también afecta fuertemente a la temperatura del punto de enturbiamiento (*Fukuda y col. 1993*). La adición de tensioactivos aniónicos igualmente influye en el punto de enturbiamiento. Así en presencia de pequeñas concentraciones de alquilsulfatos el punto de enturbiamiento aumenta de forma muy considerable (*Balzer 1993*).

- Los APG presentan una buena capacidad espumante (*von Rybinski y Hill 1998*). De acuerdo con *Sabahi 2004*, el poder espumante de los APG es superior al de los alcoholes grasos etoxilados y similar al del tensioactivo aniónico LAS, pareciendo estar relacionado con el grado de polimerización de las unidades de glucosa. Según *von Rybinski y Hill 1998* el volumen de espuma producido aumenta con el incremento en el porcentaje de cadenas alquílicas de menor longitud.

Con respecto a consideraciones medioambientales los APG son muy biodegradables tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (*Madsen y col. 1996, Helme y col. 1996, García y col. 1997, Scott y Jones 2000, Mezzanotte y col. 2003*), degradándose muy rápidamente en el medio ambiente (*von Rybinski y Hill 1998*). Según *Madsen y col. 1996* en sistemas de tratamiento de aguas residuales, en tratamientos aeróbicos los APG lineales se biodegradan al 100 % mientras que en anaeróbicos se mineralizan por encima del 70 %; en el caso de APG ramificados no se degradan en condiciones anaerobias y los alcoholes grasos etoxilados en estas condiciones lo hacen sólo de forma parcial. Teniendo en cuenta la toxicidad sobre microorganismos acuáticos *Madsen y col. 1996* establecen el siguiente orden de menor a mayor ecotoxicidad para APGs y FAEO: APG ramificados < APG lineales < FAEO.

Tras haber sometidos a test de toxicidad aguda, se considera que los APG no son productos potencialmente tóxicos ni peligrosos para las personas, siendo improbables problemas de sensibilización (*von Rybinski y Hill 1998*). Dermatológicamente constituyen un grupo de tensioactivos de efectos muy suaves siendo más compatibles con la piel que los tensioactivos aniónicos, produciendo por

tanto una menor irritación (*Andree y Middelhaue 1991, Nieendick y Schmid 1995, von Rybinski y Hill 1998*).

Las aplicaciones de los APG son muy numerosas. A continuación se enumeran algunas ellas:

- Preparación de microemulsiones: Según *von Rybinski y Hill 1998* es de esperar que en las emulsiones con alquilpoliglucósidos la inversión de fases no sea dependiente de la temperatura, a diferencia de los alcoholes grasos etoxilados en cuyas emulsiones es bien conocido el fenómeno de inversión de fases por la temperatura. Si comparamos los APG con los tensioactivos aniónicos, en contraste con éstos las emulsiones con alquilpoliglucósidos tampoco se ven apenas afectadas por la presencia de electrolitos (*Balzer 1991*)
- Detergentes y productos de limpieza (*von Rybinski y Hill 1998*):
  - Debido a su sinergismo con otros tensioactivos aniónicos como los alquilbenceno sulfonatos, alcano sulfonatos secundarios y alcoholes grasos sulfatados es posible obtener productos de mayor eficacia para la misma concentración de materia activa o reducir la cantidad necesaria de ésta sin afectar al rendimiento esperado.
  - Los APG también mejoran las propiedades espumantes de los detergentes lavavajillas obteniendo unas espumas elásticas las cuales no se ven afectadas por la naturaleza de la suciedad. Aunque el volumen de espuma y su estructura en el licor de lavado de vajillas no determina el rendimiento del detergente, el consumidor asocia la persistencia de la espuma a una buena capacidad de limpieza determinando este hecho un criterio para su compra.
  - Debido a la gran variedad de tipos de suciedades que pueden encontrarse, los productos de limpieza multiusos deben de ser

eficientes a la hora de emulsionar grasas y dispersar partículas sólidas. Los APG han demostrado tener unas magníficas propiedades al respecto siendo altamente eficaces.

- La capacidad solubilizante de los APG permite disminuir la cantidad de agentes hidrótrofos necesaria en detergentes líquidos para ropa.
  - Según *Elsner y col. 2002* las superficies de plástico limpiadas con alquilpoliglucósidos sufren menos roturas por estrés que las que se han limpiado con otros tensioactivos, disolventes y productos de limpieza comerciales.
  - A la hora de mejorar la estabilidad de las enzimas (proteasas, lipasas, amilasas y celulasas) en los detergentes líquidos durante su almacenamiento se suelen añadir como estabilizantes boratos, fosfatos y esteres especiales. Los APG también son capaces de aumentar esa estabilidad de la enzima con la ventaja añadida de conseguir una mayor eficacia de lavado.
- Productos para el cuidado personal:
    - La adición de APG modifica las propiedades reológicas de mezclas tensioactivas concentradas, de modo que es posible bombear estas mezclas concentradas con porcentajes de sustancias activas superiores al 60 %.
    - Formulaciones de champús para el cuidado de cabellos dañados debido a su carácter suave.
    - Jabones líquidos para las manos por su compatibilidad dermatológica.

- Los APG potencian el efecto bactericida de agentes antibacterianos.

#### **3.5.1.4. Tensioactivos anfotéricos**

Los tensioactivos anfotéricos se ionizan en disoluciones acuosas formando tanto cationes como aniones según el pH del medio. Presentan baja sensibilidad a la dureza del agua, buena compatibilidad con electrolitos y demás tensioactivos, buen poder de limpieza, buen poder espumante, no son irritantes de la piel, etc. Entre otros grupos podemos destacar los ácidos-n-alkil- $\beta$ -aminopropiónicos, las acuilimidazolininas, las n-alkilbetainas y n-alkilsulfobetainas (*García Domínguez 1986*). Estos tensioactivos como la cocamidopropil betaina (CAPB) han sido ampliamente utilizados como tensioactivos secundarios en formulaciones cosméticas, adquiriendo recientemente un mayor interés para formulaciones de detergentes lavavajillas y limpiadores multiusos (*Leidreiter y col. 1997*).

#### **3.5.2. Las enzimas en la industria de los detergentes**

El uso de enzimas en las formulaciones para detergentes comenzó lentamente a principio de los años 30, basándose en una patente que utilizaba enzimas pancreáticas para disoluciones de prelavado (*Röhm 1913*). Estas enzimas pancreáticas incluían proteasas (tripsina y quimotripsina), carboxipeptidasas,  $\alpha$ -amilasas, lactasas, maltasas y lipasas. Sin embargo no será hasta los años 60 cuando se vuelvan a emplear proteasas, esta vez de origen bacteriano, a gran escala en la producción de detergentes. Se pretendía eliminar aquellas manchas que contenían proteínas insolubles (sangre, mucosidades, hierba, carne,...). La primera enzima empleada para ello fue la denominada Alcalase<sup>®</sup>, de la casa Novo Nordisk. A partir del año 1965 los principales fabricantes de detergentes incorporaron estas enzimas en sus formulaciones, con lo que la adición de proteasas bacterianas en los detergentes se convirtió en la principal aplicación de las enzimas producidas industrialmente, constituyendo una fuente de negocio que proporcionó grandes beneficios (*van Ee 1997, Olsen y Falholt 1998*).

Sin embargo un hecho vino a llamar la atención acerca del potencial peligro que suponía emplear proteasa en polvo como aditivo, ya que se dieron casos de asma alérgica entre los obreros de una fábrica de EEUU, al parecer por inhalación de la enzima. La producción de este tipo de detergentes quedó paralizada, mientras se evaluaban los potenciales riesgos de los mismos para el consumidor. Finalmente se eliminó el peligro de inhalación al preparar el producto en forma de granulado, con lo que recuperaron su posición en el mercado (*van Ee 1997*).

Hoy día las enzimas más utilizadas en las formulaciones de detergentes son las hidrolasas, las cuales eliminan manchas producidas por proteínas, lípidos y polisacáridos. Dentro de estas hidrolasas también hay que tener en cuenta a las celulasas, las cuales mantienen la calidad de los tejidos mediante reacciones selectivas. Actualmente la investigación se encamina hacia la posibilidad de empleo de enzimas redox, oxidasas y peroxidasas, como sustitutivos de lejías y otros oxidantes para lavar objetos coloreados (*Conrad y col. 1997*).

El mercado de las enzimas para detergentes siempre ha tenido periodos de rápido crecimiento en respuesta a la introducción de nuevos avances tecnológicos. Inicialmente el crecimiento rápido vino por la introducción de las proteasas; más recientemente el crecimiento vino por la inclusión de celulasas y lipasas (*Houston 1997*). Así, para mantener las 18-19 millones de toneladas por año que se consumieron de detergentes para ropa en 1995, el consumo mundial de enzimas en detergentes reportó unos beneficios de unos 500 millones de dólares (*Krawczyk 1997*). Este mercado de enzimas estuvo en continuo crecimiento durante la década de 1990 (Figura 3.13) (*Axelsen y col. 1999*), y se espera que siga creciendo de forma relajada hasta la aparición de una nueva serie de innovaciones en las enzimas lo que propiciará un nuevo aceleramiento en su consumo (*Houston 1997*).

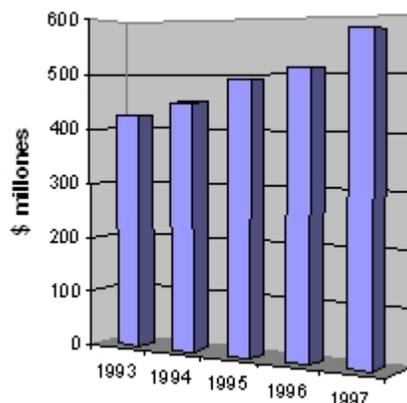


Figura 3.13. Consumo de enzimas en detergentes

Por último indicar que los principales fabricantes de enzimas a nivel mundial son Novozymes A/S (Dinamarca) y Genencor International Inc. (EEUU), los cuales abarcan más del 90 % del mercado de enzimas para detergentes (*Olsen y Falholt 1998*).

#### 3.5.2.1. Enzimas para formulaciones detergentes

A lo largo de los años las enzimas han constituido un factor muy importante en el desarrollo y mejora de los detergentes. Su empleo ha reportado una serie de ventajas:

- Ahorro en el consumo energético y de agua al hacer posible el uso de temperaturas de lavado más bajas.
- Permiten sustituir o reducir el contenido de otros componentes de los detergentes, más nocivos desde el punto de vista medioambiental.
- Son biodegradables, por lo que no dejan residuos peligrosos.

- Se obtienen a partir de fuentes renovables, lo cual también es positivo ecológicamente.
- No afectan negativamente a los tratamientos de aguas residuales y no representan riesgos para la vida acuática.

A continuación se describirá brevemente que tipos de enzimas se utilizan hoy día en las formulaciones detergentes.

#### 3.5.2.1.1. Proteasas

Las proteasas son las enzimas más ampliamente utilizadas en los detergentes. En los detergentes para la ropa su acción proteolítica sirve para eliminar manchas de hierba, sangre, huevo, sudor y cualquier tipo de proteínas insolubles. En el caso de los detergentes para lavavajillas, se aseguran la eliminación de películas de naturaleza proteica que se adhieren a las superficies de los objetos de cristal y de la cubertería, y que en general son difíciles de eliminar. La familia de las proteasas más empleada en detergentes es la de las serinas y dentro de ellas la enzima de mayor importancia con diferencia es la subtilisina (Egmond 1997, Olsen y Falholt 1998).

#### 3.5.2.1.2. Amilasas

El almidón no gelatinizado (hinchado) sólo es hidrolizado (y de forma lenta) por la acción de las  $\alpha$ -amilasas. Como ya se ha comentado, es preciso el hinchamiento y gelatinización del almidón para que sea susceptible de hidrólisis enzimática (dando lugar a dextrinas y oligosacáridos solubles en agua). En la mayoría de los alimentos el grado de gelatinización es muy variado como consecuencia de su forma de elaboración en la cocina. Por tanto, el empleo de  $\alpha$ -amilasas en las formulaciones detergentes facilita la eliminación de suciedad proveniente de la pasta, del chocolate, de los alimentos infantiles, etc. Las  $\alpha$ -amilasas más utilizadas son las de origen bacteriano, por ser termoestables, especialmente las del *Bacillus licheniformis* (Upadek y Kottwitz 1997, Olsen y Falholt 1998).

Estas enzimas también previenen la adhesión del almidón hinchado sobre la superficie de los tejidos y de la vajilla, evitando que éste actúe como pegamento para la adhesión de otras partículas sólidas después del lavado (*Pramod y col. 1997*). Se ha demostrado que este tipo de manchas una vez formadas son más difíciles de eliminar que sólo las de almidón. Como consecuencia de ellas las prendas se van volviendo más grises tras varios ciclos de lavado (*Gibson 1998*). Se piensa que la amilosa es la responsable de la formación de esas películas de adhesión. La aparición de éstas se ve favorecida en las condiciones de lavado empleadas en Europa ya que usan temperaturas próximas a la de gelatinización del almidón.

Otro aspecto a tener en consideración es la posibilidad de que la suciedad que ha sido eliminada de la superficie manchada puede volver a depositarse sobre ella. Este fenómeno se conoce como redeposición, el cual produce un descenso significativo en el rendimiento del proceso de lavado. El empleo de enzimas en las formulaciones detergentes ayuda a evitar este fenómeno (*Gibson 1999*). En concreto las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan las cadenas de almidón dando lugar a cadenas más cortas y solubles previniendo su redeposición.

#### 3.5.2.1.3. Celulasas

Las celulasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos de la celulosa. Actúan sobre las fibras de algodón natural, las mezclas de algodón y lino y sobre la fracción celulósica de las fibras sintéticas de la ropa. Su función en los detergentes es recuperar y mantener nítidos los colores de las prendas, mantener su superficie lisa y preservar su suavidad (*Kottwitz y Upadek 1997*). También contribuyen a eliminar las partículas sólidas adheridas a los tejidos (*Baas y col. 1997*).

#### 3.5.2.1.4. Lipasas

Debido a su gran hidrofobia, las grasas y aceites (triglicéridos) son difíciles de eliminar a bajas temperaturas. Las lipasas presentes en los detergentes hidrolizan

los triglicéridos dando mono y diglicéridos (los cuales son más solubles al ser más hidrofílicos), ácidos grasos libres y glicerina. Estos productos son todos ellos solubles en disoluciones alcalinas. El aumento de la solubilidad de los productos de la reacción con respecto a las grasas y aceites originales facilita la eliminación de estas suciedades. Es de reseñar el hecho de que a pH superiores a 8 la reacción de hidrólisis se favorece por la presencia de pequeñas cantidades de iones  $\text{Ca}^{2+}$  libres debido a la formación de jabones, aunque sin embargo las lipasas siguen siendo efectivas incluso a bajos niveles de iones calcio (*Wolff y Showell 1997, Olsen y Falholt 1998*).

#### 3.5.2.1.5. Enzimas Redox

Actualmente se está investigando el empleo de oxidasas y peroxidasas como parte de nuevos sistemas blanqueantes. Además de sustituir a los agresivos agentes blanqueantes químicos también presentan la ventaja que podrían ejercer su acción a temperaturas de lavado inferiores. Esto reduciría considerablemente el gasto energético (*Damhus y col. 1997*).

#### 3.5.2.2. Aplicaciones de los detergentes enzimáticos

Los detergentes enzimáticos basan su acción en la eliminación de las manchas por la acción combinada del trabajo mecánico y la actuación de tensioactivos, “builders” y enzimas. Las proteasas alcalinas, las amilasas y las lipasas presentes en los detergentes de alta carga hidrolizan y solubilizan la suciedad adherida. Las celulasas hidrolizan enlaces glicosídicos eliminando partículas adheridas a las microfibras de los tejidos de algodón. Los tensioactivos reducen la tensión superficial en las interfases y aumentan la fuerza repulsiva entre la suciedad original, la suciedad enzimáticamente degradada y el material sobre el que están adheridas. Los “builders” actúan como agentes quelantes, precipitando o produciendo un intercambio iónico con las sales de calcio y magnesio, previniendo la redeposición de la suciedad, tamponando el medio e inhibiendo la corrosión (*Olsen y Falholt 1998*).

#### 3.5.2.2.1. Detergentes para ropa

Antes de la introducción de las formulaciones modernas en los detergentes, el jabón y el carbonato sódico eran los principales constituyentes de los detergentes y el efecto de limpieza dependía principalmente de la acción mecánica. La aparición de las lavadoras automáticas trajo consigo una reducción considerable en el consumo de productos químicos. En el periodo de 1967 a 1970 se consiguió un ahorro energético del 40 % al introducirse las formulaciones enzimáticas. En 1969, al menos el 50 % de los detergentes europeos contenían enzimas proteolíticas, lo que conllevó al reseñado ahorro energético. Posteriormente se incorporaron otras enzimas como las amilasas, lipasas y celulasas. Las temperaturas de lavado se fueron reduciendo progresivamente de 95 °C a 60 °C y finalmente incluso a 40 °C. Además los prelavados fueron eliminados (*Olsen y Falholt 1998*).

#### 3.5.2.2.2. Detergentes para la vajilla

En el lavado manual, la eliminación de los residuos de la comida depende principalmente de los tensioactivos y del trabajo mecánico. En los lavavajillas automáticos, la limpieza depende de todos y cada uno de los componentes del detergente, de la temperatura y del trabajo mecánico. El principal problema se presenta cuando se forman películas adheridas a las superficies, debido a que los residuos se han secado o incluso quemado formando complejas sustancias compuestas de proteínas, carbohidratos y lípidos. Éstas requieren tratamiento hidrolítico para su degradación y disolución.

La combinación de cortos periodos de lavado, alta temperatura y la necesidad de evitar el ataque sobre los objetos de la vajilla demanda el uso de productos químicos con propiedades especiales. Son necesarias sustancias oxidantes altamente alcalinas para asegurar la hidrólisis y la oxidación de la suciedad y permitir así su eliminación dispersándola en la solución de lavado sin producir espumas. La eliminación de los iones que dan dureza al agua y que producirían incrustaciones también es necesaria, así como agentes de protección para el cristal y las decoraciones de la vajilla. Por tanto antes de la introducción de los detergentes enzimáticos, la

composición de los detergentes para lavavajillas europeos era altamente alcalina (pH = 12-12.5 en una disolución al 1%), contenían fuertes agentes complejantes (trifosfato sódico, metasilicato sódico y carbonato sódico) y oxidantes (di o tricloroisocianatos). La introducción de enzimas en estas formulaciones (amilasas y proteasas) ha hecho posible reemplazar muchos de estos agresivos compuestos oxidantes y alcalinizantes, dando lugar a productos menos contaminantes (*Olsen y Falholt 1998*).

#### 3.5.2.2.3. Detergentes para la industria alimentaria

Durante muchos años se han venido utilizando las proteasas como componentes minoritarios de las formulaciones detergentes empleadas en la limpieza de plantas de osmosis inversa. Actualmente también se usan para la limpieza de procesos de microfiltración y ultrafiltración con membranas empleados en las industrias cerveceras, lácteas y de zumos.

Otra aplicación de estas enzimas está en su empleo en los sistemas CIP (cleaning in place) para la limpieza de las plantas de elaboración de los alimentos. En los sistemas CIP convencionales primero se produce una limpieza con una disolución 0.5-1 % de NaOH (la cual puede llevar añadidos tensioactivos y EDTA) a 75 – 85 °C seguido de un enjuague con una disolución 0.5-1 % de HNO<sub>3</sub> (también puede llevar tensioactivos). En las industrias lácteas la suciedad más difícil de eliminar es la “leche quemada” adherida a la superficie de los intercambiadores de calor o de los evaporadores. Esta suciedad presenta una estructura de gel y esta compuesta por una mezcla compleja entre proteínas, lactosa y grasa, formada por reacciones de Maillard entre ellas. En estos casos sistemas CIP enzimáticos basados en el empleo de proteasas y lipasas se ha comprobado que son efectivos en la limpieza de módulos de ultrafiltración con membranas spiral-wound, las cuales son muy sensibles a compuestos químicos agresivos y que por lo tanto son difíciles de limpiar con los sistemas tradicionales. Por tanto podrían aplicarse también esos CIP enzimáticos para la limpieza de los equipos de intercambio de calor (*Olsen 1997*).

### 3.5.2.3. Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática

La hidrólisis enzimática en presencia de tensioactivos puede ser influenciada por la interacción del tensioactivo tanto con la enzima como con el sustrato de la reacción.

Es conocido que muchos tensioactivos, que interaccionan con proteínas, pueden presentar en su estructura distintas cargas eléctricas y diferentes grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, que alteran las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas (Fendler y Fendler 1975). En particular muchas enzimas son inestables en disoluciones de tensioactivos aniónicos tales como el sodio dodecil sulfato (SDS) produciéndose una apertura de su estructura globular, si bien algunas, a pesar de que se desnaturalizan, lo hacen en mucho menor grado siendo más estables, como sucede en el estudio realizado por (Isemura y Takagi 1959) con  $\alpha$ -amilasa de *Aspegillus oryzae* en presencia de SDS.

También es conocido que la amilosa mayoritariamente y en menor medida la amilopectina son capaces de interaccionar con tensioactivos dando lugar a complejos de inclusión (Moulik y Gupta 1979, Hui y col. 1983, Svensson y col. 1996, Lundqvist y col. 2002a, Tanaka y Hoshino 2002b, Lundqvist y col. 2002b, Lundqvist y col. 2002c, Hoshino y Tanaka 2003). Kim y Robinson 1979 estudiaron el efecto de diferentes tensioactivos sobre la capacidad de la amilosa para formar complejos con el yodo y sobre la hidrólisis de amilosa con  $\beta$ -amilasa. Comprobaron que se formaban complejos de inclusión con los tensioactivos que impidieron la formación del complejo yodo-amilosa; además los complejos con tensioactivo dificultaron la hidrólisis ya que estos sólo son hidrolizables parcialmente (dieron un rendimiento menor en maltosa).

La formación de micelas también afecta a la cinética de las enzimas. Tanaka y Hoshino 2002b comprobaron que la velocidad de hidrólisis de amilosa con  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amilyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* variaba en presencia de SDS, aumentando la velocidad de reacción a concentraciones inferiores a

la concentración micelar crítica del tensioactivo y disminuyendo por encima de ésta (el efecto sobre la enzima de *Bacillus licheniformis* fue menos acusado que sobre la de *Bacillus amyloliquefaciens*). Por tanto se consideró que las moléculas no agregadas de SDS aceleraron la hidrólisis debido a su interacción con la amilosa y con la  $\alpha$ -amilasa, mientras que las moléculas de SDS agregadas en forma de micelas inhibieron la reacción; se demostró que el aumento de la velocidad de reacción se debía a que la presencia de SDS a concentraciones inferiores a la micelar crítica favorece la formación del complejo enzima-sustrato, lo cual se reflejó en valores de  $K_M$  menores con SDS que en su ausencia, sin que hubiera modificación de la constante cinética  $k$ .

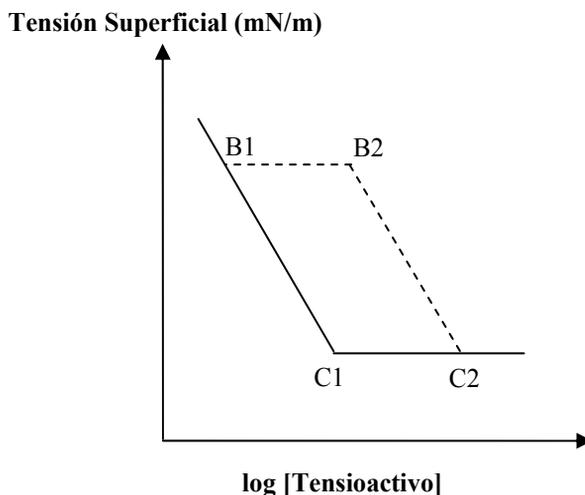
Por otra parte algunas enzimas son más estables en presencia de tensioactivos no iónicos que en presencia de tensioactivos aniónicos. La formación de micelas de tensioactivos aniónicos puede alterar la conformación de la proteína debido a la existencia de fuertes interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las micelas y las proteínas (Montserret y col. 2000, Hagihara y col. 2002). Por el contrario los tensioactivos no iónicos no alteran la conformación de la proteína ya que están libres de cualquier interacción electrostática (Russell y Britton 2002), y lo que es más algunos tensioactivos no iónicos han aumentado la actividad catalítica de enzimas, tal es el caso de los resultados publicados por Martinek y col. 1986 y por Hoshino y Tanaka 2003. Estos últimos estudiaron el efecto de un tensioactivo no iónico, el polioxietilen mono-N-dodecil éter (Brij 35), sobre la hidrólisis enzimática de amilopectina de patata con una  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* y encontraron que la velocidad de reacción se aceleraba al añadir el tensioactivo a concentraciones superiores a su concentración micelar crítica, debido a un aumento en la constante cinética  $k$  al aumentar la concentración de tensioactivo, mientras que  $K_M$  permaneció invariable; por otro lado las moléculas de tensioactivo no agregadas no aumentaron la velocidad de reacción. Comprobaron que la amilopectina se ligaba al tensioactivo y que la enzima se unía a las micelas de éste, de tal modo que el aumento de  $k$  sugería que la catálisis era más eficiente en la pseudofase micelar que en la pseudofase acuosa lo cual se atribuyó a la elevada concentración de enzima y amilopectina en la pseudofase micelar. Por su parte Russell y Britton 2002 indicaron que la presencia de alcoholes etoxilados estabilizaban proteasas en presencia de

tensioactivos aniónicos como el LAS, impidiendo de esta forma la pérdida de actividad enzimática. Finalmente *von Rybinski y Hill 1998* señalan la capacidad que tienen los alquilpoliglucósidos para aumentar la estabilidad de las enzimas (proteasas, lipasas, amilasas y celulasas) en formulaciones detergentes líquidas impidiendo la pérdida de actividad por parte de éstas durante su almacenamiento.

### **3.6. INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO**

#### **3.6.1. Estudio de las interacciones mediante medidas de tensión superficial**

Una forma de estudiar la interacción entre el almidón y los tensioactivos es desde el punto de vista de la interacción entre un polímero y un tensioactivo. La medida de la tensión superficial se ha aplicado en el estudio de estas interacciones polímero-tensioactivo (*Jones 1967, Goddard 1986a, Goddard 1986b*). Cuando la tensión superficial de una disolución de tensioactivo es alterada por la presencia de un polímero, especialmente cuando el polímero no tiene actividad superficial propia, se puede asumir que se debe a la formación de un complejo entre ambos. Comparando tensiones superficiales de disoluciones de tensioactivo con y sin polímero es posible determinar la capacidad que tiene un polímero de ligar un determinado tensioactivo. En la Figura 3.14 se muestra, de acuerdo al enfoque clásico de *Jones 1967* descrito por *Goddard 1986a*, la modificación teórica de la representación de la tensión superficial frente a la concentración de tensioactivo al formar un complejo con un polímero.



**Figura 3.14. Representación teórica de la tensión superficial frente a concentración de tensioactivo con y sin polímero.**

Los tensioactivos en disolución presentan una tendencia característica a representar la tensión superficial frente a su concentración, de forma que aquella desciende gradualmente hasta alcanzar la concentración micelar crítica, cmc (C1 en la figura), manteniéndose constante a partir de ese momento para cualquier concentración de tensioactivo superior a ésta. En presencia de un polímero, a partir de un determinado valor de concentración de tensioactivo éste se une al polímero, punto B1, al que corresponde la concentración crítica de asociación, cac, que es el valor límite mínimo de concentración de tensioactivo necesaria para que se produzca la interacción entre el polímero y el tensioactivo; cac es una medida de la fuerza de la interacción. A partir de B1 y mientras continúa uniéndose tensioactivo la tensión superficial se mantiene constante hasta que el polímero se satura en tensioactivo (punto B2). A concentraciones de tensioactivo superiores al punto B2 la tensión superficial vuelve a descender hasta alcanzar un valor igual al que correspondía a la cmc a partir del cual se mantiene constante (punto C2), pues se empiezan a formar las micelas de tensioactivo.

Según *Goddard 1986a* los factores que afectan a la formación del complejo polímero-tensioactivo son:

- Temperatura: Un aumento de temperatura dificulta la formación del complejo produciéndose un aumento en la concentración crítica de asociación,  $B1$ .
- Sales: La presencia de sales produce una disminución de  $B1$ , es decir favorece la formación del complejo. También produce un aumento de la cantidad de tensioactivo que es capaz de ligar el polímero.
- Longitud de cadena del polímero: *Lange 1971 Arai y col. 1971 Shirahama y Ide 1976* comprobaron que en el caso de alquilsulfatos, para una cantidad fija de polímero,  $B1$  disminuye conforme aumenta la longitud de cadena del tensioactivo, del mismo modo que lo hace la cmc en una serie homóloga de tensioactivos, existiendo una relación lineal entre  $\log B1$  y  $n$  (número de carbonos de la cadena alquílica) al igual que sucede para la cmc.
- Estructura y tipo de tensioactivo.
- Peso molecular del polímero: Es necesario un peso molecular mínimo para que se produzca la interacción.
- Cantidad de polímero: la concentración a la que el polímero se satura en tensioactivo,  $B2$ , aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración de polímero (aumenta el número de puntos de unión); por tanto la constancia del valor de la tensión superficial al comienzo de la región de unión es más evidente a altas concentraciones de polímero. Por su parte  $B1$  varía muy poco con la concentración de polímero, pudiendo considerarse prácticamente independiente de ésta

especialmente en presencia de sales, las cuales atenúan aún más su efecto.

- Estructura del polímero e hidrofobicidad: La capacidad de interacción del polímero está relacionada con su hidrofobicidad. Cuanto más hidrofóbico sea el polímero más capacidad tiene de interaccionar con el tensioactivo. Con respecto a la estructura, cuanto más flexible sea ésta también será mayor la facilidad para interaccionar.

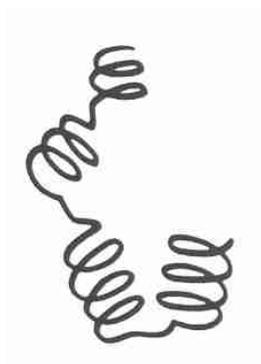
A la hora de calcular la cantidad de tensioactivo ligado *Goddard 1986a* propone utilizar la diferencia de concentraciones entre C2-C1 o entre B2-B1. En este último caso, a no ser que se trabaje a elevadas concentraciones del polímero, es difícil que el tramo B2-B1 sea suficientemente extenso; además existe la posibilidad de que el polímero adquiera cada vez mayor actividad superficial conforme se va ligando más tensioactivo hasta llegar a la saturación; como consecuencia no se distinguiría bien cuando se produce ésta y por tanto es difícil hallar el punto B2. También es posible que la interacción entre el polímero y el tensioactivo sea muy fuerte por lo que B1 sea muy pequeña y no pueda establecerse con precisión experimentalmente. Por otro lado *Svensson y col. 1996* encontraron que para la interacción entre sodio dodecil sulfato y amilosa de patata se formaba el complejo pero las concentraciones micelares críticas con y sin amilosa eran iguales, es decir C1 y C2 coinciden, por lo que en ese caso habría que recurrir a la diferencia B2-B1 para calcular el tensioactivo que es capaz de ligar la amilosa.

La amilosa mayoritariamente y en menor medida la amilopeptina son capaces de interaccionar con tensioactivos dando lugar a complejos de inclusión (*Kim y Robinson 1979, Moulik y Gupta 1979, Hui y col. 1983, Svensson y col. 1996, Lundqvist y col. 2002a, Tanaka y Hoshino 2002b, Lundqvist y col. 2002b, Lundqvist y col. 2002c, Hoshino y Tanaka 2003*).

*Moulik y Gupta 1979* estudiaron la influencia de tensioactivos aniónicos (SDS), catiónicos (bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB) y no iónicos (para-tert-alquilfenoxipoli-oxietilén éter, Triton X-100) sobre la estabilidad del complejo yodo-

amilosa, concluyendo que todos ellos desestabilizaban dicho complejo. *Kim y Robinson 1979* obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de diferentes tensioactivos sobre la capacidad de la amilosa para formar complejos con el yodo. Comprobaron que se formaban complejos de inclusión con los tensioactivos que impedían la formación del complejo yodo-amilosa.

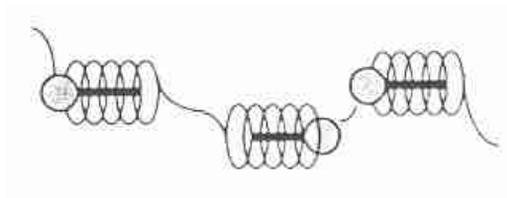
*Svensson y col. 1996* estudiaron la formación de complejos de SDS (tensioactivo aniónico) con amilosa y con amilopectina de patata, mediante la medida de tensiones superficiales. La amilosa es un polímero de glucosa no ramificado formado por enlaces  $\alpha$ -(1-4) lo que le permite adoptar una forma de hélice interrumpida en disolución (Figura 3.15), pudiendo formar complejos de inclusión en dicha hélice con diferentes ligandos monocadena; entre dichos ligandos estarían lípidos monoacilados. La amilopectina al ser ramificada, enlaces  $\alpha$ -(1-6), presenta una estructura más rígida, distribuyéndose en disolución en forma de racimo con dobles hélices; sin embargo también existe la posibilidad de que las cadenas más externas de ésta formen complejos con varios lípidos monoacilados (*Gudmundsson y Eliasson 1990, Gudmundsson 1992*).



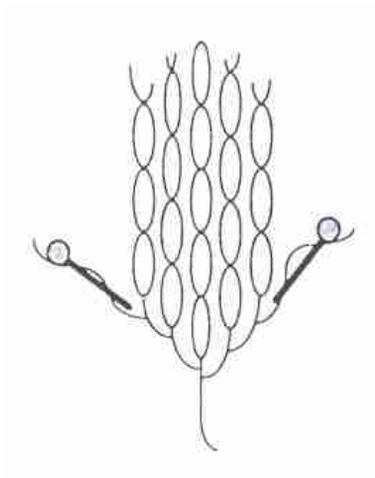
**Figura 3.15 Hélice interrumpida**

*Svensson y col. 1996* comprobaron que tanto la amilosa (Figura 3.16) como la amilopectina (Figura 3.17) forman complejos con el SDS si bien la capacidad de la amilopectina para ligar tensioactivo es mucho menor que la de la amilosa. Según

*French y Murphy 1977* la amilosa forma una hélice entorno a la parte hidrofóbica del ligando; dicha hélice es flexible y puede tener 6, 7 e incluso 8 unidades de glucosa por giro dependiendo del ligando. *Hui y col. 1983* concluyen análogamente que el sitio de unión de la amilosa es hidrofóbico formando una hélice alrededor del tensioactivo de 6 o 7 unidades de glucosa por giro con diámetros internos de 4.5 a 7 Å donde se forman los complejos de inclusión. Por tanto la hélice de amilosa es flexible permitiendo formar complejos con ligandos de diferentes tamaños.



**Figura 3.16 Complejo amilosa-tensioactivo**



**Figura 3.17 Complejo amilopectina-tensioactivo**

*Svensson y col. 1996*, de acuerdo con *Kugimiya y col. 1980* y con *Batres y White 1986*, concluyeron que la amilopectina es capaz de ligar tensioactivo en menor cantidad debido a que sólo las cadenas más externas son capaces de formar el complejo (Figura 3.17). *Banks y col. 1970* demostraron que variando la longitud de

las cadenas más externas de la amilopectina variaba la capacidad de ésta para formar complejos con el yodo, de tal forma que aumentando la longitud de cadena aumentaba la formación del complejo (son necesarias cadenas de 20-25 glucosas como mínimo para formar complejo con el yodo). Estudios realizados con amilopectina de diversos orígenes botánicos han demostrado que la longitud de las cadenas ramificadas presentan una distribución bimodal y en algunos casos polimodal (*Hizukuri 1985*, *Hizukuri 1986*). El tamaño medio de las cadenas de amilopectina de patata es de los mayores conocidos comparado con los de otros orígenes botánicos, siendo en el trabajo de *Svensson y col. 1996* de 23 unidades de glucosa. Por tanto la amilopectina de patata tiene capacidad para ligar pequeñas cantidades de tensioactivo.

Según los estudios realizados con monoglicéridos por *Legendijk y Pennings 1970* y por *Hahn y Hood 1987*, y los trabajos de *Svensson y col. 1996* con SDS, la capacidad para formar complejos de la amilosa es 7 u 8 veces superior a la de la amilopectina. *Lundqvist y col. 2002b* estudiaron la unión de un tensioactivo catiónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) a amilosa y amilopectina de patata y a amilopectina de cebada, mediante la medida de tensiones superficiales. Los tres polímeros, independientemente de su naturaleza, fueron capaces de formar complejos de inclusión ligando la misma cantidad de tensioactivo. La elevada capacidad que presenta en este caso la amilopectina para ligar CTAB se atribuyó a la posible interacción electrostática positiva entre el CTAB y los grupos fosfato que puede haber en la amilopectina. Según *Muhrbeck y Tellier 1991*, la amilopectina de patata tiene un grupo fosfato por cada 100-200 unidades de glucosa, mientras que la amilosa de patata puede considerarse un polímero no iónico. *Goddard 1986b*, en su estudio de interacciones entre polímeros y tensioactivos de carga opuesta, afirma que se debe producir una fuerte asociación debido a la atracción de las cargas electrostáticas. En caso de tener carga de igual signo la asociación que cabe esperar sería débil.

### **3.6.2. Isotermas de enlace**

Las interacciones entre macromoléculas y ligandos que conllevan la unión de ambos pueden analizarse aplicando las isotermas de enlace. Existen dos tipos de ligandos:

- Específicos: Se enlazan en una localización específica, punto o sitio de unión, de la macromolécula
- No específicos: No presentan preferencia por ningún punto de la estructura de la macromolécula a la hora de enlazarse con ella.

#### **3.6.2.1. Ligandos específicos**

A la hora de estudiar los ligandos específicos el caso más sencillo que se puede presentar es aquel en el que la macromolécula, M, sólo es capaz de ligar un ligando, L, es decir que presenta un único punto de unión. La constante de asociación K se expresa de acuerdo con la reacción:



Definiendo el parámetro  $\nu$  como los moles de ligando enlazado a la macromolécula por mol de macromolécula, se puede calcular su valor de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\nu = \frac{[ML]}{[M] + [ML]} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

Teniendo en cuenta el valor de la constante de asociación, resulta:

$$v = \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad \text{Ec. (3.3)}$$

Si en lugar de un único punto de unión existieran  $m$  posibles sitios iguales de unión y si no hay interacciones entre los ligandos en el momento de su unión (es decir no existe cooperatividad),  $v$  será la suma de las  $v_i$  correspondientes a cada uno de los  $m$  puntos, obteniéndose:

$$v = \sum_{i=1}^m v_i = \frac{m \cdot K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad \text{Ec. (3.4)}$$

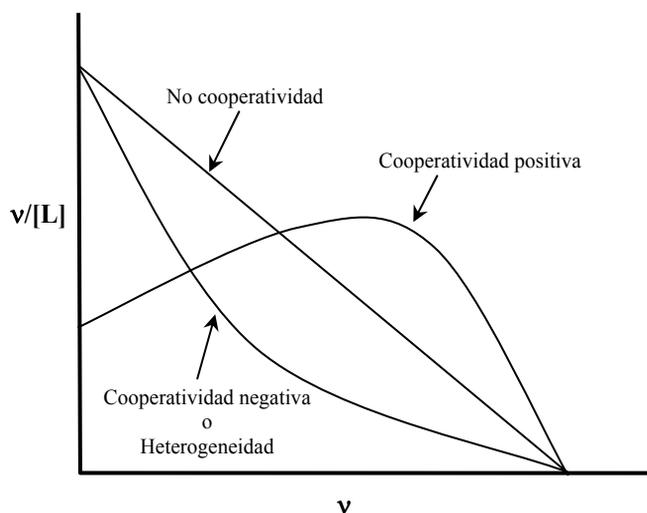
Esta ecuación es la expresión de la isoterma de enlace para el complejo formado por la macromolécula y el ligando. A la hora de calcular los valores de  $m$  y de  $K$  se recurre a los gráficos de Scatchard (*Scatchard 1949*). Estos gráficos se basan en reordenar la Ecuación (3.4) de tal modo que se obtiene la siguiente ecuación linealizada:

$$\frac{v}{[L]} = K \cdot (m - v) \quad \text{Ec. (3.5)}$$

Al representar  $v/[L]$  frente a  $v$  se obtendrá una línea recta de pendiente negativa (ver Figura 3.18). A partir de la pendiente y la ordenada en el origen es posible calcular  $K$  y  $m$  respectivamente.

Hasta ahora se ha considerado que todos los puntos de unión son iguales y que no existe cooperatividad entre los ligandos a la hora de enlazarse; es lo que se conoce como una unión tipo Langmuir. *Dahlquist 1978* describió como se comportaría el gráfico de Scatchard en los casos en los que o bien no todos los puntos de unión no son iguales (heterogeneidad de la macromolécula) o bien existe un efecto cooperativo positivo (la unión de un ligando favorece la unión de más ligandos) o negativo (la unión de un ligando dificulta la unión de otros ligandos) entre los ligandos. La forma del gráfico dejaría de ser lineal en todos estos casos, tal y como se

refleja en la Figura 3.18. Se observa que el tipo de curva tanto para el caso de cooperatividad negativa, como para el caso de heterogeneidad de los puntos de enlace, es la misma y por tanto no sería posible distinguir entre las dos situaciones. Según *Dahlquist 1978* en este caso sería necesario recurrir al gráfico de Hill, donde se representa el logaritmo del cociente entre puntos de enlace ocupados partido por puntos de enlace libres, frente la logaritmo de la concentración de ligando libre; si éste gráfico es una línea recta y si el factor de Hill calculado a partir de él es menor que 1, entonces existe efecto cooperativo negativo.



**Figura 3.18 Gráfico de Scatchard.**

Por tanto a partir de la forma del gráfico de Scatchard es posible distinguir entre tres casos: a) no existe cooperatividad, b) existe cooperatividad positiva y c) existe cooperatividad negativa o heterogeneidad en los puntos de unión.

### 3.6.2.2. Ligandos no específicos

*McGhee y Von Hippel 1974* describieron el modelo teórico para la interacción que da lugar a la unión de proteínas al ADN. De acuerdo con ellos la

macromolécula (ADN) se considera como una estructura reticular unidimensional, es decir una cadena formada por la unión de monómeros. En este caso el ligando no se une a un punto específico de la macromolécula sino que lo puede hacer en cualquier punto de ésta ocupando un determinado número de monómeros de la cadena polimérica,  $n_m$ , de la macromolécula. Si esto es así los posibles sitios de unión se solapan de tal forma que para cualquier valor del grado de saturación del enlace entre la macromolécula y el ligando la cantidad de sitios de unión libres depende no sólo del número de ligandos ya unidos sino también de su distribución a lo largo de la cadena de la macromolécula. Este solapamiento implica que a la hora de representar los clásicos gráficos de Scatchard aparezcan desviaciones con respecto a la linealidad dando lugar a falsas interpretaciones con respecto a la posibilidad de cooperatividad del enlace o heterogeneidad de los sitios de unión. *McGhee y Von Hippel 1974* corrigieron la ecuación de la isoterma de enlace para tener en cuenta este solapamiento. Así para el caso en que no exista cooperatividad la isoterma vendrá dada por la ecuación:

$$\frac{v}{[L]} = K \cdot (1 - n_m \cdot v) \cdot \left( \frac{1 - n_m \cdot v}{1 - (n_m - 1) \cdot v} \right)^{n_m - 1} \quad \text{Ec. (3.6)}$$

Esta ecuación se reduce a la clásica de Scatchard (Ecuación (3.5)) para el caso en que sólo se una un ligando a la macromolécula ocupando únicamente un monómero de ésta ( $n_m$  y  $m$  en ambas ecuaciones serían iguales a 1). En la Figura 3.19 se ha representado el gráfico de Scatchard correspondiente a esta ecuación, suponiendo valores de  $n_m$  entre 1 y 20,  $K = 1$  L/mol. La abscisa se ha escalado en valores de  $1/n_m$ . Se observa que para valores de  $n_m > 1$  la representación deja de ser una recta para pasar a ser una curva debido al solapamiento de los sitios de unión y no como cabría pensar según el enfoque clásico que existe cooperatividad negativa o heterogeneidad. La línea discontinua es la tangente a la curva cuando  $v = 0$ . La intersección de ésta con la abcisa es igual a  $1/2n_m$ , por lo que es posible calcular el valor de  $n_m$  a partir de este dato.

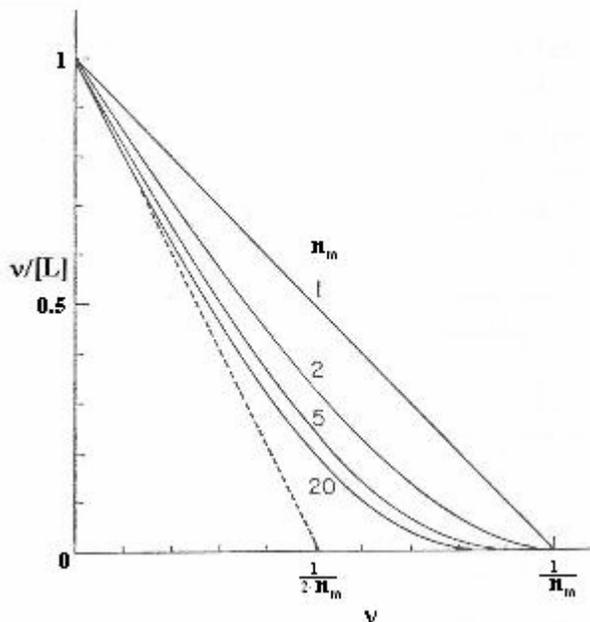


Figura 3.19 Grafico de Scatchard para enlace no cooperativo según la isoterma de McGhee y Von Hippel 1974

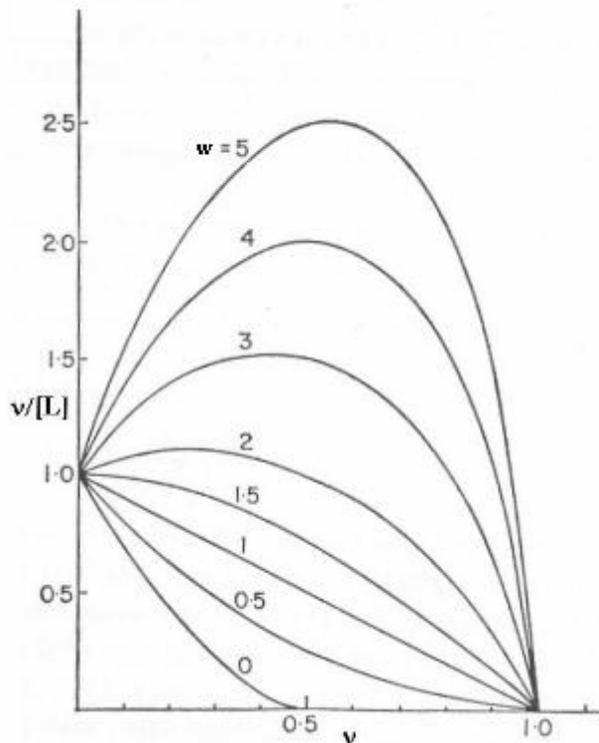
Para el caso en que exista cooperatividad en el enlace McGhee y Von Hippel 1974 modifican la Ecuación (3.6) introduciendo el parámetro de cooperatividad,  $w$ . Este parámetro será igual a 1 en caso de que no exista cooperatividad. Cuando exista cooperatividad  $w$  será mayor que 1 si es positiva y menor que 1 si es negativa. La ecuación de la isoterma quedará ahora con la siguiente expresión:

$$\frac{v}{[L]} = K \cdot (1 - n_m \cdot v) \cdot \left( \frac{(2w + 1) \cdot (1 - n_m \cdot v) + v - R}{2 \cdot (w - 1) \cdot (1 - n_m \cdot v)} \right)^{n_m - 1} \cdot \left( \frac{1 - (n_m + 1) \cdot v + R}{2 \cdot (1 - n_m \cdot v)} \right)^2 \quad \text{Ec. (3.7)}$$

dónde

$$R = \sqrt{[1 - (n_m + 1) \cdot v]^2 + 4 \cdot w \cdot v \cdot (1 - n_m \cdot v)} \quad \text{Ec. (3.8)}$$

En la Figura 3.20 se ha representado el gráfico de Scatchard correspondiente a esta ecuación, para valores de  $w$  entre 0 y 5, suponiendo valores de  $n_m = 1$  y  $K = 1$  L/mol.



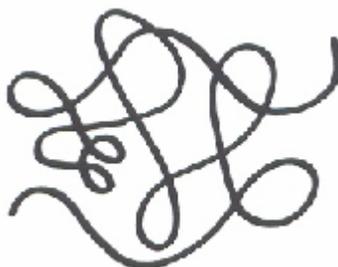
**Figura 3.20** Gráfico de Scatchard para enlace cooperativo según la isoterma de McGhee y Von Hippel 1974

Se observa que para valores de  $w > 1$  (cooperatividad positiva) se obtiene una representación convexa, mientras que para  $w < 1$  (cooperatividad negativa) la representación es cóncava. En esta representación  $n_m = 1$ , pero para valores de  $n_m > 1$ , de acuerdo con la Ecuación (3.6) y su representación en la Figura 3.19 la situación es equivalente a una cooperatividad negativa, de tal modo que la forma definitiva de la curva será un compromiso entre los valores de  $n_m$  y  $w$ .

### 3.6.2.3. Isothermas tensioactivo-almidón

Las isothermas descritas para el enlace entre macromoléculas y ligandos pueden aplicarse para estudiar la formación de los complejos entre el almidón y tensioactivos. *Yamamoto y col. 1982* estudiaron la formación del complejo yodo-amilosa aplicando los gráficos de Scatchard para las isothermas de enlace de *McGhee y Von Hippel 1974* concluyendo que el enlace entre ambos era de tipo cooperativo positivo. Posteriormente *Yamamoto y col. 1983* estudiaron la influencia de la longitud de cadena de la amilosa sobre el tipo de enlace entre ésta y el tensioactivo aniónico sodiododecil sulfato (SDS). Demostraron que para cadenas con menos de 76 monómeros de glucosa el enlace era tipo Langmuir, es decir no cooperativo, mientras que para cadenas de más de 76 monómeros de glucosa el enlace resultó ser de tipo cooperativo positivo al igual que había sucedido anteriormente con el yodo. *Lundqvist y col. 2002a*, *Lundqvist y col. 2002b* estudiaron la unión de un tensioactivo catiónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), a amilosa y amilopectina de patata y a amilopectina de cebada. Empleando los gráficos de Scatchard para las isothermas de enlace de *McGhee y Von Hippel 1974* comprobaron que la unión para la amilosa era de tipo cooperativo positivo, mientras que para el caso de la amilopectina los gráficos de Scatchard demostraron que la unión era de tipo Langmuir ajustándose a la isoterma clásica descrita por la Ecuación (3.5). Las ramificaciones de la amilopectina tienen una longitud de cadena media de 20-25 unidades de glucosa (*Adkins y col. 1966*, *Whistler y Daniel 1984*). Según *Lundqvist y col. 2002b* y de acuerdo con los resultados de *Yamamoto y col. 1983*, ya que las ramificaciones de la amilopectina tienen menos de 76 unidades de glucosa era de esperar que la unión entre un tensioactivo y la amilopectina fuera de tipo Langmuir. La unión para la amilopectina parece ser similar a la de la formación de complejos de inclusión entre cadenas cortas de amilosa y yodo, ya que la amilopectina puede considerarse como un conjunto de cadenas cortas de amilosa independientes. Dado que el tamaño de estas cadenas no es fijo, sino que presenta una distribución en torno a un tamaño medio es de esperar que el tensioactivo se una primero a las cadenas más largas. Con respecto a la unión cooperativa de la amilosa de patata al CTAB, *Lundqvist y col. 2002b* comprobaron mediante medida de las entalpías de la interacción entre ambos (*Lundqvist y col. 2002a*) que el efecto cooperativo puede ser debido a un cambio en la conformación de

la amilosa en la disolución, pasando de tener una estructura desordenada tipo “random coil” (ver Figura 3.21) a la estructura de hélice interrumpida (ver Figuras 3.15 y 3.16) en cuanto que se une la primera molécula de tensioactivo, facilitando así la unión de sucesivas moléculas de éste.



**Figura 3.21 Estructura desordenada tipo “random coil” para la amilosa.**

*Lundqvist y col. 2002b*, a partir de las isotermas de enlace para la amilosa y la amilopectina, y teniendo en cuenta que el almidón de patata suele contener un 75 % de amilopectina y un 25 % de amilosa, simularon la hipotética isoterma correspondiente al enlace del CTAB al almidón de patata (ver Figura 3.22). En la ordenada se representa  $v$  (moles de CTAB ligado/mol de glucosa) y en la abscisa la concentración de monómeros de CTAB libres,  $C_{\text{mon}}$  (es igual a  $[L]$  en las ecuaciones linealizadas de Scatchard para las isotermas). Al emplear escala logarítmica en el eje de la abscisa se consigue que la representación para la amilopectina se aproxime bastante más a una recta (la Ecuación (3.3) que representa la isoterma para unión tipo Langmuir, es una curva de forma similar a la de un logaritmo, por lo que al emplear escala logarítmica se consigue transformarla aproximadamente en una recta), mientras que la amilosa presenta un comportamiento sigmoideal muy marcado típico de enlace cooperativo. Dado que la amilopectina es el componente mayoritario y dado que el CTAB presentó la misma capacidad para ligarse a ella que a la amilosa, la representación de la curva hipotética para el almidón, suma de las contribuciones de aquellas, se parece bastante más a la de la amilopectina que a la de la amilosa. De acuerdo con esta representación se puede realizar una predicción de que sucedería al ir añadiendo el CTAB sobre una disolución de almidón de patata. Como la

amilopectina de patata presenta grupos fosfato (Muhrebeck y Tellier 1991), la interacción electrostática de atracción con el CTAB determinaría que comenzase a unirse a concentraciones pequeñas. Conforme aumenta la concentración de tensioactivo empezaría a unirse a la amilosa. Una vez saturada la amilosa se uniría a la amilopectina hasta que comenzaran a formarse las micelas del tensioactivo. En el caso de que se estudiara la interacción entre otros ligandos no iónicos y el almidón, los ligandos primero se unirían a la amilosa hasta saturarla y después pasarían a unirse a la amilopectina (Lundqvist y col. 2002b). De los resultados para la unión entre almidón de patata y diferentes ligandos Rutschmann y Solms 1990 también obtuvieron curvas con regiones iguales a la de la Figura 3.22, donde la parte final, correspondiente a concentraciones elevadas de ligando, es debida a la unión a la amilopectina y cuya pendiente depende del número de ligandos que es capaz de ligar ésta.

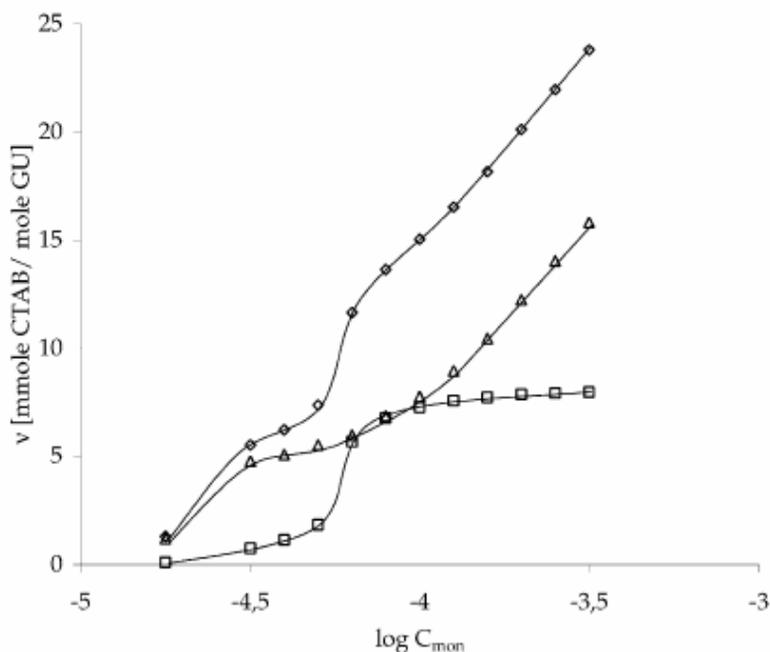


Figura 3.22 Isoterma teórica para la unión entre CTAB y almidón de patata (75 % amilopectina, 25 % amilosa).  $\diamond$  Almidón,  $\Delta$  contribución de la amilopectina,  $\square$  contribución de la amilosa.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

### 4.1.1. Caracterización del almidón

En el presente estudio se empleó almidón soluble de patata, PA, de la casa Panreac. A continuación se describen los análisis a los que fue sometido para su caracterización

#### 4.1.1.1. Determinación de la humedad

El contenido de humedad inicial del almidón se determinó mediante una balanza de infrarrojos de la casa AND, modelo AD-4714A. Para ello se secaron dos muestras de 5 g de almidón durante 25 minutos a 100 °C, obteniéndose un valor medio de humedad del 16.0%.

Se utilizarán dos bases de cálculo para expresar concentraciones de almidón:

1. Concentración en base seca, S, cuando al peso de almidón se le ha sustraído la humedad inicial.
2. Concentración en base húmeda, S', cuando al peso de almidón no se le ha sustraído su contenido inicial de humedad.

Siempre que no se indique lo contrario se considerará por defecto que las cantidades de almidón y sus concentraciones están expresadas en base húmeda.

#### 4.1.1.2. Análisis elemental

Se realizó un análisis elemental del almidón mediante un Analizador elemental de la casa FISON S CARLO ERBA modelo EA 1108, compuesto por:

- Muestreador automático

- Horno
  
- Sistema de detección TCD (detector de conductividad térmica).
  
- Columna cromatográfica
  
- Detector de trazas de azufre
  
- Sistema informático de control, cálculo y tratamiento de datos.

Para pesar las muestras se empleó una microbalanza de precisión de la casa METTLER TOLEDO modelo M-3.

La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura de 1020 °C. Los diferentes productos de combustión N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, son transportados mediante el gas portador (He) y después separados selectivamente en la columna cromatográfica, para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla, lo que permite el cálculo de los porcentajes de nitrógeno, carbono, azufre e hidrógeno de la muestra.

Se analizaron un total de cinco muestras que previamente se sometieron a los siguientes tratamientos para eliminar su humedad inicial:

- Muestra 1: No se sometió a ningún tratamiento.
  
- Muestra 2: Se dejó deshidratar en un desecador con gel de sílice (gel de sílice de 3-6 mm con cobalto cloruro como indicador QP, de Panreac.) durante 24 horas.
  
- Muestra 3: Secada en estufa a 60 °C durante 7 horas.

- Muestras 4 y 5: Secadas en balanza de infrarrojos a 100 °C tal como se ha descrito en el apartado 4.1.1.1.

Los resultados obtenidos así como la composición teórica del almidón, obtenida a partir de su fórmula molecular general  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , siendo  $n$  el grado de polimerización, se recogen en la Tabla 4.1. No se detectó la presencia de nitrógeno ni de azufre. A partir la fórmula molecular general del almidón se calculó el porcentaje de oxígeno por diferencia entre el 100% menos la suma de los porcentajes de carbono e hidrógeno. Para las muestras 1 a 3 los resultados obtenidos fueron en base húmeda debido a la humedad residual en las muestras tras el tratamiento previo al análisis. Para calcular los resultados en base seca se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$C = \frac{C'}{1 - \frac{h}{100}} \quad \text{Ec. (4.1)}$$

$$H = \frac{H' - \frac{2 \cdot h}{18}}{1 - \frac{h}{100}} \quad \text{Ec. (4.2)}$$

dónde:

C: Carbono (en base seca), % en peso.

C': Carbono (en base húmeda), % en peso.

H: Hidrógeno (en base seca), % en peso.

H': Hidrógeno (en base húmeda), % en peso.

h: Humedad residual tras tratamiento previo al análisis, % en peso.

Muestra	Masa (g)	h (%)	C' (%)	H' (%)	O' (%)	C (%)	H (%)	O (%)
1	3.423	16.0	41.59	7.39	51.02	49.51	6.68	43.81
2	3.520	5.15	43.05	7.25	49.70	45.39	7.04	47.57
3	3.657	2.28	42.99	7.11	49.90	43.99	7.02	48.99
4	4.104	0	42.71	6.97	50.32	42.71	6.97	50.32
5	4.845	0	43.72	7.07	49.21	43.72	7.07	49.21
<b>Composición teórica</b>						<b>44.45</b>	<b>6.22</b>	<b>49.34</b>

**Tabla 4.1** Análisis elemental y composición teórica del almidón.

Se comprueba que los resultados del análisis elemental son bastante coincidentes con los de la composición teórica del almidón, por lo que no se considerará la presencia de impurezas significativas.

#### 4.1.1.3. Proporción amilosa/amilopectina

Para la determinación de la proporción de amilosa y amilopectina se siguió el método descrito por *McGrance y col. 1998* para la determinación de amilosa en almidón.

##### 4.1.1.3.1. Equipos necesarios

Además del material de uso corriente en el laboratorio se ha utilizado:

- Espectrofotómetro UV: equipo de la casa SPECTRONIC UNICAM modelo HELIOS  $\alpha$ .
- Baño termostático: baño de la casa SELECTA equipado con un termostato TECTRON.

#### 4.1.1.3.2. Reactivos

- Disolución I<sub>2</sub> (0.0025 M) – KI (0.0065 M): Preparación de 100 mL de disolución: Pesar 0.0635 g de I<sub>2</sub> (Yodo resublimado, PRS, Panreac) y 0.1079 g de KI (Potasio Yoduro, PA, Panreac). Disolver KI, mediante la ayuda de un agitador magnético, en aproximadamente 80 mL de agua destilada. A continuación añadir I<sub>2</sub> y continuar agitando hasta disolución completa del yodo. Traspasar la disolución a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua destilada.
- Almidón soluble de patata, PA, de la casa Panreac.
- Dimetilsulfóxido PA-ACS, de la casa Panreac.

#### 4.1.1.3.3. Procedimiento de medida

Pesar 0.1 g (en base seca) de la muestra problema en un tubo de ensayo y añadir 2 mL de dimetilsulfóxido; dejar disolver durante 15 minutos en un baño termostático a 85 °C. Transcurrido el tiempo diluir con agua destilada a 25 mL en un matraz aforado. Tomar 1 mL de ésta disolución y sobre él añadir 50 mL de agua destilada y 5 mL de disolución I<sub>2</sub> (0.0025 M) – KI (0.0065 M). Mezclar bien y medir en espectrofotómetro la absorbancia a 600 nm.

La cantidad de amilosa se determina a partir de la recta patrón de *McGrance y col. 1998*, realizada con mezclas de amilosa y amilopectina de patata puras con un contenido en amilosa de 0, 10, 25, 50, 75 y 100 %. La ecuación de dicha recta patrón se ha obtenido empleando el software Digitize-Pro 4.1, que permite hallar el valor de la abcisa y la ordenada de cada uno de los puntos experimentales representados por dichos autores. Los datos y la representación de la recta patrón se recogen en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.1.

Amilosa (% p/p)	Absorbancia (600 nm)
0	0.418
0	0.396
10	0.535
10	0.535
25	0.668
25	0.668
50	0.935
50	0.935
75	1.185
75	1.185
100	1.462
100	1.495

Tabla 4.2 Recta patrón para determinación del % en peso de amilosa en una muestra de almidón.

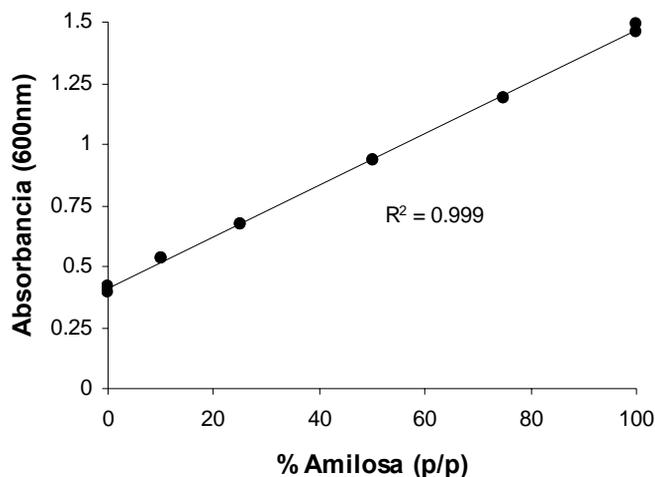


Figura 4.1 Recta patrón para determinación del % en peso de amilosa en una muestra de almidón.

La relación entre el porcentaje en peso de amilosa, AM, y la absorbancia es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 0.0105 \cdot AM + 0.4121 \quad \text{Ec. (4.3)}$$

#### 4.1.1.3.4. Resultados obtenidos

Se analizaron muestras por duplicado del almidón de patata soluble, obteniéndose un contenido en amilosa del  $19.8 \pm 0.2$  %. Por tanto el contenido en amilopectina es  $80.2 \pm 0.2$  %.

### **4.1.2. Seguimiento de la reacción y medida de la actividad enzimática**

#### 4.1.2.1. Método yodométrico

Para el seguimiento de la reacción y medida de la actividad enzimática en ausencia de tensioactivos se utilizó un procedimiento basado en el método yodométrico de medida de actividad de amilasas descrito por *Fuwa 1954*. El método yodométrico está basado en la capacidad que tiene la amilosa para ligar yodo dando lugar a un complejo de color azul cuya absorbancia puede medirse espectrofotométricamente. De entre los métodos recogidos en el apartado 3.2.4 se ha escogido éste por ser frecuentemente citado en la bibliografía consultada, así como por su relativa sencillez y economía.

##### 4.1.2.1.1. Equipos necesarios

Además del material de uso corriente en el laboratorio se ha utilizado:

- Espectrofotómetro UV: equipo de la casa SPECTRONIC UNICAM modelo HELIOS  $\alpha$ .
- Baño termostatzado: baño de la casa SELECTA equipado con un termostato TECTRON.
- Baño generador de agua fría: equipo FRIGITERM de la casa SELECTA, dotado de un compresor capaz de refrigerar el agua que contiene el baño.

4.1.2.1.2. Reactivos

- Disolución 0.2% I<sub>2</sub> – 2% KI: Se prepara diariamente a partir de una solución madre 1% I<sub>2</sub> – 10% KI, la cual se conserva en envase de vidrio topacio en frigorífico. Preparación de disolución madre (1L): Pesar 10 g de I<sub>2</sub> (Yodo resublimado, PRS, Panreac) y 100 g de KI (Potasio Yoduro, PA, Panreac). Disolver, mediante la ayuda de un agitador magnético, los 100 g de KI en aproximadamente 800 mL de agua destilada. A continuación añadir los 10 g de I<sub>2</sub> y continuar agitando hasta disolución completa del yodo. Traspasar la disolución a un matraz aforado de 1L y enrasar con agua destilada.
- Disolución de almidón soluble 0.5% (p/v): Se usa almidón soluble de patata, PA, de la casa Panreac. Dicha disolución se prepara diariamente y como diluyente se utiliza disolución tampón (ésta variará en función de las condiciones de pH seleccionadas). Preparación: Pesar 0.25 g de almidón. Dispersar el almidón sobre 25 mL de disolución tampón. Calentar hasta ebullición otros 25 mL de disolución tampón. Añadir la disolución de almidón sobre la disolución en ebullición y dejar hervir con agitación magnética durante 3 minutos (ver apartado 4.1.2.1.3.). A continuación enfriar con agua hasta temperatura ambiente y enrasar en matraz aforado de 50 mL con agua destilada.
- HCl 0.5 N: Se prepara a partir de ácido clorhídrico 35 %, PA, Panreac.
- NaOH 0.1 N: Se prepara a partir de hidróxido sódico en lentejas, PA, Merck.
- Tampón fosfato 0.1 M: Se prepara según *Sorensen 1909*. Para ello se utiliza NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato, PA, Panreac) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (di-Sodio Hidrógeno Fosfato 12-hidrato, PRS, Panreac). Las cantidades de ambos reactivos se ajustan para conseguir el pH deseado. Se emplea para experimentos en el rango de pH de 6 a 8.
- Tampón citrato 0.05 M – fosfato 0.1 M: Se prepara según *Mcllvaine 1921*. Para ello se utiliza ácido cítrico anhidro, QP (Probus) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (di-Sodio

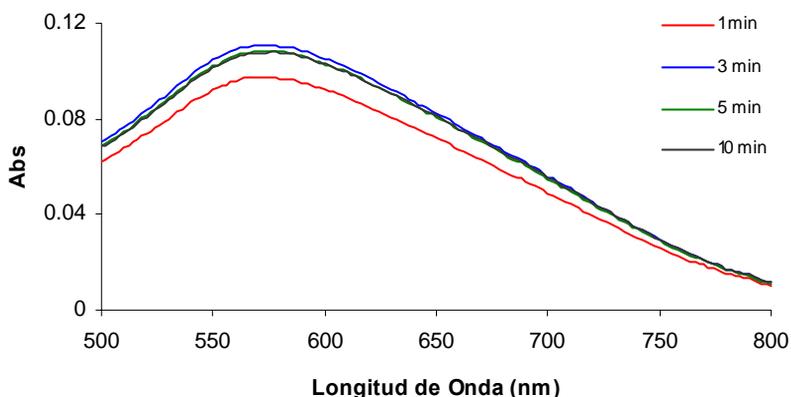
Hidrógeno Fosfato 12-hidrato, PRS, Panreac). Las cantidades de ambos reactivos se ajustan para conseguir un pH = 5.

- Tampón Tris (Hidroximetil) Aminometano 0.1 M: Se prepara según *Gomori 1948*. Para ello se utiliza tris (hidroximetil) aminometano, PA, Panreac, y HCl. Las cantidades de ambos reactivos se ajustan para conseguir un pH = 9.
- Enzima: Se utilizó una  $\alpha$ -amilasa de origen bacteriano (*bacillus licheniformis*) de la casa NOVOZYMES A/S, Termamyl® 300 L Type DX. Esta enzima se utiliza específicamente en formulaciones de detergentes para lavandería y para lavavajillas. Presenta una actividad declarada por el fabricante de 300 KNU/g, donde 1 KNU (Kilo Novo Unit) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 4870 mg (en base seca) de almidón soluble Merck (Erg. B 6, lote número 6380528) por hora en condiciones estándar (*Novozymes A/S 2002a*). La enzima viene en forma líquida con una densidad de 1.2 g/cm<sup>3</sup>. Dado que la actividad de esta enzima es muy elevada y siguiendo las recomendaciones del método de NOVOZYMES (EB-SM-0009.02/01) inicialmente se preparó una disolución madre diluyendo la enzima a una actividad equivalente a 0.07 KNU/mL. Como diluyente se usa en cada caso el tampón utilizado para establecer el pH del experimento.

#### 4.1.2.1.3. Preparación de la disolución de almidón

Para comprobar que el almidón se disuelve correctamente se realizaron una serie de experimentos, en los que partiendo de una disolución madre de almidón soluble al 0.2% (sobre tampón fosfato 0.002 M, pH = 7), ésta fue dividida en varias fracciones cada una de las cuales fue sometida a ebullición durante periodos de tiempo distintos (1, 3, 5 y 10 minutos) y posteriormente se realizó un barrido de longitud de onda de estas disoluciones previamente teñidas con disolución de yodo. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 4.2. Se observa que un tiempo de ebullición de 1 minuto es insuficiente para conseguir la disolución completa del almidón, obteniéndose absorbancias inferiores a las correspondientes a los restantes

tiempos. Para los restantes tiempos las absorbancias son similares por lo cual un tiempo de ebullición de 3 minutos será suficiente. La disolución completa también se puede comprobar visualmente, ya que conforme se va disolviendo el almidón la turbidez de la disolución disminuye volviéndose completamente transparente una vez disuelto por completo el almidón.



**Figura 4.2** Absorbancia frente a longitud de onda a diferentes tiempos de ebullición.

#### 4.1.2.1.4. Selección de la longitud de onda de medida

La longitud de onda a la que absorbe al complejo yodo-almidón depende del grado de polimerización de la amilosa, disminuyendo conforme lo hace el número de unidades de glucosa que forman el polímero (*John y col. 1983*). Dado que el grado de polimerización del almidón no es fijo, sino que varía dentro de un rango, existen múltiples longitudes de onda a las que absorbe la luz. Así la absorbancia óptima varía según distintos autores: 620 nm (*Ozbek y Yuceer 2001*), 700 nm (*Fuwa 1954*), 600 nm (*Duedahl-Olesen y col. 2000*). A la hora de seleccionar la longitud de onda adecuada convendrá siempre realizar un barrido previo de la disolución de almidón y seleccionar como longitud de onda óptima la correspondiente a la máxima absorbancia (ésta a su vez corresponde a la fracción de amilosa cuyo grado de

polimerización es mayoritario). A partir de la Figura 4.2 se observa que para el almidón soluble utilizado la absorbancia máxima se sitúa entre los 570-580 nm. Por tanto se seleccionó 575 nm como longitud de onda óptima de medida para nuestros experimentos.

#### 4.1.2.1.5. Recta patrón

La recta de calibrado del método se ha obtenido preparando disoluciones de almidón de concentraciones,  $S_m$ , comprendidas entre 0.004 g/L y 0.044 g/L. En estas concentraciones el método yodométrico cumple con la ley de Lambert Beer. Las disoluciones se prepararon del siguiente modo:

1. Preparar disolución de almidón 0.5% según el método establecido en el apartado de reactivos, utilizando tampón fosfato 0.1M, pH = 7.5.
1. Añadir de 0.2 mL a 2.2 mL de disolución de almidón (según la concentración final deseada) en un matraz de 250 mL y completar hasta 5 mL con tampón fosfato 0.1 M y pH = 7.5.
2. Añadir aproximadamente 200 mL de agua destilada.
3. Añadir 5 mL de disolución 0.2%  $I_2$  – 2% KI.
4. Enrasar el matraz con agua destilada.
5. Transcurridos 10 minutos (*Duedahl-Olesen y col. 2000*) medir la absorbancia a 575 nm en el espectrofotómetro. La medida se realizará frente a un blanco que únicamente contiene  $I_2$  – KI y tampón en las mismas concentraciones que las muestras problema.

Los resultados se recogen en la Tabla 4.3 y se representan en la Figura 4.3; en ordenadas la absorbancia, frente a la concentración de almidón, g/L, en abscisas.

$S_m'$ (g/L)	Absorbancia (575 nm)
0	0
0.004	0.0307
0.008	0.0612
0.012	0.0915
0.016	0.1200
0.020	0.1494
0.024	0.1792
0.028	0.2115
0.032	0.2413
0.036	0.2719
0.040	0.3007
0.044	0.3308

Tabla 4.3 Recta de calibrado método yodométrico.

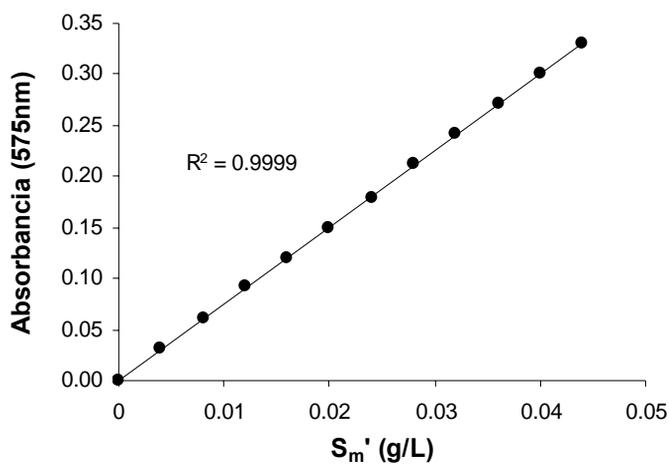


Figura 4.3 Recta de calibrado método yodométrico.

La relación obtenida entre la concentración de almidón y la absorbancia es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 7.5265 \cdot S_m' \text{ (g/L)} \quad \text{Ec. (4.4)}$$

Para calcular la concentración de almidón en la mezcla reaccionante habrá que tener en cuenta el correspondiente factor de dilución. Por tanto:

$$S' = \frac{S_m' \cdot V_m}{V} \quad \text{Ec. (4.5)}$$

dónde:

$S'$ : Concentración de almidón en la mezcla reaccionante, g/L.

$S_m'$ : Concentración de almidón en el matraz, g/L.

$V$ : Volumen de reacción, mL. En este caso 5 mL.

$V_m$ : Volumen del matraz, mL. En este caso 250 mL.

#### 4.1.2.1.6. Experimentos de hidrólisis

La reacción se realiza en tubos de ensayo roscados cerrados sumergidos en un baño termostático. El volumen de mezcla reaccionante es de 5 mL. La disolución de enzima se prepara por dilución de la disolución madre hasta la concentración deseada con una disolución tampón (preparada según lo indicado en el apartado de reactivos). Como sustrato para la reacción se preparó una disolución madre de almidón 0.5% (p/v) en tampón. Para los experimentos se añade al tubo de ensayo la cantidad necesaria de disolución de almidón para ajustar la concentración final deseada y se completa hasta 4.95 mL con tampón, se atempera a la temperatura de reacción durante 10 minutos, se añade 0.05 mL de disolución de enzima y se deja reaccionar el tiempo deseado. La parada de la reacción se realizó en base al método propuesto por *Paolucci-Jeanjean y col. 2000a*: transcurrido el tiempo de reacción deseado se ajusta con HCl 0.5 N el pH de la mezcla reaccionante a 3.9-3.4 y se sumerge inmediatamente el tubo en baño de agua fría a 5 °C; una vez enfriado se introduce el tubo en agua hirviendo durante 10 minutos; se enfría nuevamente en baño a 5 °C y finalmente se ajusta el pH a 6-6.5 con NaOH 0.1 N. Una vez desactivada la

enzima se realiza la tinción del almidón con yodo de acuerdo con *Fuwa 1954*: se traspa el contenido del tubo de ensayo a un matraz aforado de 250 mL y se añaden 200 mL de agua destilada aproximadamente y 5 mL de disolución 0.2% I<sub>2</sub> – 2% KI y se enrasa el matraz con agua destilada. Transcurridos 10 minutos (*Duedahl-Olesen y col. 2000*) se mide en espectrofotómetro la absorbancia a 575 nm. Esta medida proporciona la concentración de almidón sin hidrolizar. La medida de la muestra problema se realiza frente a un blanco que únicamente contiene I<sub>2</sub>-KI y tampón en las mismas concentraciones que la mezcla problema.

En los experimentos realizados para estudiar la influencia de la temperatura, dado que se manifiesta de forma clara la desactivación térmica de la enzima, fue necesario hacer una pequeña variación del procedimiento experimental a fin de poder evaluar dicha desactivación. Se realizaron experimentos con y sin tiempo previo de atemperamiento de la enzima a la temperatura de reacción. A continuación se describe el procedimiento: El volumen de mezcla reaccionante es de 5 mL. La reacción se lleva a cabo en tubos de ensayo roscados sumergidos en un baño termostatzado. La disolución de enzima se prepara por dilución de la disolución madre hasta la concentración deseada con una disolución de tampón fosfato 0.1 M (pH = 7.5) y la de almidón, 0.5% (p/v), también con tampón fosfato 0.1 M (pH = 7.5). Para la completa solubilización del almidón se lleva la disolución a ebullición durante 3 minutos; a continuación se enfría a temperatura ambiente con agua. Para los experimentos sin tiempo previo se añade al tubo de ensayo 1 mL de disolución de almidón y 3.95 mL de tampón fosfato 0.1 M (pH = 7.5), se atempera a la temperatura de reacción durante 10 minutos, se añade 0.05 mL de disolución de enzima y se deja reaccionar el tiempo deseado. Para los experimentos con tiempo previo se añade al tubo de ensayo 0.05 mL de disolución de enzima y 3.95 mL de tampón fosfato 0.1 M (pH = 7.5), se sumerge el tubo en el baño termostatzado a la temperatura de reacción y se deja transcurrir el tiempo previo establecido para el experimento, posteriormente se añade 1 mL de disolución de almidón y se deja reaccionar el tiempo deseado. La parada de la reacción y medida de la concentración de almidón se realizó según el método ya descrito anteriormente para los experimentos de hidrólisis sin tiempo previo de atemperamiento de la enzima.

Para cada condición de operación se preparan al menos dos tubos de ensayo independientes y para comprobar la concentración inicial de sustrato se preparan dos tubos de ensayo análogos a los de la mezcla reaccionante, pero sin enzima, y se someten al mismo proceso que aquellos. La concentración inicial de almidón será la media de ambos tubos.

#### 4.1.2.1.7. Cálculo de la actividad y de la conversión

Se define la unidad de actividad amilásica, UA, como la cantidad, en gramos, de almidón hidrolizado por gramo de enzima y por minuto. Dicha actividad se calcula con la siguiente ecuación:

$$UA = \frac{(S_i - S)}{e_0 \cdot t_r} \quad \text{Ec. (4.6)}$$

dónde:

UA: Actividad amilásica, (g almidón hidrolizado)/(g enzima·minuto)

$S_i$ : Concentración inicial de almidón en la mezcla reaccionante, g/L.

S: Concentración de almidón en la mezcla reaccionante en cualquier instante, g/L.

$e_0$ : Concentración inicial de enzima activa en la mezcla reaccionante, g/L.

$t_r$ : Tiempo de reacción, minutos.

La conversión, x, a un tiempo de reacción determinado  $t_r$ , se define según la siguiente ecuación:

$$x = \frac{S_i - S}{S_i} \quad \text{Ec. (4.7)}$$

dónde:

x: Conversión a tiempo de reacción  $t_r$ .

S: Concentración de almidón a tiempo de reacción  $t_r$ , g/L.

$S_i$ : Concentración inicial de almidón, g/L.

4.1.2.1.8. Representatividad de la conversión obtenida por el método yodométrico.

Con el fin de determinar la idoneidad de la medida a una única longitud de onda (575 nm) para el seguimiento de la hidrólisis enzimática del almidón se realizaron experimentos a 37 °C y pH comprendido en el rango de 5 a 9, y experimentos a pH = 7.5 y temperaturas entre 37 y 85 °C. La concentración inicial de almidón,  $S_i$ , fue de aproximadamente 1 g/L, variando en el rango 0.93 a 1.27 g/L. La concentración inicial de enzima activa,  $e_0$ , varió de un experimento a otro, estando comprendida en el intervalo de  $3.45 \cdot 10^{-4}$  a  $35.88 \cdot 10^{-4}$  g/L. Además de medir la absorbancia a 575 nm se realizó un barrido de longitudes de onda en el rango 350 a 800 nm, midiendo la absorbancia de 2 en 2 nm. Los barridos en cada experimento se realizaron a la disolución de almidón inicial (antes de comenzar la reacción) y a los tiempos de reacción,  $t_r$ , 0, 10, 20 y 30 min. En la Figura 4.4 se recogen los resultados obtenidos.

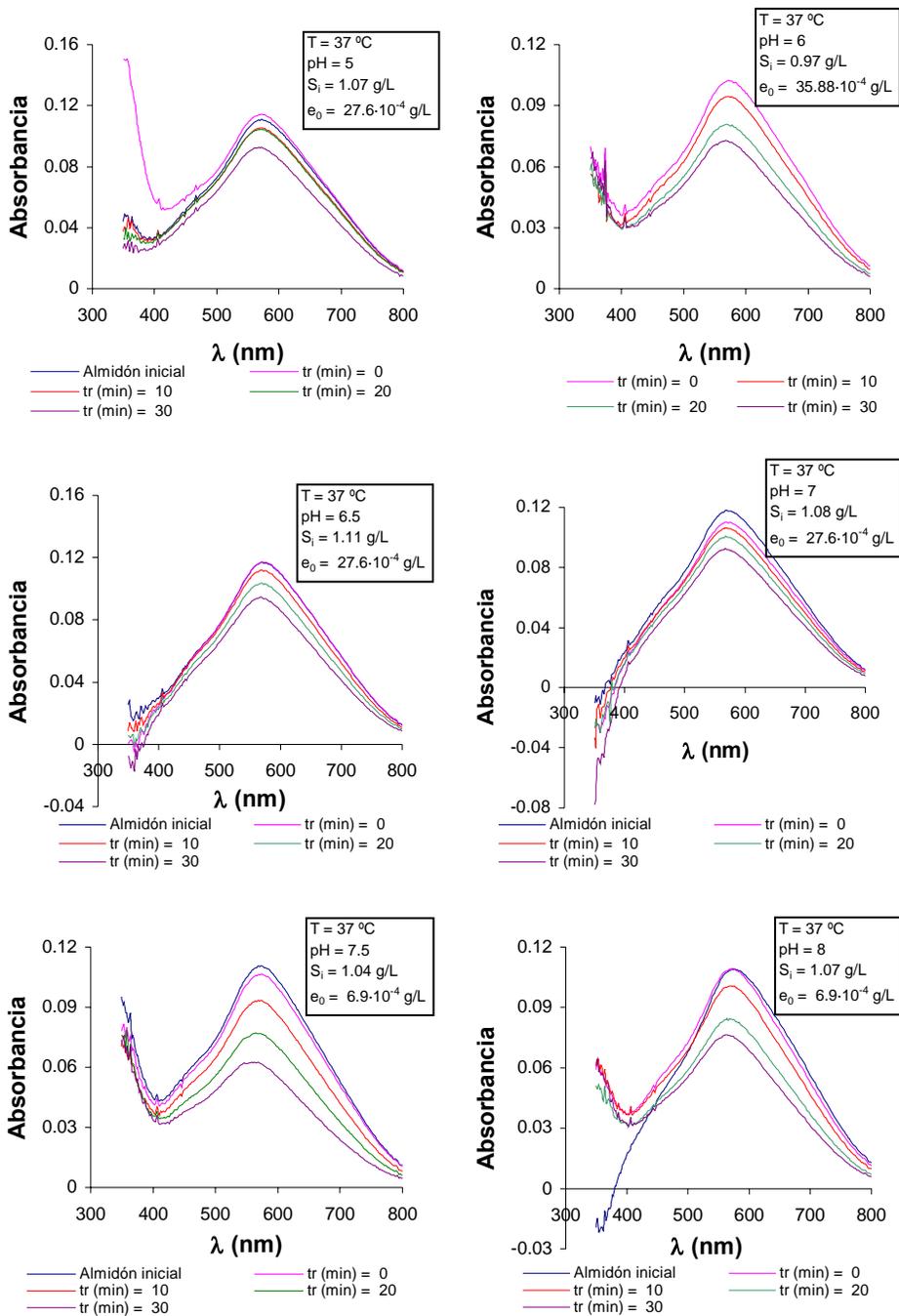


Figura 4.4 Barridos de longitud de onda.

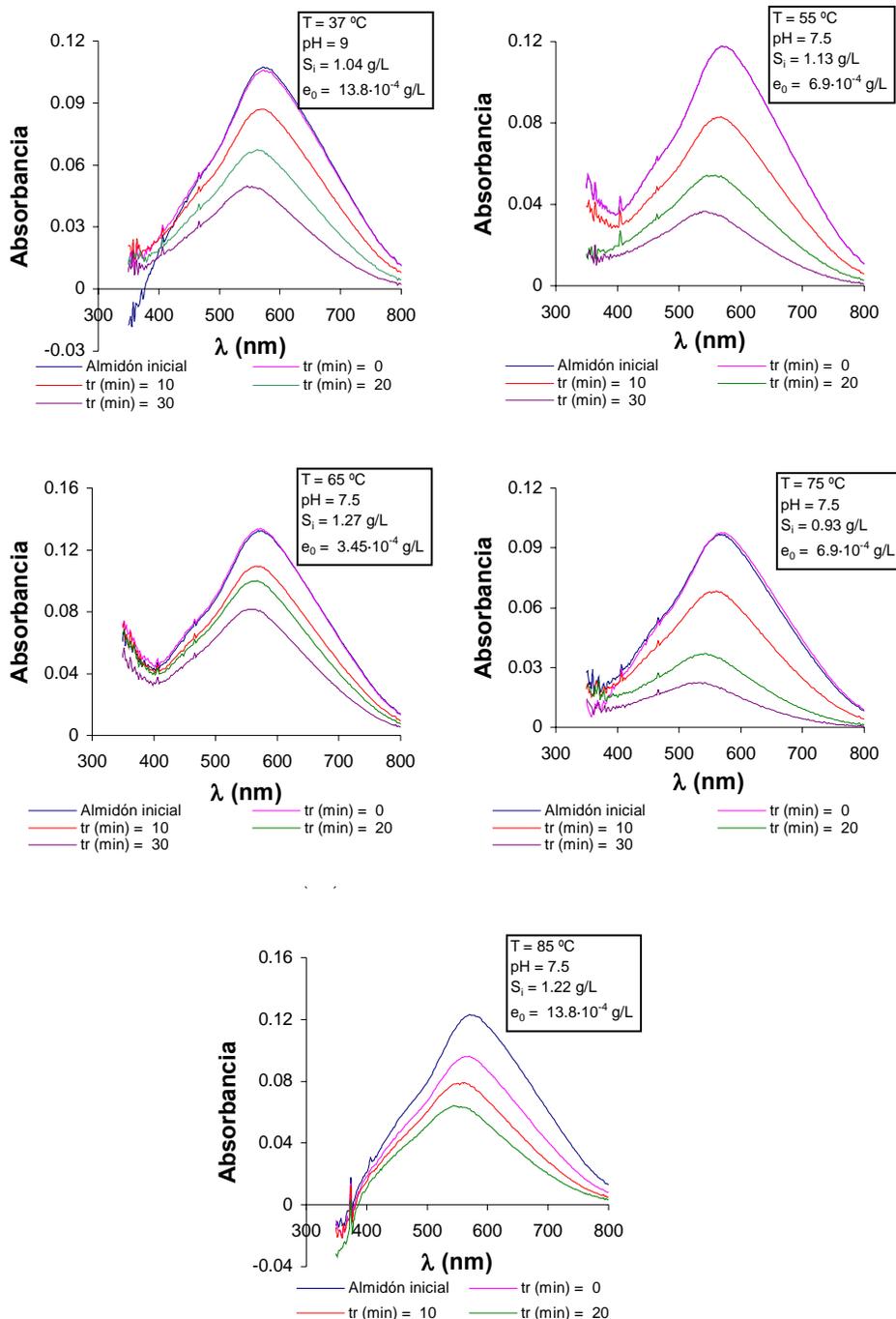
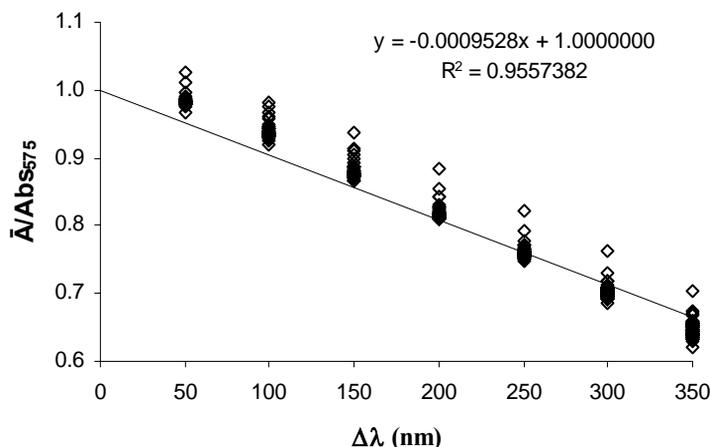


Figura 4.4 (continuación) Barridos de longitud de onda.

Como ya se ha comentado, la longitud de onda a la que absorbe al complejo yodo-almidón depende del grado de polimerización de la amilosa (*John y col. 1983*). Dado que determinados iones de yodo absorben a longitudes de onda cercanas a 400 nm (por ejemplo  $I_3^-$  a 353 nm (*Knutson y col. 1982*)), su absorbancia produce interferencia con la del complejo y por tanto no se tendrán en cuenta los datos obtenidos por debajo de 400 nm. En la Figura 4.4 se observa que, a todos los tiempos de reacción e incluso para la disolución inicial de almidón, las cadenas de almidón mayoritarias absorben dentro de un rango de longitudes de onda en torno a un valor de absorbancia máxima. Se podría utilizar el área bajo la curva para calcular la concentración total de todas las cadenas de almidón presentes. Sin embargo y dado que el método no permite obtener las fracciones minoritarias tanto de mayor como de menor tamaño, que absorberían en los extremos del intervalo de longitudes de onda en que las medidas son posibles, se ha elegido una única longitud de onda, la correspondiente a 575 nm por ser a la que existe una mayor absorbancia, es decir, representa la fracción de amilosa cuyo grado de polimerización es mayoritario. Dicha elección requiere comprobar si la absorbancia a dicha longitud de onda es representativa no sólo del polímero que absorbe específicamente a esa  $\lambda$  sino de todas las restantes fracciones, es decir, es representativa del área bajo la curva para un intervalo de longitud de onda dado. Con tal objetivo, para cada experimento y tiempo de reacción se pueden definir intervalos de longitud de onda, centrados en 575 nm, de 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 nm. Para cada intervalo se ha calculado el área bajo la curva,  $A_r$ , y la absorbancia media,  $\bar{A}$ , cociente entre el área definida por el intervalo y el incremento de longitud de onda de dicho intervalo,  $\Delta\lambda$ :

$$\bar{A} = \frac{A_r}{\Delta\lambda} \quad \text{Ec. (4.8)}$$

Si se representa el cociente entre  $\bar{A}$  y la absorbancia a 575 nm,  $Abs_{575}$ , frente a  $\Delta\lambda$ , los datos experimentales pueden ajustarse a una línea recta de ordenada en el origen igual a 1, tal y como se observa en la Figura 4.5. Por tanto para medir la concentración total de almidón no sería preciso hacer un barrido y medir áreas, siendo suficiente medir la absorbancia a 575 nm.



**Figura 4.5** Representación del cociente entre la absorbancia media,  $\bar{A}$ , y la absorbancia a 575 nm,  $Ab_{575}$ , frente al incremento de longitud de onda considerado en torno al máximo,  $\Delta\lambda$

Para determinar el efecto de estas variaciones de la absorbancia sobre la conversión definida en la Ecuación (4.7), teniendo en cuenta la conversión a tiempo de reacción 0,  $x_0$ , se han calculado sus valores a las distintas longitudes de onda, lo que ha permitido las representaciones de  $(x-x_0)$  frente a  $\lambda$  que se incluyen en la Figura 4.6 observándose una tendencia general de aumento de la conversión con  $\lambda$ . Dado que, en todos los casos, este aumento es prácticamente lineal se ha calculado el valor medio de  $(x-x_0)$  para distintos  $\Delta\lambda$ , centrados sobre el valor de 575 nm al que corresponde el máximo de absorbancia, representándose en la Figura 4.7 el cociente entre dichos valores y el correspondiente a la longitud de onda de 575 nm. Se observa que, en general, el cociente es prácticamente igual a la unidad para los distintos valores de  $\Delta\lambda$  utilizados, excepto algunos valores correspondientes a  $\Delta\lambda$  elevados, lo que demuestra que la conversión media de las cadenas de almidón mayoritarias que absorben dentro de un rango de longitudes de onda sería prácticamente equivalente a la conversión calculada a la longitud de onda de 575 nm y por lo tanto ésta es representativa no sólo del polímero que absorbe específicamente a esa  $\lambda$  sino de la media de todas las restantes fracciones que tengan distintos grados de polimerización.

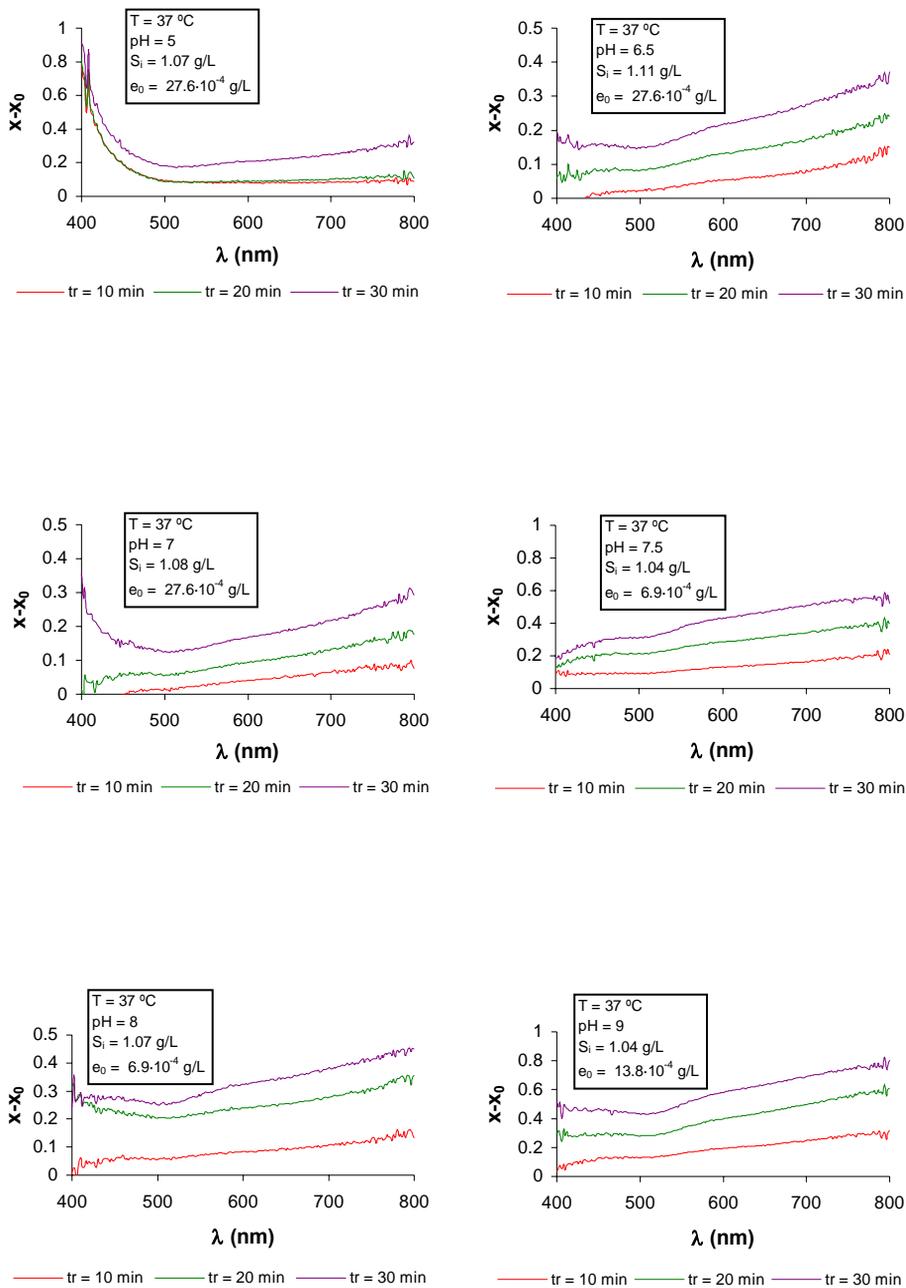


Figura 4.6 Conversión frente a longitud de onda.

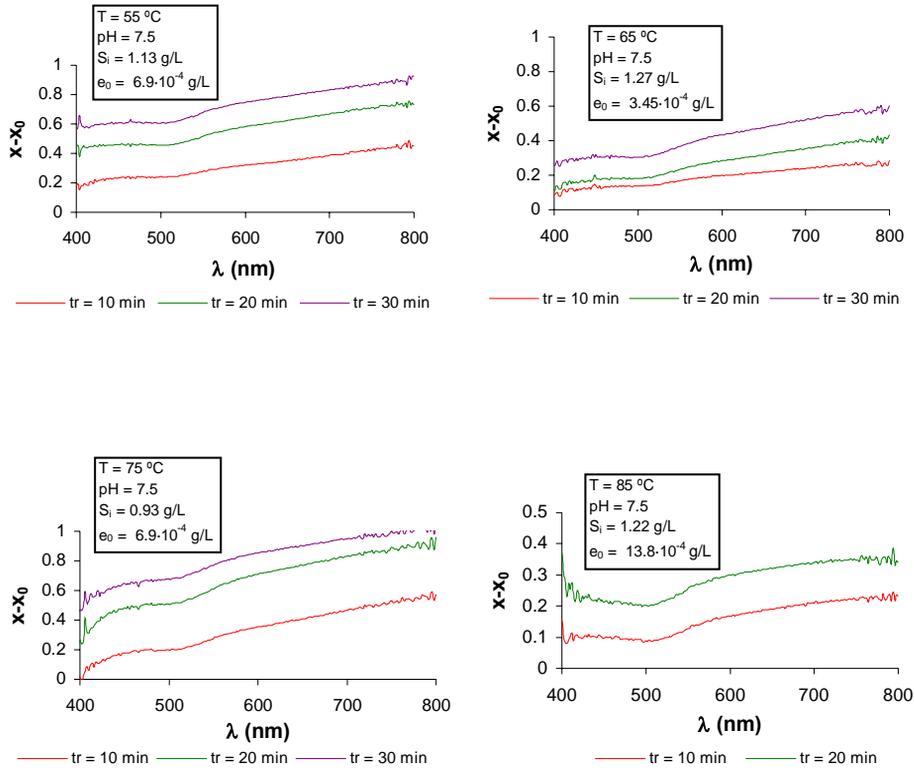


Figura 4.6 (continuación) Conversión frente a longitud de onda.

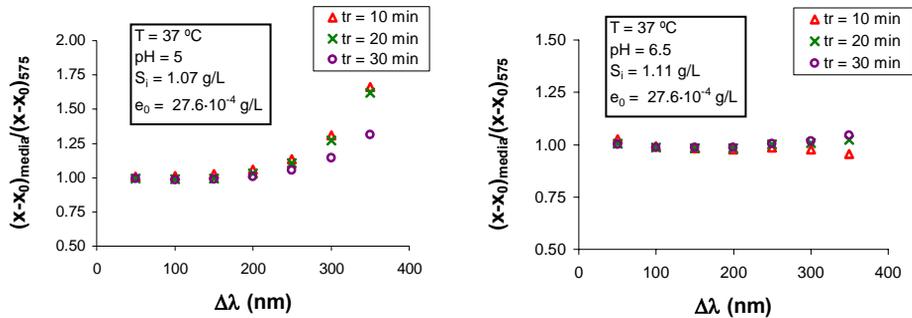


Figura 4.7 Relación entre conversión media y conversión a 575 nm para diferentes valores de  $\Delta\lambda$ .

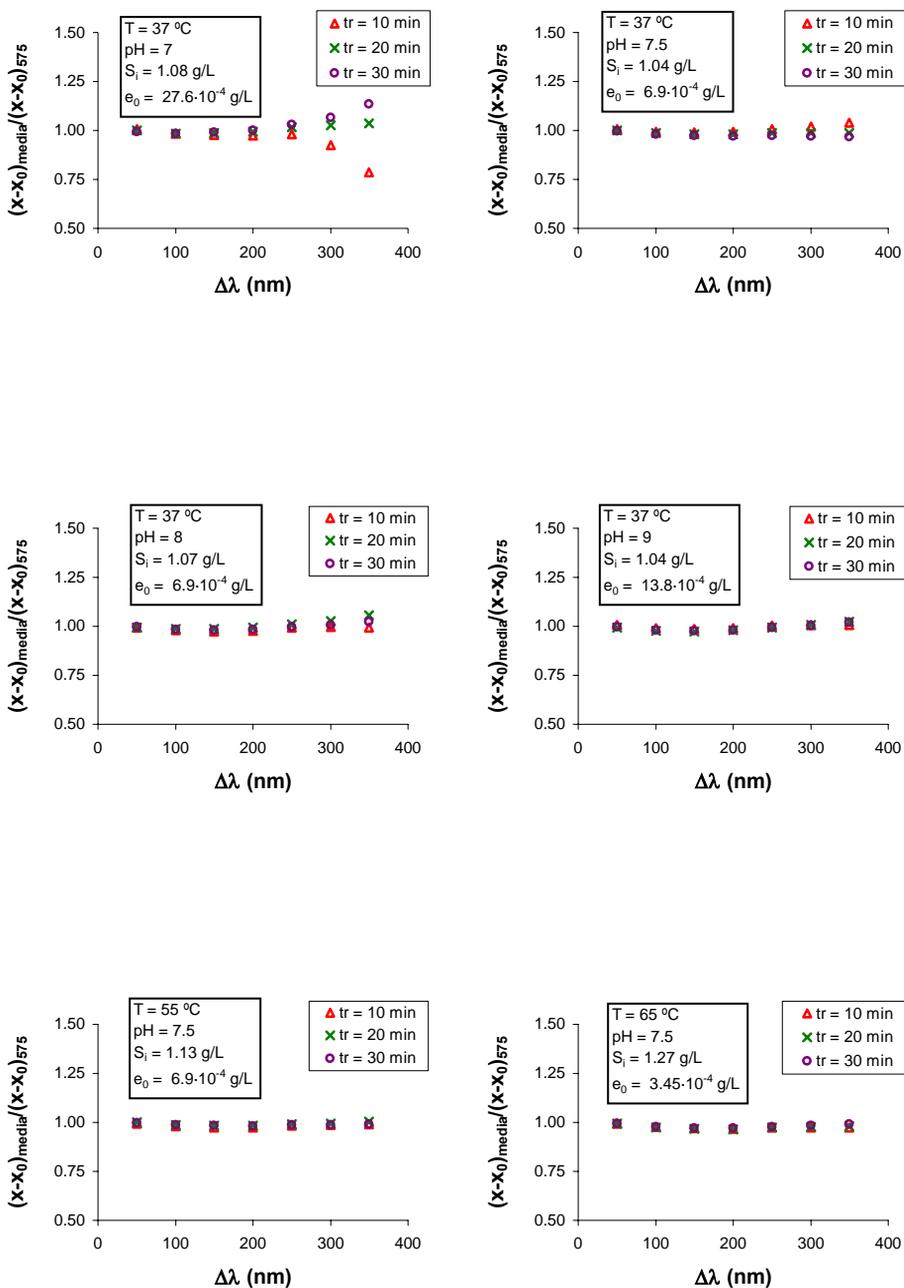
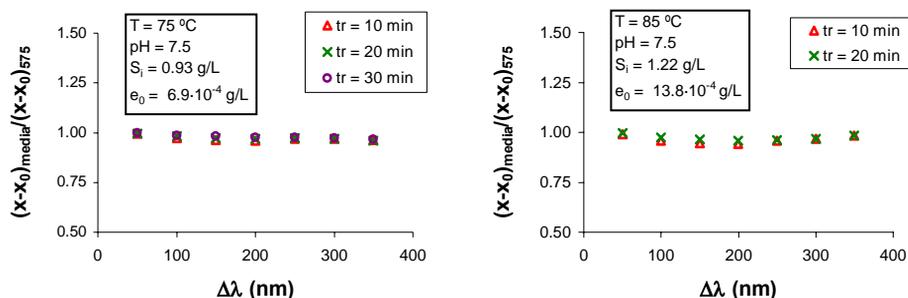


Figura 4.7 (continuación) Relación entre conversión media y conversión a 575 nm para diferentes valores de  $\Delta\lambda$ .



**Figura 4.7 (continuación) Relación entre conversión media y conversión a 575 nm para diferentes valores de  $\Delta\lambda$ .**

#### 4.1.2.2. Medida de actividad enzimática en presencia de tensioactivos: Tabletillas Phadebas®

Para la determinación de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en presencia de tensioactivos se empleó una variante del método de *Novozymes A/S 2002b* basado en el kit “Phadebas® Amylase Test” de PHARMACIA Diagnostics AB. Este método pertenece a la categoría de los métodos cromogénicos (apartado 3.2.4). Como sustrato de reacción se emplean tabletas Phadebas®, las cuales contienen un complejo insoluble de almidón coloreado que, al ser hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa, libera fragmentos azules solubles, pudiendo medirse el color generado espectrofotométricamente a 620 nm, siendo la absorbancia medida función de la actividad de la enzima, *Ceska y col. 1969c*, *Ceska y col. 1969a*, *Ceska y col. 1969b*. Tomando como referencia una enzima de actividad conocida es posible calcular la actividad de la enzima de la muestra problema en presencia o ausencia de tensioactivos.

##### 4.1.2.2.1. Equipos necesarios

Además del material de uso corriente en el laboratorio se ha utilizado:

- Espectrofotómetro UV: equipo de la casa SPECTRONIC UNICAM modelo HELIOS  $\alpha$ .
- Baño termostaticado: baño de la casa SELECTA equipado con un termostato TECTRON.
- Agitador de tubos Vortex Mixer
- Centrifuga para tubos de ensayo: Centrifuga de la casa B. BRAUN modelo SIGMA 2-15.

#### 4.1.2.2.2. Reactivos

- Tabletas Phadebas®: kit “Phadebas® Amylase Test” de PHARMACIA Diagnostics AB. Se emplearon tabletas del mismo lote de fabricación.
- HCl 1 N: Se prepara a partir de ácido clorhídrico 35 %, PA, Panreac.
- NaOH 1 N: Se prepara a partir de hidróxido sódico en lentejas, PA, Merck.
- Tampón 1: Se preparan diariamente 250 mL, disolviendo en agua MiliQ las cantidades indicadas de los siguientes reactivos:
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potasio di-Hidrógeno Fosfato, PA, Panreac): 0.6475 g.
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2-hidrato, PA, Panreac): 4.5190 g.
  - $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Sodio Sulfito, PA-ACS, Panreac): 5g.Disolver en 200 mL de agua MiliQ, ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.05$  con ayuda de HCl o NaOH. Enrasar con agua MiliQ a 250 mL en matraz aforado.
- Tampón 2: Tampón Tris-HCl pH = 7 con  $\text{CaCl}_2$  0.09 M. Se prepara 1 L, disolviendo en agua MiliQ las cantidades indicadas de los siguientes reactivos:
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Calcio Cloruro 2-hidrato, PA-ACS, Panreac): 13.23 g.

- $C_4H_{11}NO_3$  (Tris (Hidroximetil) Aminometano, PA-ACS, Panreac): 1.10 g.  
Disolver en 900 mL de agua MiliQ, ajustar el pH a 7 con HCl. Enrasar con agua MiliQ a 1 L en matraz aforado. El tiempo máximo de almacenamiento a temperatura ambiente es de 2 semanas.
- Disolución madre de enzima: Se empleó la  $\alpha$ -amilasa Termamyl® 300 L Type DX (ver apartado 4.1.2.1.2.). Presenta una actividad declarada por el fabricante de 300 KNU/g. Se preparó una disolución madre de la enzima con una actividad equivalente a 35 NU/mL, disolviendo 97  $\mu$ L de enzima y 1 mL de tampón 2 en 100 mL de agua MiliQ.
- Tensioactivos: Como tensioactivos no iónicos se emplearon alquilpoliglucósidos, Glucopon® 215 CS UP, Glucopon® 600 CS UP y Glucopon® 650 EC de la casa comercial Henkel-Cognis, alcoholes grasos etoxilados, Findet 10/15 y Findet 1214N/23 de Kao Corporation S.A., y nonilfenol (con 9.5 moles de óxido de etileno) cuyo nombre comercial es Findet 9Q/21.5NF de Kao Corporation S.A. Además también se empleó un tensioactivo aniónico, el LAS (alquilbenceno sulfonato lineal) de Kao Corporation S.A. Las fórmulas moleculares se muestran en la Figura 4.8 y sus propiedades se recogen en la Tabla 4.4, donde PM es el peso molecular medio, C es % de carbono, O es % de oxígeno y H es % de hidrógeno, Nc es el número de átomos de carbono medio de las cadenas alquílicas (R), DP es el grado de polimerización medio de los alquilpoliglucósidos, OE es el número de moles medio de óxido de etileno, HLB el balance lipófilo-hidrófilo y CP el punto de enturbiamiento. Para el empleo de estos tensioactivos se prepararon previamente disoluciones madre en agua MiliQ.

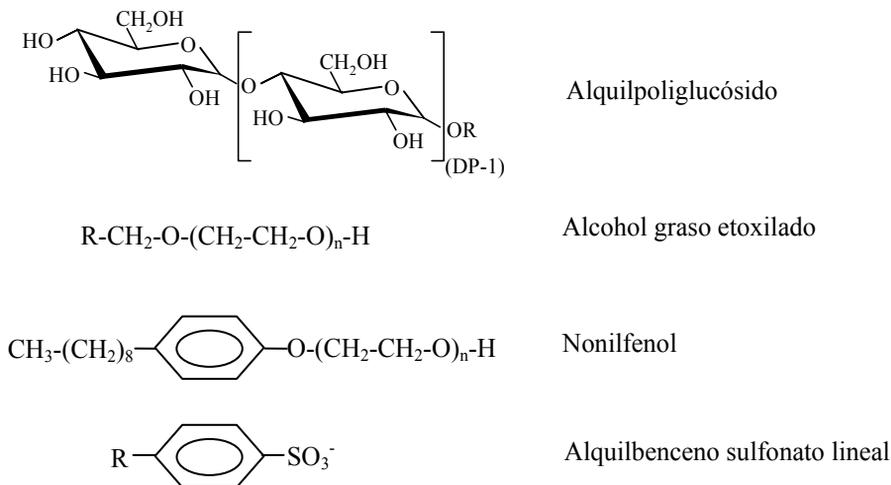


Figura 4.8 Fórmulas moleculares de los tensioactivos.

Tensioactivo	Análisis Elemental <sup>(3)</sup> (%)			Estructura Química <sup>(3)</sup>		
	C	H	O	Nc	DP	OE
Glucopon 215	35.61	10.20	54.19	9.3	1.4	-
Glucopon 600	32.65	8.81	58.54	11.7	1.2	-
Glucopon 650	29.09	10.88	59.83	11.0	1.3	-
Findet 10/15	66.16	14.00	19.84	10 <sup>(1)</sup>	-	2.6
Findet 1214N/23	61.13	12.56	26.31	12.6 <sup>(1)</sup>	-	9.9
Findet 9Q/21.5NF	-	-	-	9 <sup>(1)</sup>	-	9.5 <sup>(1)</sup>
LAS	-	-	-	11-14 <sup>(1)</sup>	-	-

Tensioactivo	PM <sup>(3)</sup> (g/mol)	CP <sup>(2)</sup> (°C)	HLB <sup>(4)</sup>	Humedad <sup>(3)</sup> (%)
Glucopon 215	390	-	13	37.0
Glucopon 600	386	-	11.2	46.6
Glucopon 650	397	-	11.9	50.4
Findet 10/15	273	57.1	9.6	0.423
Findet 1214N/23	629	76.8	14.4	0.309
Findet 9Q/21.5NF	638 <sup>(1)</sup>	58.9	12.8	1.4 <sup>(5)</sup>
LAS	-	-	-	0 <sup>(1)</sup>

Tabla 4.4 Propiedades de los tensioactivos ensayados. <sup>(1)</sup>Datos suministrados por el fabricante. <sup>(2)</sup>Datos de Cuevas Aranda 2001. <sup>(3)</sup>Datos de Bravo Rodríguez y col. *en prensa*. <sup>(4)</sup>Datos de Sabahi 2004. <sup>(5)</sup>Valor de dos muestras secadas en una balanza de infrarrojos de la casa AND, modelo AD-4714A, a 102 °C durante 30 minutos.

4.1.2.2.3. Recta patrón

El procedimiento para obtener la recta de calibrado es el siguiente:

1. Preparar disoluciones de enzima de actividades comprendidas entre 0.35 NU/mL y 2.10 NU/mL, diluyendo el volumen necesario de disolución madre de enzima y 1 mL de tampón 2 en 100 mL de agua MiliQ. El tiempo máximo de almacenamiento de estas disoluciones es de 2 h a 25 °C.
2. Pipetear 1 mL de disolución de enzima de la actividad deseada en un tubo de ensayo.
3. Añadir al tubo de ensayo 5 mL de disolución tampón 1 y mezclar bien. Colocar el tubo en baño termostatzado a  $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  durante 10 minutos.
4. Añadir una tableta Phadebas® y agitar vigorosamente con el vortex-mixer durante 10 segundos (el pH baja de 7.4 a 7.3 tras añadir la tableta).
5. Transcurridos 15 minutos de reacción añadir 1 mL de NaOH 1 N (el pH sube a 12) y agitar 10 segundos con vortex-mixer.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 g.
7. Pipetear el sobrenadante y medir en espectrofotómetro la absorbancia a 620 nm. Como blanco de referencia para la medida diluir 1 mL del tampón 2 en 100 mL de agua MiliQ. Tomar 1 mL de esta disolución y someterla a todo el proceso descrito a partir del paso 2.

Se realizaron 4 medidas para cada una de las disoluciones patrón de enzima (en algunos casos se eliminaron datos anómalos resultando como mínimo 2 medidas para cada patrón). Los resultados se recogen en la Tabla 4.5 y se representan en la Figura 4.9; en ordenadas la absorbancia, frente a la actividad enzimática, NU/mL, en abscisas.

Actividad (NU/mL)	Absorbancia (620 nm)
0	-0.0020
0	0.0020
0	-0.0005
0	0.0005
0.35	0.0570
0.35	0.0570
0.35	0.0615
0.35	0.0655
0.70	0.1310
0.70	0.1240
0.70	0.1275
0.70	0.1315
1.05	0.1800
1.05	0.1895
1.05	0.1815
1.40	0.2635
1.40	0.2725
1.75	0.3500
1.75	0.3330
1.75	0.3425
1.75	0.3455
2.10	0.4100
2.10	0.4080
2.10	0.4055

Tabla 4.5 Recta de calibrado para actividad de  $\alpha$ -amilasa con tabletas Phadebas®.

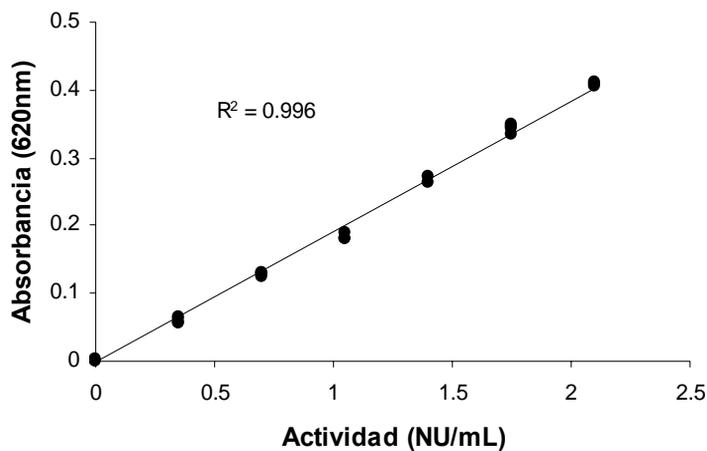


Figura 4.9 Recta de calibrado para actividad de  $\alpha$ -amilasa con tabletas Phadebas®.

La relación obtenida entre la actividad enzimática y la absorbancia es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 0.1918 \cdot \text{Actividad (NU/mL)} \quad \text{Ec. (4.9)}$$

#### 4.1.2.2.4. Medida de actividad en presencia de tensioactivos. Cálculo de la actividad relativa

Para comprobar la influencia de la presencia de un tensioactivo sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, se preparan dos disoluciones de enzima, con y sin tensioactivo, en matraces aforados de 100 mL, diluyendo 1 mL de tampón 2 y los volúmenes necesarios de disoluciones madre de tensioactivo y enzima, para alcanzar las concentraciones finales deseadas, en 100 mL de agua MiliQ. La concentración final de tensioactivo varía según el tensioactivo empleado. El volumen de disolución madre de enzima es 5 mL, de modo que la actividad teórica de ésta es 1.75 NU/mL. Una vez preparadas las disoluciones se pipetea 1 mL de cada una de ellas en dos tubos de ensayo y se someten a todo el proceso descrito en el apartado 4.1.2.2.3 a partir del paso 2. Los ensayos se realizan al menos por duplicado. A partir de la recta de calibrado (Figura 4.9) se calcula la actividad de la enzima con y sin tensioactivo. Se define la actividad relativa como el cociente entre la actividad en presencia de tensioactivo partido por la actividad en su ausencia:

$$\text{AER (\%)} = \frac{\text{AE}_T}{\text{AE}} \cdot 100 \quad \text{Ec. (4.10)}$$

dónde:

AER: Actividad enzimática relativa, %.

AE: Actividad enzimática en ausencia de tensioactivo, NU/mL. Se emplea el valor medio de los experimentos duplicados.

AE<sub>T</sub>: Actividad enzimática en presencia de tensioactivo, NU/mL.

## 4.2. INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO

### 4.2.1. Medida de tensión superficial

Para la medida de la tensión superficial de disoluciones de tensioactivos se utilizó el método de la placa de Wilhelmy (*Padday 1969*).

Para cambiar la forma de la interfase líquido-gas es necesario aplicar energía. El trabajo necesario para dicho cambio es lo que se conoce como tensión superficial. El tensiómetro determina la tensión superficial con la ayuda de una placa de platino rugoso, cuya base tiene 2.0 cm de longitud, que se encuentra suspendida de una balanza de precisión. El recipiente que contiene la muestra asciende hasta que la superficie líquida entra en contacto con la placa. En cuanto se produce el contacto existe una fuerza que actúa sobre la balanza. Si se conoce la longitud de la base de la placa que entra en contacto con el líquido es posible calcular la tensión superficial a partir de la fuerza medida. En la Figura 4.10 se representa un esquema del proceso de contacto entre el líquido y la placa:

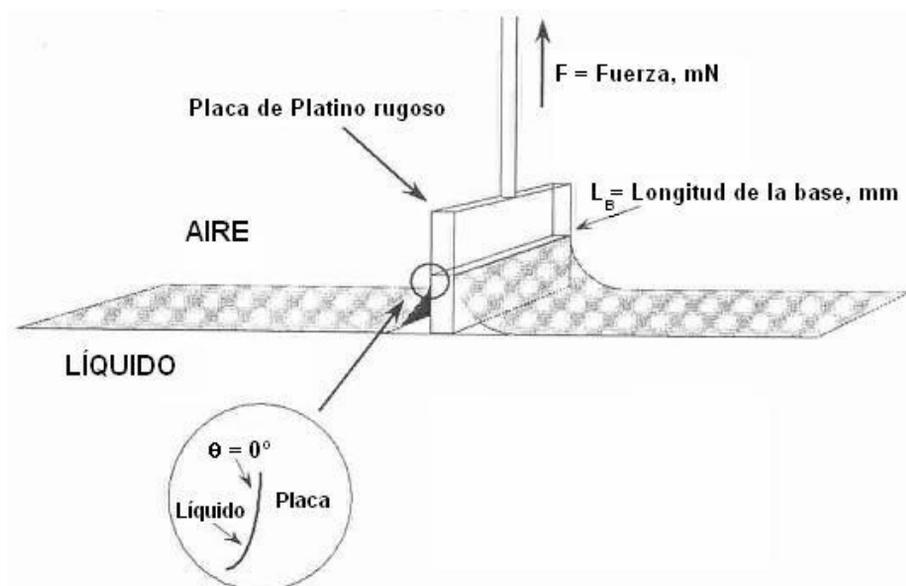


Figura 4.10 Esquema del proceso contacto entre la placa y el líquido.

La expresión para el cálculo de la tensión superficial,  $\sigma$ , es:

$$\sigma = \frac{F}{L_B \cdot \cos \theta} \quad \text{Ec. (4.11)}$$

El equipo está diseñado de forma que el contacto entre la placa y el líquido es óptimo resultando un ángulo de contacto,  $\theta$ , igual a  $0^\circ$  y por tanto  $\cos \theta = 1$ .

#### 4.2.1.1.1. Equipos necesarios

Además del material de uso corriente en el laboratorio se precisa:

- Baño termostatzado: baño de la casa CLIFTON equipado con un termostato modelo TR32T TEMPATRON.
- Tensiómetro: equipo de la casa KRÜSS GmbH modelo Tensiometer K11. El equipo se encuentra conectado al baño termostatzado a fin de mantener la temperatura constante durante la medida.

#### 4.2.1.1.2. Reactivos

- Tensioactivos: Se utilizaron los mismos que en la medida de actividad enzimática en presencia de tensioactivos (apartado 4.1.2.2.2). Para el empleo de estos tensioactivos se prepararon previamente disoluciones madre en agua MiliQ.
- Tampón fosfato 0.1 M: Se prepara según *Sorensen 1909*. Para ello se utiliza  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato, PA, Panreac) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (di-Sodio Hidrógeno Fosfato 12-hidrato, PRS, Panreac). Las cantidades de ambos reactivos se ajustan para conseguir un  $\text{pH} = 7.5$ .

- Disolución de almidón soluble 2 % (p/v): Se usa almidón soluble de patata, PA, de la casa Panreac. Dicha disolución se prepara diariamente y como diluyente se utilizará agua MiliQ o disolución tampón fosfato 0.1 M pH = 7.5. Preparación: Pesar 2 g de almidón. Dispersar el almidón sobre 50 mL de agua o disolución tampón. Calentar hasta ebullición otros 50 mL de agua o disolución tampón. Añadir la disolución de almidón sobre la disolución en ebullición y dejar hervir con agitación magnética durante 3 minutos (ver apartado 4.1.2.1.3.). A continuación enfriar con agua hasta temperatura ambiente y enrasar en matraz aforado de 100 mL con agua MiliQ

#### 4.2.1.1.3. Procedimiento de medida

Se preparan 100 mL de muestra diluyendo en agua MiliQ o tampón fosfato (según el caso) los volúmenes necesarios de disoluciones madre de tensioactivo y almidón (en el caso de que se estén midiendo tensiones superficiales en su presencia) para alcanzar la concentraciones finales deseadas. Se atempera la muestra a 37 °C durante 10 minutos en baño termostatzado. Se coloca la muestra en el tensiómetro y se mide la tensión superficial,  $\sigma$ , a 37 °C durante 17 minutos, a intervalos de 1 minuto, tomando como valor de la medida la media y la desviación estandar, Sd, de los datos correspondientes a los últimos 10 minutos, evitando así las fluctuaciones iniciales que se producen hasta alcanzar un valor de tensión superficial constante.



## **5. RESULTADOS EXPERIMENTALES**



## 5.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

Utilizando el método yodométrico (apartado 4.1.2.1) se ha estudiado la hidrólisis enzimática de almidón soluble con la enzima Termamyl 300 L Type DX. Se programaron experimentos para estudiar la influencia de la concentración de enzima, del pH, de la temperatura y de la concentración de sustrato.

Para el estudio de la influencia de la presencia de tensioactivos sobre la actividad de la enzima se ha empleado el procedimiento basado en las tabletas Phadebas®, descrito en el apartado 4.1.2.2.

### 5.1.1. Influencia de la concentración de enzima

Para analizar la influencia de la concentración de enzima se realizaron experimentos a 37 °C y pH = 6, a tiempos de reacción 0, 10, 20 y 30 minutos, y a distintas concentraciones iniciales de enzima, manteniendo constante la concentración inicial de almidón en aproximadamente 1 g/L. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 5.1 a 5.8, en las que se indican para los distintos tiempos de hidrólisis los valores de la concentración de almidón, la conversión y la actividad.

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.03 g/L		e <sub>0</sub> = 2.76·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0020	0.0284	-
0	1.0313	0	-
10	0.9436	0.0491	1.48
10	0.9631	0.0294	8.89
20	0.9241	0.1164	1.85
20	0.9046	0.1350	2.15
30	0.8462	0.1637	1.68
30	0.8365	0.1733	1.78

**Tabla 5.1**

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.97 g/L		e <sub>0</sub> = 3.588·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9631	0.0050	-
10	0.8754	0.0956	2.17
10	0.9241	0.0453	1.03
20	0.8462	0.1258	1.43
20	0.7780	0.1962	2.22
30	0.7391	0.2364	1.79
30	0.7001	0.2767	2.09

**Tabla 5.2**

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.97 g/L		e <sub>0</sub> = 4.416·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9533	0.0151	-
10	0.8949	0.0755	1.39
10	0.9046	0.0654	1.21
20	0.7391	0.2364	2.18
20	0.7780	0.1962	1.81
30	0.6611	0.3170	1.95
30	0.7001	0.2767	1.70

Tabla 5.3

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.02 g/L		e <sub>0</sub> = 5.52·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9631	0.0661	-
0	1.0118	0.0189	-
10	0.8657	0.1276	1.93
10	0.8754	0.1178	1.78
20	0.7488	0.2841	2.26
20	0.7585	0.2747	2.19
30	0.6611	0.3466	1.78
30	0.6514	0.3562	1.83

Tabla 5.4

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.02 g/L		e <sub>0</sub> = 8.28·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9826	0.0472	-
0	0.9993	0.0311	-
10	0.7975	0.1963	1.98
10	0.7975	0.1963	1.98
20	0.5929	0.4331	2.30
20	0.6027	0.4237	2.25
30	0.5053	0.5006	1.71
30	0.5053	0.5006	1.71

Tabla 5.5

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.02 g/L		e <sub>0</sub> = 11.04·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9728	0.0567	-
0	0.9728	0.0567	-
10	0.7098	0.2846	2.15
10	0.7098	0.2846	2.15
20	0.4761	0.5448	2.17
20	0.4371	0.5820	2.32
30	0.2910	0.7123	1.83
30	0.2910	0.7123	1.83

Tabla 5.6

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.03 g/L		e <sub>0</sub> = 13.8·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.9339	0.0944	-
0	0.9631	0.0661	-
10	0.6514	0.3593	2.22
10	0.6611	0.3497	2.16
20	0.3007	0.7124	2.27
20	0.3689	0.6472	2.06
30	0.2033	0.7990	1.64
30	0.1741	0.8279	1.70

Tabla 5.7

pH = 6		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.02 g/L		e <sub>0</sub> = 27.6·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	0.8949	0.0982	-
0	0.8949	0.0982	-
10	0.2182	0.7854	2.43
10	0.2182	0.7854	2.43
20	0.0670	0.9359	1.49
20	0.0788	0.9247	1.47

Tabla 5.8

**5.1.2. Influencia del pH**

El estudio de la influencia del pH se hizo a valores de éste comprendidos entre 5 y 9. Los tiempos de hidrólisis fueron 0, 10, 20 y 30 minutos, y la temperatura fue de 37°C; la concentración inicial de almidón fue aproximadamente 1 g/L. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 5.9 a 5.14 (los resultados a pH = 6 ya se encuentran recogidos en las Tablas 5.1 a 5.8).

pH = 5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.07 g/L		e <sub>0</sub> = 2.76·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
10	1.0118	0.0546	1.78
10	1.0020	0.0637	2.08
20	0.9728	0.0910	1.48
20	1.0020	0.0637	1.04
30	0.9144	0.1456	1.58
30	0.8852	0.1729	1.88

Tabla 5.9

pH = 6.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.11 g/L		e <sub>0</sub> = 2.76·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0702	0.0351	-
10	1.0410	0.0614	2.07
10	1.0702	0.0351	1.19
20	0.9728	0.1229	2.08
30	0.8754	0.2107	2.37
30	0.8949	0.1932	2.17

Tabla 5.10

pH = 7		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.08 g/L		e <sub>0</sub> = 2.76·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0605	0.0136	-
0	1.0313	0.0407	-
10	0.9728	0.0951	3.11
10	1.0118	0.0589	1.93
20	0.9533	0.1132	1.85
20	0.9436	0.1223	2.00
30	0.8559	0.2038	2.22
30	0.8559	0.2038	2.22

Tabla 5.11

pH = 7.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.04 g/L		e <sub>0</sub> = 0.69·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0313	0.0093	-
10	0.9144	0.1216	15.42
10	0.8949	0.1404	17.79
20	0.7196	0.3088	19.57
20	0.7391	0.2900	18.38
30	0.6027	0.4210	17.79
30	0.5929	0.4304	18.18

Tabla 5.12

pH = 8		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.07 g/L		e <sub>0</sub> = 0.69·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0410	0.0273	-
10	0.9339	0.1274	16.60
10	0.9631	0.1001	13.04
20	0.8365	0.2184	14.23
20	0.8072	0.2457	16.01
30	0.6904	0.3549	15.41
30	0.7293	0.3185	13.83

Tabla 5.13

pH = 9		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.04 g/L		e <sub>0</sub> = 1.38·10 <sup>-3</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	Actividad (UA)
0	1.0215	0.0187	-
0	1.0215	0.0187	-
10	0.8170	0.2152	13.64
10	0.8365	0.1965	12.45
20	0.6222	0.4023	12.75
20	0.6417	0.3836	12.15
30	0.4468	0.5708	12.06
30	0.4371	0.5801	12.25

Tabla 5.14

### 5.1.3. Influencia de la temperatura

Para su estudio inicialmente, con tiempos previos iguales a cero, se realizaron dos series de experimentos, a 65 y 75 °C, pH de 7.5, con una concentración inicial de almidón, S<sub>i</sub>', de aproximadamente 1 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima, e<sub>0</sub>: 6.9·10<sup>-4</sup>, 4.6·10<sup>-4</sup>, 3.45·10<sup>-4</sup>, 2.3·10<sup>-4</sup> y 1.15·10<sup>-4</sup> g/L, y diferentes tiempos de reacción: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Sus resultados se recogen en las Tablas 5.15 a 5.25.

Posteriormente se realizaron experimentos incluyendo también distintos tiempos previos (es decir, manteniendo la enzima durante un tiempo previo a la reacción a la temperatura de ésta), t<sub>p</sub>, en las mismas condiciones de pH, con S<sub>i</sub>' aproximadamente igual a 1 g/L, a las temperaturas de 60, 65, 70 y 75 °C, y diferentes tiempos de reacción, t<sub>r</sub>: 0, 5, 10, 15, 20 minutos. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 5.26 a 5.40.

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 1.06$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0414	0.0200
0	1.0414	0.0200
5	0.9169	0.1372
5	0.9149	0.1391
10	0.7965	0.2505
10	0.7838	0.2624
15	0.6541	0.3845
15	0.6534	0.3851
20	0.5642	0.4691
30	0.3805	0.6419
30	0.3819	0.6406

Tabla 5.15

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 0.95$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9402	0.0098
0	0.9469	0.0028
5	0.8085	0.1485
5	0.8178	0.1387
10	0.6700	0.2944
10	0.6820	0.2818
15	0.5376	0.4338
15	0.5615	0.4087
20	0.4298	0.5474
20	0.4437	0.5327

Tabla 5.16

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 1.07$ g/L $e_0 = 3.45 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0507	0.0165
0	1.0540	0.0134
5	0.9409	0.1193
5	0.9542	0.1068
10	0.8490	0.2053
10	0.8664	0.1890
15	0.7758	0.2738
15	0.7725	0.2769
20	0.6833	0.3604
20	0.6780	0.3654
30	0.5536	0.4818
30	0.5476	0.4874

Tabla 5.17

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 1.08$ g/L $e_0 = 2.30 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0713	0.0056
0	1.0846	-0.0068
5	1.0194	0.0537
5	1.0194	0.0537
10	0.9615	0.1075
10	0.9502	0.1180
15	0.8843	0.1792
15	0.8923	0.1717
20	0.8471	0.2137
20	0.8384	0.2218
30	0.7126	0.3385
30	0.7006	0.3497

Tabla 5.18

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.04$ g/L $e_0 = 6.90 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	$S'$ (g/L)	x
0	1.0094	0.0267
0	1.0201	0.0163
5	0.7246	0.3013
5	0.7293	0.2968
10	0.5303	0.4886
10	0.5369	0.4823
15	0.3719	0.6414
15	0.3732	0.6401
20	0.2641	0.7453
20	0.2807	0.7293
20	0.2807	0.7293

Tabla 5.19

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.02$ g/L $e_0 = 6.90 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	$S'$ (g/L)	x
0	0.9866	0.0345
0	0.9872	0.0339
5	0.7282	0.2874
5	0.7238	0.2917
10	0.5165	0.4945
10	0.5184	0.4927
15	0.3061	0.7004
15	0.3420	0.6653
20	0.2607	0.7449
20	0.2948	0.7115
30	0.1247	0.8780
30	0.1347	0.8682

Tabla 5.20

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 0.95$ g/L $e_0 = 6.90 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	$S'$ (g/L)	x
0	0.9204	0.0282
0	0.9362	0.0116
5	0.6407	0.3235
5	0.6432	0.3209
10	0.4516	0.5232
10	0.4403	0.5351
15	0.2803	0.7041
15	0.2796	0.7048
20	0.2141	0.7740
20	0.2015	0.7873
30	0.0950	0.8997
30	0.1001	0.8943

Tabla 5.21

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.00$ g/L $e_0 = 3.45 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	$S'$ (g/L)	x
0	0.9790	0.0192
0	0.9809	0.0173
5	0.8360	0.1625
5	0.8423	0.1562
10	0.7037	0.2950
10	0.6999	0.2988
15	0.5921	0.4068
15	0.5991	0.3998
20	0.5266	0.4725
20	0.5077	0.4914
30	0.3742	0.6251
30	0.3685	0.6308

Tabla 5.22

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.10$ g/L $e_0 = 2.30 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0767	0.0185
0	1.0893	0.0070
5	0.9948	0.0931
5	1.0061	0.0828
10	0.9116	0.1690
10	0.9136	0.1671
15	0.8437	0.2309
15	0.8650	0.2114
20	0.7865	0.2830
20	0.7911	0.2788
30	0.6867	0.3740
30	0.6680	0.3910

Tabla 5.23

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.11$ g/L $e_0 = 1.15 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0613	0.0412
0	1.0767	0.0273
5	1.0274	0.0718
10	0.9822	0.1127
10	1.0001	0.0965
15	0.9602	0.1325
15	0.9629	0.1301
20	0.9309	0.1590
20	0.9209	0.1680
30	0.8657	0.2179
30	0.8544	0.2281

Tabla 5.24

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 75 °C		
$S_i' = 1.09$ g/L $e_0 = 1.15 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0780	0.0125
0	1.0806	0.0101
5	0.9975	0.0862
5	1.0221	0.0637
10	0.9775	0.1045
10	0.9562	0.1240
15	0.9223	0.1551
15	0.9502	0.1295
20	0.9063	0.1698
20	0.8817	0.1923
30	0.8231	0.2460
30	0.8244	0.2448

Tabla 5.25

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 60 °C		
$S_i' = 1.04$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0247	0.0154
5	0.9010	0.1343
5	0.9056	0.1299
10	0.7772	0.2532
10	0.7845	0.2462
15	0.6580	0.3678
15	0.6714	0.3549
20	0.5675	0.4547
20	0.5709	0.4515

Tabla 5.26

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 60 °C		
$S_i' = 1.00$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0021	0.0013
0	1.0034	0.0000
5	0.8843	0.1187
5	0.8976	0.1054
10	0.7778	0.2248
10	0.7679	0.2347
15	0.6560	0.3462
15	0.6514	0.3508
20	0.5509	0.4510
20	0.5589	0.4430

Tabla 5.27

pH = 7.5 $t_p = 40$ min    T = 60 °C		
$S_i' = 0.98$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9808	0.0020
5	0.8697	0.1151
10	0.7778	0.2086
10	0.7665	0.2201
15	0.6913	0.2966
15	0.6986	0.2892
20	0.6294	0.3596
20	0.6367	0.3522

Tabla 5.28

pH = 7.5 $t_p = 80$ min    T = 60 °C		
$S_i' = 0.96$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9442	0.0118
0	0.9548	0.0007
5	0.8950	0.0633
5	0.9016	0.0564
10	0.8391	0.1218
10	0.8357	0.1254
15	0.7858	0.1776
15	0.8025	0.1601
20	0.7293	0.2367
20	0.7552	0.2096

Tabla 5.29

pH = 7.5 $t_p = 20$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 0.99$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9782	0.0163
0	0.9868	0.0077
5	0.9063	0.0886
10	0.8011	0.1944
10	0.7978	0.1977
15	0.6980	0.2981
15	0.6946	0.3015
20	0.6075	0.3891

Tabla 5.30

pH = 7.5 $t_p = 20$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 1.01$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0094	0.0039
0	1.0074	0.0059
5	0.8996	0.1123
5	0.9229	0.0893
10	0.8224	0.1885
10	0.8104	0.2003
15	0.7120	0.2974
15	0.7046	0.3047
20	0.5968	0.4111
20	0.6115	0.3966

Tabla 5.31

pH = 7.5 $t_p = 40$ min    T = 65 °C		
$S_i' = 0.96$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9595	0.0042
0	0.9575	0.0062
5	0.9089	0.0567
5	0.9083	0.0573
10	0.8164	0.1527
10	0.7985	0.1713
15	0.7426	0.2293
15	0.7326	0.2396
20	0.6521	0.3232
20	0.6407	0.3350

Tabla 5.32

pH = 7.5 $t_p = 0$ min    T = 70 °C		
$S_i' = 1.01$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	1.0028	0.0088
5	0.8570	0.1530
5	0.8670	0.1431
10	0.7193	0.2891
10	0.7100	0.2982
15	0.5842	0.4226
15	0.5888	0.4180
20	0.4890	0.5167
20	0.4857	0.5199

Tabla 5.33

pH = 7.5 $t_p = 10$ min    T = 70 °C		
$S_i' = 0.98$ g/L $e_0 = 4.60 \cdot 10^{-4}$ g/L		
$t_r$ (min)	S' (g/L)	x
0	0.9768	0.0069
0	0.9835	0.0001
5	0.8923	0.0928
5	0.8930	0.0921
10	0.7832	0.2037
10	0.7712	0.2159
15	0.6787	0.3099
15	0.6847	0.3038
20	0.5962	0.3938
20	0.5855	0.4047

Tabla 5.34

pH = 7.5    t <sub>p</sub> = 20 min    T = 70 °C		
S <sub>i</sub> ' = 0.99 g/L    e <sub>0</sub> = 4.60·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.9895	0.0016
0	0.9887	0.0024
5	0.9016	0.0903
5	0.9309	0.0607
10	0.8464	0.1460
15	0.7945	0.1984
15	0.7911	0.2018
20	0.7139	0.2797
20	0.7206	0.2729

Tabla 5.35

pH = 7.5    t <sub>p</sub> = 5 min    T = 75 °C		
S <sub>i</sub> ' = 1.00 g/L    e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.9897	0.0144
0	1.0187	-0.0144
5	0.8675	0.1361
10	0.7131	0.2899
10	0.7049	0.2980
15	0.6123	0.3903
15	0.6016	0.4009
20	0.4869	0.5151
20	0.4926	0.5095

Tabla 5.36

pH = 7.5    t <sub>p</sub> = 5 min    T = 75 °C		
S <sub>i</sub> ' = 1.05 g/L    e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0354	0.0114
0	1.0394	0.0076
5	0.9149	0.1265
5	0.8597	0.1792
10	0.7639	0.2706
10	0.7492	0.2847
15	0.6268	0.4015
15	0.6268	0.4015
20	0.5589	0.4664
20.5	0.5030	0.5197

Tabla 5.37

pH = 7.5    t <sub>p</sub> = 5 min    T = 75 °C		
S <sub>i</sub> ' = 1.05 g/L    e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0188	0.0292
0	1.0460	0.0032
5	0.9083	0.1345
5	0.9349	0.1091
10	0.7599	0.2759
10	0.7379	0.2968
15	0.6607	0.3704
15	0.6680	0.3634
20	0.5462	0.4795
20	0.5283	0.4966

Tabla 5.38

pH = 7.5 $t_p = 7.5$ min    T = 75 °C S <sub>i</sub> ' = 1.02 g/L $e_0 = 6.90 \cdot 10^{-4}$ g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0181	0.0013
5	0.9203	0.0973
5	0.9449	0.0731
10	0.8337	0.1822
10	0.8111	0.2044
15	0.7412	0.2729
15	0.7565	0.2579
20	0.6328	0.3793
20	0.6367	0.3754

Tabla 5.39

pH = 7.5 $t_p = 7.5$ min    T = 75 °C S <sub>i</sub> ' = 1.07 g/L $e_0 = 6.90 \cdot 10^{-4}$ g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0547	0.0151
0	1.0580	0.0120
5	0.9735	0.0909
5	0.9708	0.0934
10	0.8471	0.2089
15	0.7339	0.3147
15	0.7545	0.2954

Tabla 5.40

#### **5.1.4. Influencia de la concentración de sustrato**

Para analizar la influencia de la concentración de sustrato se realizaron experimentos a 37, 55, 65 y 75 °C, a un pH de 7.5, con diferentes concentraciones iniciales de almidón, S<sub>i</sub>', 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima, e<sub>0</sub>, 13.8·10<sup>-4</sup>, 6.9·10<sup>-4</sup>, 4.6·10<sup>-4</sup>, 3.45·10<sup>-4</sup>, 2.3·10<sup>-4</sup>, 1.53·10<sup>-4</sup>, 1.15·10<sup>-4</sup> y 0.575·10<sup>-4</sup> g/L, y con tiempos de reacción de 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 5.41 a 5.70 (Para 65 y 75 °C con S<sub>i</sub>' de 1 g/L los resultados ya se encuentran recogidos en las Tablas 5.15 a 5.25).

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 2.07 g/L		e <sub>0</sub> = 13.80·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	2.0463	0.0125
0	2.0683	0.0019
5	1.9159	0.0754
5	1.9245	0.0713
10	1.7641	0.1487
10	1.7668	0.1474
15	1.6157	0.2203
15	1.6184	0.2190
20	1.4840	0.2839
20	1.4833	0.2842
30	1.2344	0.4043
30	1.2138	0.4143

Tabla 5.41

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 2.05 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	2.0204	0.0160
0	2.0064	0.0228
5	1.9798	0.0358
5	1.9744	0.0384
10	1.9185	0.0656
10	1.9012	0.0741
15	1.8700	0.0893
15	1.8560	0.0961
20	1.7834	0.1314
20	1.7741	0.1360
30	1.6204	0.2108
30	1.6530	0.1949

Tabla 5.42

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 1.04 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0508	-0.0093
0	1.0313	0.0093
10	0.9144	0.1216
10	0.8949	0.1404
20	0.7196	0.3088
20	0.7391	0.2900
30	0.6027	0.4210
30	0.5930	0.4304

Tabla 5.43

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.95 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.9651	-0.0162
0	0.9576	-0.0083
10	0.8221	0.1344
10	0.8095	0.1476
15	0.7597	0.2001
15	0.7654	0.1941
20	0.6835	0.2803
20	0.6810	0.2829
30	0.5499	0.4210
30	0.5392	0.4322

Tabla 5.44

pH = 7.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.97 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.9746	-0.0004	
0	0.9809	-0.0068	
5	0.9456	0.0294	
5	0.9399	0.0353	
10	0.9091	0.0669	
10	0.9160	0.0598	
15	0.8782	0.0986	
15	0.8713	0.1057	
20	0.8624	0.1148	
20	0.8379	0.1399	
30	0.7969	0.1820	
30	0.7768	0.2027	

Tabla 5.45

pH = 7.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.47 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.4838	-0.0226	
0	0.4907	-0.0372	
5	0.4113	0.1306	
10	0.3534	0.2530	
10	0.3445	0.2719	
15	0.2872	0.3929	
15	0.2822	0.4035	
20	0.2286	0.5168	
20	0.2406	0.4914	
30	0.1461	0.6912	
30	0.1499	0.6831	

Tabla 5.46

pH = 7.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.48 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.4813	-0.0041	
0	0.4913	-0.0249	
5	0.4460	0.0696	
5	0.4416	0.0787	
10	0.4126	0.1392	
10	0.4120	0.1405	
15	0.3666	0.2352	
15	0.3666	0.2352	
20	0.3483	0.2734	
20	0.3332	0.3049	
30	0.2614	0.4547	
30	0.2708	0.4351	

Tabla 5.47

pH = 7.5		T = 37 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.22 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.2292	-0.0397	
0	0.2305	-0.0456	
5	0.1959	0.1114	
5	0.1965	0.1086	
10	0.1669	0.2429	
10	0.1681	0.2375	
15	0.1398	0.3658	
15	0.1360	0.3831	
20	0.1152	0.4774	
20	0.1013	0.5405	
30	0.0661	0.7002	
30	0.0680	0.6915	

Tabla 5.48

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.20 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.2192	-0.1192
0	0.2179	-0.1126
5	0.1568	0.1994
5	0.1580	0.1933
10	0.1102	0.4373
10	0.1184	0.3955
15	0.0698	0.6436
15	0.0749	0.6176
20	0.0409	0.7912
20	0.0421	0.7850
30	0.0150	0.9234
30	0.0106	0.9459

Tabla 5.49

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.26 g/L		e <sub>0</sub> = 4.60·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.2544	0.0088
0	0.2570	-0.0014
5	0.2192	0.1459
5	0.2015	0.2149
10	0.1845	0.2811
10	0.1795	0.3006
15	0.1467	0.4284
15	0.1461	0.4307
20	0.1171	0.5437
20	0.1026	0.6002
30	0.0648	0.7475
30	0.0585	0.7721

Tabla 5.50

pH = 7.5		T = 37 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.25 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.2576	-0.0150
0	0.2412	0.0497
5	0.2236	0.1190
5	0.2091	0.1761
10	0.1896	0.2530
10	0.1908	0.2482
15	0.1650	0.3499
15	0.1593	0.3723
20	0.1373	0.4590
20	0.1259	0.5039
30	0.0856	0.6627
30	0.0843	0.6678

Tabla 5.51

pH = 7.5		T = 55 °C
S <sub>i</sub> ' = 1.06 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.0514	0.0080
0	1.0500	0.0093
5	0.9802	0.0751
5	0.9868	0.0689
10	0.8970	0.1536
10	0.8870	0.1631
15	0.8510	0.1971
15	0.8224	0.2240
20	0.7758	0.2680
20	0.7486	0.2937
30	0.6514	0.3854
30	0.6554	0.3816

Tabla 5.52

pH = 7.5		T = 55 °C	
S <sub>i</sub> ' = 1.08 g/L		e <sub>0</sub> = 2.30·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	1.0673	0.0108	
0	1.0780	0.0009	
5	1.0148	0.0595	
5	1.0274	0.0478	
10	0.9835	0.0885	
10	0.9975	0.0755	
15	0.9515	0.1182	
15	0.9416	0.1273	
20	0.8717	0.1921	
20	0.9103	0.1563	
30	0.8005	0.2581	
30	0.8184	0.2415	

Tabla 5.53

pH = 7.5		T = 55 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.55 g/L		e <sub>0</sub> = 4.60·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.5449	0.0079	
0	0.5369	0.02250	
5	0.4684	0.14720	
5	0.4497	0.1812	
10	0.3672	0.3314	
10	0.3592	0.3460	
15	0.2767	0.4962	
15	0.2840	0.4829	
20	0.2095	0.6186	
20	0.2195	0.6004	
30	0.1163	0.7883	
30	0.1156	0.7895	

Tabla 5.54

pH = 7.5		T = 55 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.55 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.5482	0.0037	
0	0.5449	0.0097	
5	0.4810	0.1258	
5	0.4804	0.1269	
10	0.4111	0.2529	
10	0.4051	0.2638	
15	0.3339	0.3931	
15	0.3466	0.3701	
20	0.2880	0.4766	
20	0.2847	0.4826	
30	0.2095	0.6193	
30	0.1829	0.6676	

Tabla 5.55

pH = 7.5		T = 55 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.27 g/L		e <sub>0</sub> = 2.30·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.2654	0.0148	
0	0.2727	-0.0122	
5	0.2268	0.1581	
5	0.2288	0.1507	
10	0.1948	0.2769	
10	0.1935	0.2817	
15	0.1576	0.4150	
15	0.1556	0.4224	
20	0.1290	0.5212	
20	0.1256	0.5338	
30	0.0857	0.6819	
30	0.0877	0.6745	

Tabla 5.56

pH = 7.5		T = 55 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.24 g/L		e <sub>0</sub> = 1.53·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.2348	0.0180
0	0.2401	-0.0042
5	0.2168	0.0933
10	0.2068	0.1351
10	0.2042	0.1460
15	0.1882	0.2129
15	0.1789	0.2518
20	0.1542	0.3551
20	0.1489	0.3772
30	0.1183	0.5052
30	0.1156	0.5165

Tabla 5.57

pH = 7.5		T = 65 °C
S <sub>i</sub> ' = 1.99 g/L		e <sub>0</sub> = 6.90·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.9578	0.0138
0	1.9658	0.0097
5	1.8121	0.0871
5	1.7788	0.1039
10	1.5984	0.1948
10	1.6117	0.1881
15	1.4474	0.2709
15	1.4187	0.2853
20	1.2484	0.3711
20	1.2417	0.3745
30	0.9642	0.5143
30	0.9329	0.5300

Tabla 5.58

pH = 7.5		T = 65 °C
S <sub>i</sub> ' = 2.01 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.9804	0.0159
0	1.9811	0.0156
5	1.8733	0.0691
5	1.8859	0.0629
10	1.7894	0.1108
10	1.8081	0.1015
15	1.6989	0.1558
15	1.7129	0.1488
20	1.6051	0.2024
20	1.6084	0.2008
30	1.4700	0.2695
30	1.4560	0.2765

Tabla 5.59

pH = 7.5		T = 65 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.55 g/L		e <sub>0</sub> = 2.30·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.5349	0.0296
0	0.5396	0.0210
5	0.4757	0.1370
5	0.4823	0.1250
10	0.4205	0.2371
10	0.4171	0.2433
15	0.3672	0.3338
15	0.3612	0.3447
20	0.3200	0.4194
20	0.3093	0.4389
30	0.2434	0.5584
30	0.2374	0.5693

Tabla 5.60

pH = 7.5			T = 65 °C		
S <sub>i</sub> ' = 0.55 g/L			e <sub>0</sub> = 1.53·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x			
0	0.5402	0.0182			
0	0.5396	0.0193			
5	0.5003	0.0907			
5	0.4930	0.1040			
10	0.4597	0.1645			
10	0.4611	0.1619			
15	0.4151	0.2455			
15	0.4271	0.2237			
20	0.3898	0.2915			
20	0.3825	0.3048			
30	0.3226	0.4137			
30	0.3086	0.4391			

Tabla 5.61

pH = 7.5			T = 65 °C		
S <sub>i</sub> ' = 0.26 g/L			e <sub>0</sub> = 2.30·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x			
0	0.2634	0.0038			
0	0.2667	-0.0087			
5	0.2088	0.2103			
5	0.2088	0.2103			
10	0.1662	0.3714			
10	0.1656	0.3737			
15	0.1349	0.4898			
15	0.1330	0.4970			
20	0.1043	0.6055			
20	0.1083	0.5904			
30	0.0644	0.7564			
30	0.0684	0.7413			

Tabla 5.62

pH = 7.5			T = 65 °C		
S <sub>i</sub> ' = 0.25 g/L			e <sub>0</sub> = 1.53·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x			
0	0.2461	0.0199			
0	0.2521	-0.0040			
5	0.2068	0.1764			
5	0.2102	0.1629			
10	0.1789	0.2875			
10	0.1815	0.2772			
15	0.1516	0.3963			
15	0.1642	0.3461			
20	0.1303	0.4811			
20	0.1349	0.4628			
30	0.0917	0.6348			
30	0.0917	0.6348			

Tabla 5.63

pH = 7.5			T = 65 °C		
S <sub>i</sub> ' = 0.28 g/L			e <sub>0</sub> = 1.15·10 <sup>-4</sup> g/L		
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x			
0	0.2754	0.0011			
0	0.2720	0.0134			
5	0.2428	0.1193			
5	0.2414	0.1244			
10	0.2108	0.2354			
10	0.2155	0.2184			
15	0.1922	0.3029			
15	0.1942	0.2956			
20	0.1676	0.3921			
20	0.1676	0.3921			
30	0.1436	0.4791			
30	0.1330	0.5176			

Tabla 5.64

pH = 7.5		T = 75 °C
S <sub>i</sub> ' = 1.96 g/L		e <sub>0</sub> = 1.15·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.9145	0.0243
0	1.9332	0.0147
5	1.8859	0.0388
5	1.8640	0.0500
10	1.8460	0.0592
10	1.8167	0.0741
15	1.7894	0.0880
15	1.7881	0.0887
20	1.7668	0.0995
20	1.7581	0.1040
30	1.7229	0.1219
30	1.7156	0.1256

Tabla 5.65

pH = 7.5		T = 75 °C
S <sub>i</sub> ' = 1.98 g/L		e <sub>0</sub> = 0.575·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	1.9645	0.0096
0	1.9811	0.0012
5	1.9525	0.0156
5	1.9565	0.0136
10	1.9119	0.0361
10	1.9119	0.0361
15	1.8853	0.0495
20	1.8779	0.0532
20	1.8779	0.0532
30	1.8467	0.0689
30	1.8513	0.0666

Tabla 5.66

pH = 7.5		T = 75 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.51 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.5084	0.0122
0	0.5084	0.0122
5	0.3735	0.2743
5	0.3905	0.2413
10	0.2992	0.4187
10	0.3130	0.3919
15	0.2381	0.5374
15	0.2595	0.4958
20	0.1914	0.6281
20	0.2116	0.5889
30	0.1373	0.7332
30	0.1612	0.6868

Tabla 5.67

pH = 7.5		T = 75 °C
S <sub>i</sub> ' = 0.54 g/L		e <sub>0</sub> = 1.53·10 <sup>-4</sup> g/L
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x
0	0.5329	0.0184
0	0.5422	0.0013
5	0.4750	0.1251
5	0.4757	0.1238
10	0.4358	0.1973
15	0.3998	0.2636
15	0.4038	0.2562
20	0.3779	0.3039
20	0.3805	0.2991
30	0.3206	0.4095
30	0.3246	0.4021

Tabla 5.68

pH = 7.5		T = 75 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.23 g/L		e <sub>0</sub> = 3.45·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.2141	0.0659	
0	0.2116	0.0768	
5	0.1322	0.4232	
5	0.1272	0.4450	
10	0.0900	0.6073	
10	0.0957	0.5825	
15	0.0705	0.6924	
15	0.0661	0.7116	
20	0.0503	0.7805	
20	0.0528	0.7696	
30	0.0264	0.8848	
30	0.0377	0.8355	

Tabla 5.69

pH = 7.5		T = 75 °C	
S <sub>i</sub> ' = 0.28 g/L		e <sub>0</sub> = 1.53·10 <sup>-4</sup> g/L	
t <sub>r</sub> (min)	S' (g/L)	x	
0	0.2714	0.0168	
0	0.2747	0.0049	
5	0.2321	0.1592	
5	0.2341	0.1520	
10	0.2102	0.2385	
10	0.2082	0.2458	
15	0.1795	0.3498	
15	0.1795	0.3498	
20	0.1596	0.4218	
20	0.1616	0.4146	
30	0.1356	0.5088	

Tabla 5.70

**5.1.5. Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática**

Para analizar la influencia de la presencia de tensioactivos sobre la actividad de la α-amilasa se realizaron experimentos a 37 °C y un pH de 7.3, empleando el método de las tabletas Phadebas® descrito en el apartado 4.1.2.2. Como tensioactivos no iónicos se emplearon alquilpoliglucósidos, Glucocon 215, Glucocon 600 y Glucocon 650, alcoholes grasos etoxilados, Findet 10/15 y Findet 1214N/23, y nonilfenol etoxilado (con 9.5 moles de oxido de etileno) cuyo nombre comercial es Findet 9Q/21.5NF. Además también se empleó un tensioactivo aniónico, el LAS (alquilbenzeno sulfonato lineal). Para cada tensioactivo se midió la actividad relativa de la enzima a dos concentraciones, C, diferentes. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.71.

Tensioactivo	pH = 7.3		T = 37 °C	
	C (g/L)	AE <sub>T</sub> (NU/ml)	AE (NU/ml)	AER (%)
Glucopon 215	1.2	1.92	1.75	109.6
Glucopon 215	1.2	1.80	1.75	102.7
Glucopon 215	0.6	1.80	1.75	102.7
Glucopon 215	0.6	1.77	1.75	101.1
Glucopon 600	0.10	1.92	1.75	109.6
Glucopon 600	0.10	1.86	1.75	106.4
Glucopon 600	0.05	1.88	1.75	107.5
Glucopon 600	0.05	1.88	1.75	107.5
Glucopon 650	0.3	1.89	1.75	108.0
Glucopon 650	0.3	1.69	1.75	96.8
Glucopon 650	0.1	1.71	1.75	97.9
Glucopon 650	0.1	1.87	1.75	107.0
Findet 10/15	1.0	0.69	1.75	39.6
Findet 10/15	1.0	0.71	1.75	40.6
Findet 10/15	0.2	1.36	1.75	77.5
Findet 10/15	0.2	1.36	1.75	77.5
Findet 1214N/23	0.060	1.67	1.78	94.0
Findet 1214N/23	0.060	1.69	1.78	95.2
Findet 1214N/23	0.060	1.57	1.79	87.4
Findet 1214N/23	0.060	1.90	1.79	105.7
Findet 1214N/23	0.060	1.68	1.78	94.3
Findet 1214N/23	0.060	1.64	1.78	92.0
Findet 1214N/23	0.006	1.74	1.79	96.9
Findet 1214N/23	0.006	1.76	1.79	98.1
Findet 1214N/23	0.006	1.74	1.78	97.8
Findet 1214N/23	0.006	1.74	1.78	97.8
Findet 9Q/21.5NF	0.025	1.57	1.67	94.1
Findet 9Q/21.5NF	0.025	1.48	1.67	88.5
Findet 9Q/21.5NF	0.015	1.51	1.67	90.0
Findet 9Q/21.5NF	0.015	1.50	1.67	89.4
LAS	0.8	1.05	1.67	62.9
LAS	0.8	1.06	1.67	63.2
LAS	0.2	0.97	1.67	58.3
LAS	0.2	1.10	1.67	65.7

Tabla 5.71

AE<sub>T</sub>: Actividad enzimática en presencia de tensioactivo, NU/mL

AE: Actividad enzimática en ausencia de tensioactivo, NU/mL

AER: Actividad enzimática relativa, %

## 5.2. INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO

### 5.2.1. Tensiones superficiales en presencia y ausencia de almidón

A fin de cuantificar las posibles interacciones entre el almidón y diferentes tensioactivos se realizaron medidas de tensiones superficiales de alquilpoliglicósidos, alcoholes grasos etoxilados, nonilfenol y LAS, a diferentes concentraciones de tensioactivo y en presencia o ausencia de almidón. Las tensiones superficiales se midieron a 37° C en disoluciones de los tensioactivos en agua MiliQ. Además para el tensioactivo Findet 1214N/23 se realizaron medidas con disoluciones en tampón fosfato 0.1 M y pH de 7.5. Para cada concentración de tensioactivo se realizaron dos medidas. Los resultados obtenidos para la tensión superficial, valor medio y desviación estándar, se recogen en las Tablas 5.72 a 5.88.

Glucopon 215		
S <sub>i</sub> ' = 0 g/L		T = 37 °C
C (g/L)	σ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.02	58.1	0.5
0.02	56.3	0.1
0.05	46.0	0.5
0.05	45.3	0.4
0.10	37.8	0.6
0.10	36.4	0.3
0.20	30.7	0.4
0.20	30.7	0.2
0.50	28.2	0.2
0.50	28.8	0.1
1.50	27.8	0.1
1.50	27.5	0.2
3.00	27.7	0.2
3.00	27.2	0.2
5.00	27.3	0.4
5.00	27.4	0.3

Tabla 5.72

Glucopon 215		
S <sub>i</sub> ' = 1 g/L		T = 37 °C
C (g/L)	σ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.05	50.5	0.3
0.05	49.3	0.5
0.10	42.8	0.6
0.10	40.2	0.2
0.15	36.6	0.6
0.15	34.9	0.1
0.20	33.9	0.3
0.20	32.6	0.3
0.50	28.0	0.5
0.50	28.7	0.3
1.50	26.6	0.2
1.50	27.8	0.3
3.00	27.7	0.1
3.00	27.6	0.1
5.00	27.9	0.4
5.00	27.9	0.1

Tabla 5.73

Glucopon 600		
$S_i' = 0$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.0025	54.8	0.6
0.0025	55.8	0.5
0.0060	45.5	0.2
0.0060	46.0	0.2
0.0100	39.1	0.2
0.0100	39.0	0.2
0.0200	32.1	0.2
0.0200	31.5	0.2
0.0300	27.8	0.1
0.0300	27.9	0.1
0.1000	27.4	0.4
0.1000	27.7	0.6
0.2000	27.7	0.2
0.2000	28.0	0.2
0.5000	28.0	0.2
0.5000	27.8	0.3
1.0000	27.9	0.3
1.0000	27.4	0.2

Tabla 5.74

Glucopon 600		
$S_i' = 1$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.0025	57.1	0.3
0.0025	57.2	0.1
0.0060	55.7	0.3
0.0060	55.4	0.2
0.0100	52.3	0.4
0.0100	52.0	0.2
0.0200	48.4	0.3
0.0200	48.6	0.1
0.0300	44.9	0.2
0.0300	44.5	0.1
0.0400	39.7	0.1
0.0400	39.8	0.1
0.0600	35.0	0.1
0.0600	35.2	0.2
0.0800	32.6	0.1
0.0800	32.7	0.2
0.1000	30.5	0.1
0.1000	30.9	0.1
0.2000	28.1	0.2
0.2000	27.8	0.1
0.3000	27.8	0.2
0.3000	27.5	0.1
0.5000	27.9	0.1
0.5000	27.6	0.1
1.0000	28.1	0.1
1.0000	27.9	0.1

Tabla 5.75

Glucopon 650 $S_i' = 0 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			Glucopon 650 $S_i' = 1 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			Glucopon 650 $S_i' = 3 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$		
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)	C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)	C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.001	64.0	0.2	0.005	56.4	0.2	0.005	62.8	0.4
0.001	64.8	0.3	0.005	57.1	0.2	0.005	62.5	0.5
0.005	49.8	0.4	0.020	45.4	0.1	0.020	51.1	0.2
0.005	48.7	0.1	0.020	45.3	0.2	0.020	51.9	0.4
0.010	44.5	0.1	0.070	36.4	0.2	0.070	43.5	0.2
0.010	44.9	0.2	0.070	35.7	0.2	0.070	43.3	0.2
0.020	39.1	0.1	0.150	30.0	0.2	0.200	33.7	0.5
0.020	38.6	0.3	0.150	31.2	0.2	0.200	33.4	0.2
0.030	35.7	0.3	0.200	28.4	0.2	1.000	27.1	0.2
0.030	35.9	0.2	0.200	28.5	0.2	1.000	27.2	0.1
0.100	28.8	0.2	0.500	27.5	0.4	1.500	27.6	0.1
0.100	28.9	0.3	0.500	27.4	0.3	1.500	27.8	0.1
0.200	27.5	0.2	1.000	27.2	0.3	3.000	27.7	0.2
0.200	27.4	0.2	1.000	28.4	0.2	3.000	28.1	0.2
0.300	27.5	0.2	1.500	28.4	0.2			
0.300	27.4	0.2	1.500	28.1	0.3			
0.600	28.0	0.1						
0.600	28.2	0.1						
1.500	27.9	0.1						
1.500	27.7	0.2						
3.000	28.2	0.2						
3.000	28.4	0.4						

Tabla 5.76

Tabla 5.77

Tabla 5.78

Findet 10/15		
$S_i' = 0$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.0025	60.9	0.2
0.0025	61.2	0.3
0.0100	50.2	0.2
0.0100	49.7	0.3
0.0300	38.8	0.2
0.0300	38.6	0.3
0.1000	29.5	0.2
0.1000	29.1	0.2
0.5000	25.2	0.2
0.5000	24.9	0.2
1.0000	25.1	0.2
1.0000	25.8	0.2
1.5000	25.0	0.3
1.5000	25.8	0.2
3.0000	25.6	0.2
3.0000	25.5	0.3

Tabla 5.79

Findet 10/15		
$S_i' = 1$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.01	53.8	0.3
0.01	53.9	0.6
0.03	44.9	0.2
0.03	44.2	0.2
0.05	39.0	0.3
0.05	38.7	0.2
0.10	31.9	0.2
0.10	32.1	0.2
0.30	25.8	0.3
0.30	24.2	0.1
1.00	25.2	0.1
1.00	24.8	0.1
1.50	25.1	0.2
1.50	25.1	0.2
3.00	25.3	0.1
3.00	25.1	0.2

Tabla 5.80

Findet 1214N/23		
$S_i' = 0 \text{ g/L}$		$T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.00005	68.1	0.2
0.00005	67.7	0.3
0.00010	63.5	0.4
0.00010	63.4	0.1
0.00050	55.9	0.2
0.00050	56.1	0.2
0.00100	50.3	0.4
0.00100	50.4	0.2
0.00100	49.3	0.5
0.00100	49.2	0.4
0.00250	45.3	0.3
0.00250	45.4	0.6
0.00250	45.6	0.4
0.00250	46.1	0.4
0.00500	41.3	0.4
0.00500	40.9	0.3
0.00500	41.8	0.6
0.00500	41.7	0.3
0.01000	35.7	0.2
0.01000	35.8	0.2
0.01000	35.6	0.3
0.01000	35.6	0.1
0.02000	32.5	0.4
0.02000	32.3	0.2
0.04000	32.6	0.2
0.04000	32.1	0.1
0.06000	32.2	0.4
0.06000	31.9	0.2
0.08000	31.9	0.3
0.08000	33.1	0.1
0.10000	32.1	0.3
0.10000	32.3	0.3
0.20000	31.2	0.5
0.20000	32.8	0.4

Tabla 5.81

Findet 1214N/23		
$S_i' = 1 \text{ g/L}$		$T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.00005	69.2	0.3
0.00005	68.6	0.1
0.00010	66.6	0.3
0.00010	65.7	0.3
0.00050	56.4	0.2
0.00050	56.3	0.2
0.00100	54.6	0.2
0.00100	54.7	0.4
0.00100	54.6	0.2
0.00100	54.7	0.4
0.00250	51.5	0.3
0.00250	52.1	0.4
0.00250	51.5	0.3
0.00250	52.1	0.4
0.00500	48.9	0.3
0.00500	48.9	0.1
0.00500	48.9	0.3
0.00500	48.9	0.1
0.01000	48.0	0.4
0.01000	47.7	0.3
0.02000	44.0	0.3
0.02000	43.5	0.2
0.02000	43.2	0.3
0.02000	43.4	0.2
0.03000	40.7	0.3
0.03000	40.6	0.2
0.03500	38.2	0.2
0.03500	37.8	0.1
0.05000	35.7	0.1
0.05000	35.5	0.1
0.08000	32.4	0.2
0.08000	32.9	0.1
0.10000	32.4	0.2
0.10000	31.6	0.2
0.20000	33.1	0.1
0.20000	32.7	0.2

Tabla 5.82

Findet 1214N/23 T. fosfato 0.1 M, pH =7.5		
$S_i' = 0$ g/L		T = 37 °C
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.00005	63.7	0.5
0.00005	63.1	0.5
0.00010	62.5	0.5
0.00010	60.0	0.2
0.00050	52.5	0.2
0.00050	52.8	0.2
0.00100	46.8	0.3
0.00100	46.4	0.1
0.00250	38.9	0.3
0.00250	39.8	0.3
0.00500	35.9	0.2
0.00500	36.0	0.1
0.01000	34.0	0.5
0.01000	33.4	0.1
0.02000	31.9	0.2
0.02000	32.1	0.3
0.04000	31.4	0.2
0.04000	31.2	0.2
0.06000	31.8	0.3
0.06000	31.7	0.2
0.08000	32.6	0.4
0.08000	32.8	0.2
0.10000	31.8	0.2
0.10000	31.5	0.2

Tabla 5.83

Findet 1214N/23 T. fosfato 0.1 M, pH =7.5		
$S_i' = 1$ g/L		T = 37 °C
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.00005	68.4	0.2
0.00005	68.2	0.3
0.00010	62.1	0.4
0.00010	60.7	0.4
0.00050	56.8	0.3
0.00050	56.4	0.2
0.00100	54.1	0.3
0.00100	54.7	0.1
0.00250	51.4	0.3
0.00250	51.7	0.1
0.00500	51.4	0.2
0.00500	51.9	0.1
0.01000	51.3	0.3
0.01000	50.0	0.2
0.02000	45.0	0.2
0.02000	45.3	0.1
0.04000	39.7	0.1
0.04000	40.1	0.4
0.06000	33.7	0.3
0.06000	33.7	0.1
0.08000	32.8	0.2
0.08000	32.8	0.4
0.10000	32.2	0.2
0.10000	32.2	0.2
0.15000	32.5	0.3
0.15000	32.8	0.2

Tabla 5.84

Findet 9Q/21.5NF		
$S_i' = 0 \text{ g/L}$		
$T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$		
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.0025	48.0	0.2
0.0025	47.9	0.2
0.0040	44.4	0.2
0.0040	44.8	0.1
0.0060	42.2	0.2
0.0060	42.3	0.2
0.0100	38.8	0.3
0.0100	38.1	0.1
0.0200	33.7	0.1
0.0200	33.8	0.1
0.0300	30.5	0.2
0.0300	29.9	0.1
0.1000	30.4	0.3
0.1000	29.5	0.2
0.2000	30.7	0.1
0.2000	29.9	0.2
0.5000	30.0	0.2
0.5000	30.4	0.2

Tabla 5.85

Findet 9Q/21.5NF		
$S_i' = 1 \text{ g/L}$		
$T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$		
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.0025	47.3	0.1
0.0025	46.9	0.1
0.0040	47.0	0.1
0.0040	46.5	0.2
0.0060	44.8	0.2
0.0060	44.7	0.2
0.0100	40.7	0.2
0.0100	40.2	0.2
0.0200	35.8	0.3
0.0200	35.6	0.2
0.1000	30.0	0.1
0.1000	29.7	0.2
0.2000	30.8	0.2
0.2000	30.4	0.3
0.5000	30.1	0.3
0.5000	30.6	0.2

Tabla 5.86

LAS		
$S_i' = 0$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.004	69.0	0.2
0.004	69.5	0.3
0.010	69.2	0.1
0.010	69.4	0.2
0.040	58.5	0.3
0.040	58.0	0.2
0.100	51.0	0.2
0.100	51.0	0.2
0.300	42.5	0.3
0.300	43.5	0.4
0.800	34.7	0.2
0.800	35.0	0.1
2.000	33.9	0.2
2.000	33.7	0.2
3.000	32.7	0.1
3.000	32.9	0.2
4.000	33.0	0.2
4.000	33.1	0.2
5.000	33.1	0.2
5.000	32.4	0.2

Tabla 5.87

LAS		
$S_i' = 1$ g/L	T = 37 °C	
C (g/L)	$\sigma$ (mN/m)	Sd (mN/m)
0.01	63.8	0.1
0.01	63.3	0.2
0.04	52.8	0.1
0.04	52.6	0.2
0.10	46.2	0.1
0.10	46.0	0.1
0.30	38.2	0.2
0.30	38.4	0.1
0.80	34.6	0.3
0.80	34.5	0.1
2.00	34.0	0.1
2.00	34.0	0.1
3.00	33.3	0.3
3.00	33.3	0.2
4.00	32.5	0.1
4.00	33.0	0.2
5.00	32.4	0.2
5.00	32.4	0.1

Tabla 5.88

## **6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**



## 6.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

### 6.1.1. Influencia de la concentración de enzima

En las Tablas 5.1 a 5.8 del apartado 5 de resultados experimentales se ha recogido la variación de la conversión de almidón en función del tiempo para diferentes valores iniciales de concentración de enzima. Dichos datos han sido representados en las Figuras 6.1 a 6.8. En todos los casos, excepto Figura 6.8, se observa que los puntos experimentales se pueden ajustar mediante líneas rectas que pasan muy cerca del origen, lo cual indica que el método de parada de la reacción es bastante efectivo y no es necesario prácticamente tener en cuenta el tiempo de parada de la reacción enzimática; esto además se corrobora por el hecho de que algunas ordenadas en el origen presentan valores negativos aunque también muy próximos a cero, lo cual sería debido a pequeñas desviaciones del método, ya que no es posible que existan tiempos de parada negativos. En el caso de la Figura 6.8 se observa una tendencia curvilínea debido a que se alcanza rápidamente una elevada conversión por la alta concentración inicial de enzima.

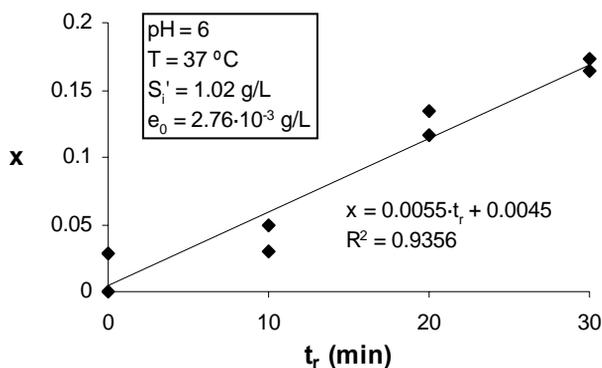


Figura 6.1

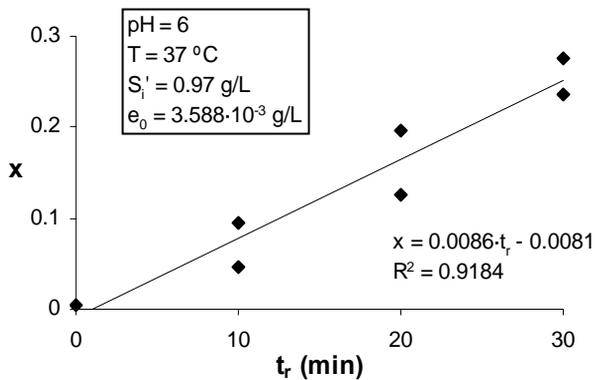


Figura 6.2

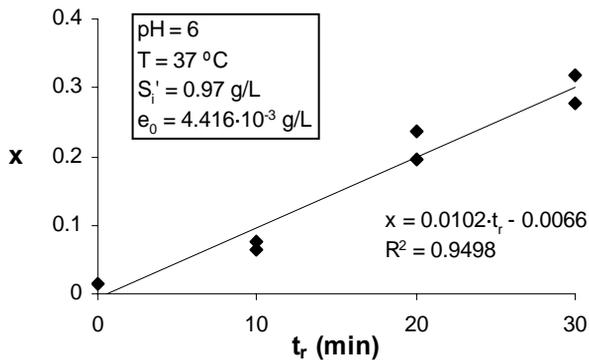


Figura 6.3

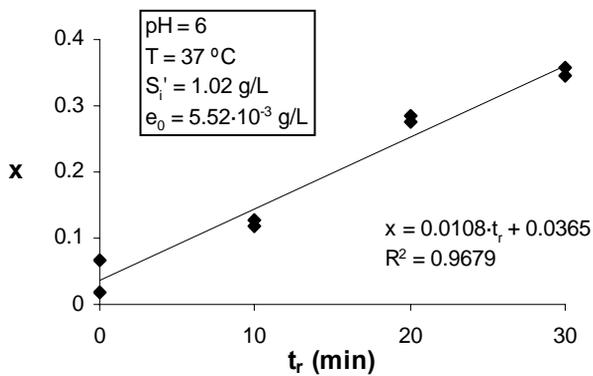


Figura 6.4

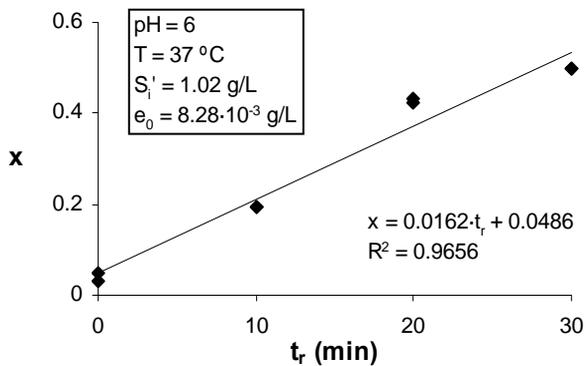


Figura 6.5

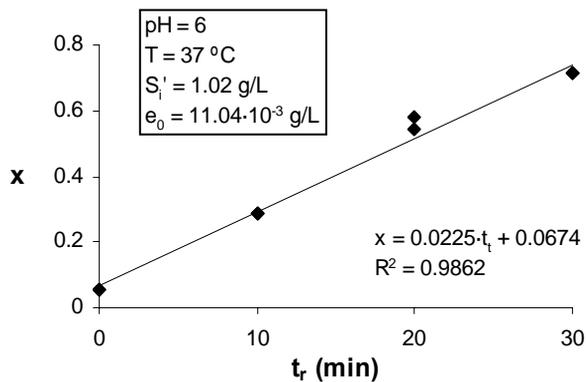


Figura 6.6

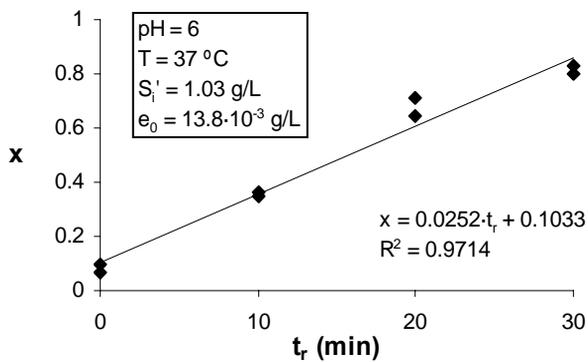


Figura 6.7

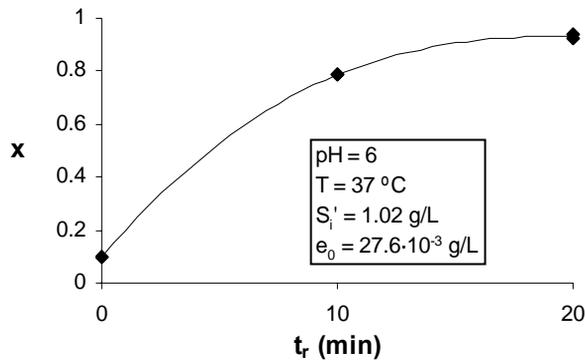


Figura 6.8

Si se observa los valores de la actividad (exceptuando los experimentos realizados a la mayor concentración de enzima) reflejados en las Tablas 5.1 a 5.7, se deduce que para cada concentración inicial de enzima, no existe una variación definida con respecto al tiempo y que permanece prácticamente constante independientemente de la concentración de enzima inicial, resultando un valor medio de 1.88 UA para la enzima ensayada. Todo ello sugiere que es aceptable la no desactivación de la enzima a pH = 6 y 37 °C.

Por otra parte, a partir de los datos de las Tablas 5.1 a 5.7 se han determinado los correspondientes a la intensidad de tratamiento, “ $y$ ”, producto de la concentración inicial de enzima por el tiempo de reacción,  $e_0 \cdot t_r$ , que es el valor a considerar cuando la desactivación enzimática es despreciable. Los valores obtenidos junto con la concentración de almidón hidrolizado,  $x \cdot S_i$ , la conversión y la actividad se recogen en la Tabla 6.1, donde se confirma que no existe variación definida de la actividad, en este caso, frente a la intensidad de tratamiento.

pH = 6		T = 37 °C	
y (g/L·min)	x·S <sub>i</sub> (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0276	0.0421	0.0491	1.48
0.0276	0.0252	0.0294	0.889
0.0359	0.0779	0.0956	2.17
0.0359	0.0369	0.0453	1.03
0.0442	0.0615	0.0755	1.39
0.0442	0.0533	0.0654	1.21
0.0552	0.0997	0.1164	1.85
0.0552	0.1157	0.1351	2.15
0.0552	0.1093	0.1276	1.93
0.0552	0.1009	0.1178	1.78
0.0718	0.1025	0.1258	1.43
0.0718	0.1599	0.1962	2.22
0.0828	0.1682	0.1963	1.98
0.0828	0.1682	0.1963	1.98
0.0828	0.1402	0.1637	1.68
0.0828	0.1485	0.1733	1.78
0.0883	0.1927	0.2365	2.18
0.0883	0.1599	0.1962	1.81
0.1076	0.1927	0.2365	1.79
0.1076	0.2255	0.2767	2.09
0.1104	0.2434	0.2841	2.26
0.1104	0.2354	0.2747	2.19
0.1104	0.2439	0.2846	2.15
0.1104	0.2439	0.2846	2.15
0.1325	0.2583	0.3170	1.95
0.1325	0.2255	0.2767	1.70
0.1380	0.3109	0.3593	2.22
0.1380	0.3026	0.3497	2.16
0.1656	0.3711	0.4331	2.30
0.1656	0.3631	0.4238	2.25
0.1656	0.2969	0.3466	1.78
0.1656	0.3052	0.3562	1.83
0.2208	0.4668	0.5448	2.17
0.2208	0.4987	0.5820	2.32
0.2484	0.4289	0.5006	1.71
0.2484	0.4289	0.5006	1.71
0.2760	0.6164	0.7125	2.27
0.2760	0.5500	0.6472	2.06
0.3312	0.6103	0.7123	1.83
0.3312	0.6103	0.7123	1.83
0.4140	0.6913	0.7990	1.64
0.4140	0.7163	0.8279	1.70

**Tabla 6.1** Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la concentración de almidón hidrolizado, la conversión y la actividad.

Definiendo la velocidad de reacción como la velocidad de desaparición de almidón y teniendo en cuenta la definición realizada para la conversión (Ecuación (4.7)) se deduce que:

$$r = -\frac{dS}{dt} = S_i \cdot \frac{dx}{dt} = e_0 \cdot f(x, S_i) \quad \text{Ec. (6.1)}$$

dónde la última igualdad corresponde a las expresiones cinéticas habitualmente consideradas para las reacciones enzimáticas en ausencia de desactivación apreciable de la enzima. A partir de la Ecuación (6.1), introduciendo la intensidad de tratamiento y teniendo en cuenta que todos los experimentos se han realizado con prácticamente igual concentración inicial de almidón se obtiene que:

$$\frac{r}{e_0} = \frac{S_i \cdot dx}{e_0 \cdot dt} = \frac{d(x \cdot S_i)}{dy} = f(x, S_i) \quad \text{Ec. (6.2)}$$

Al representar el producto de la conversión por la concentración inicial de almidón (es decir, la concentración de almidón hidrolizado) frente a la intensidad de tratamiento, Figura 6.9, se observa que todos los puntos experimentales se pueden ajustar aceptablemente a una línea recta que pasa por el origen, incluyendo datos hasta conversiones de aproximadamente 0.8, de forma que la pendiente determina el valor de la última derivada de la Ecuación (6.2) y por lo tanto del cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima, que resulta de 1.90 g almidón / (g enzima · min).

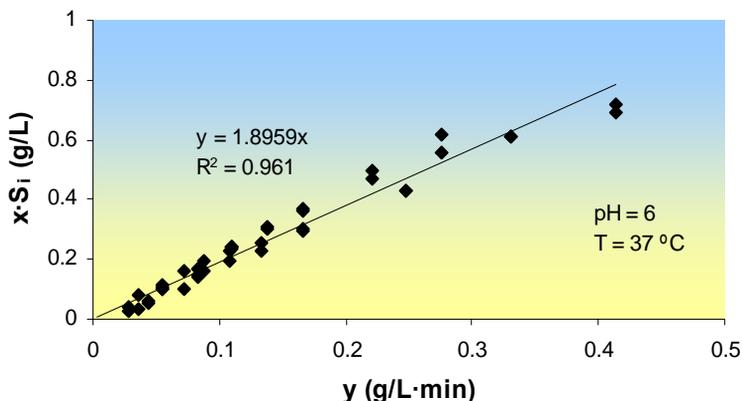


Figura 6.9 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la concentración de almidón hidrolizado

### 6.1.2. Influencia del pH

Para comprobar si a los diferentes pH estudiados se mantiene la relación de proporcionalidad directa entre “x·Si” (concentración de almidón hidrolizado) e “y” (intensidad de tratamiento), a partir de los datos recogidos en las Tablas 5.9 a 5.14 se han determinado los de las Tablas 6.2 a 6.7, cuyos resultados se representan en las Figuras 6.10 a 6.15. Análogamente al apartado 6.1.1 se observa que los puntos experimentales se pueden ajustar aceptablemente mediante líneas rectas que pasan por el origen.

pH = 5    Si' = 1.07 g/L    T = 37 °C			
y (g/L·min)	x·Si (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0276	0.0491	0.0546	1.78
0.0276	0.0573	0.0637	2.08
0.0552	0.0818	0.0910	1.48
0.0552	0.0573	0.0637	1.04
0.0828	0.1309	0.1456	1.58
0.0828	0.1554	0.1729	1.88

Tabla 6.2

pH = 6.5    Si' = 1.11 g/L    T = 37 °C			
y (g/L·min)	x·Si (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0276	0.0573	0.0614	2.07
0.0276	0.0327	0.0351	1.19
0.0552	0.1145	0.1229	2.08
0.0828	0.1964	0.2107	2.37
0.0828	0.1800	0.1932	2.17

Tabla 6.3

pH = 7 $S_i' = 1.08 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			
y (g/L·min)	$x \cdot S_i$ (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0276	0.0859	0.0951	3.11
0.0276	0.0532	0.0589	1.93
0.0552	0.1023	0.1133	1.85
0.0552	0.1105	0.1223	2.00
0.0828	0.1841	0.2038	2.22
0.0828	0.1841	0.2038	2.22

Tabla 6.4

pH = 7.5 $S_i' = 1.04 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			
y (g/L·min)	$x \cdot S_i$ (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0069	0.1064	0.1216	15.42
0.0069	0.1227	0.1404	17.79
0.0138	0.2700	0.3088	19.57
0.0138	0.2536	0.2900	18.38
0.0207	0.3682	0.4211	17.79
0.0207	0.3764	0.4304	18.18

Tabla 6.5

pH = 8 $S_i' = 1.07 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			
y (g/L·min)	$x \cdot S_i$ (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0069	0.1145	0.1274	16.60
0.0069	0.0900	0.1001	13.04
0.0138	0.1964	0.2184	14.23
0.0138	0.2209	0.2457	16.01
0.0207	0.3191	0.3549	15.41
0.0207	0.2864	0.3185	13.83

Tabla 6.6

pH = 9 $S_i' = 1.04 \text{ g/L}$ $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$			
y (g/L·min)	$x \cdot S_i$ (g/L)	x	Actividad (UA)
0.0138	0.1882	0.2152	13.64
0.0138	0.1718	0.1965	12.45
0.0276	0.3518	0.4023	12.75
0.0276	0.3355	0.3836	12.15
0.0414	0.4991	0.5708	12.06
0.0414	0.5073	0.5801	12.25

Tabla 6.7

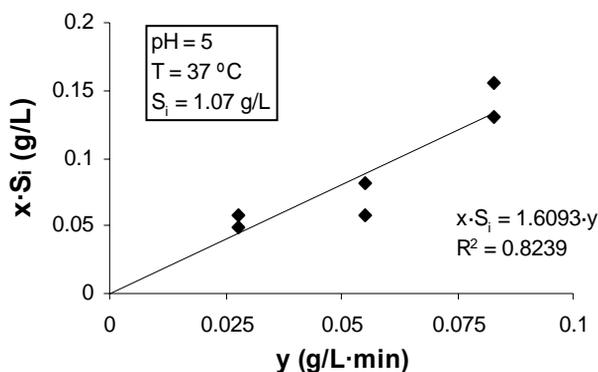


Figura 6.10

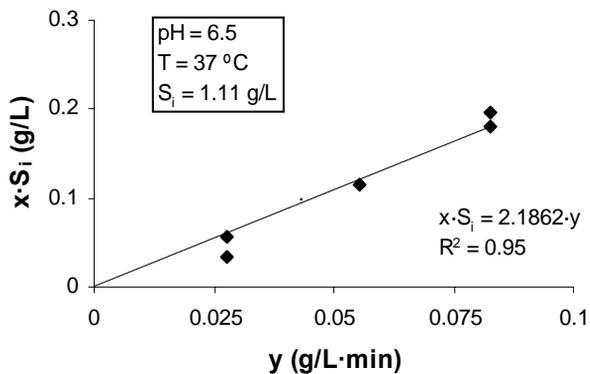


Figura 6.11

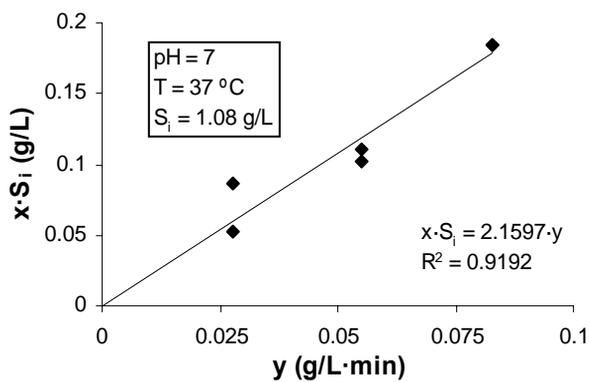


Figura 6.12

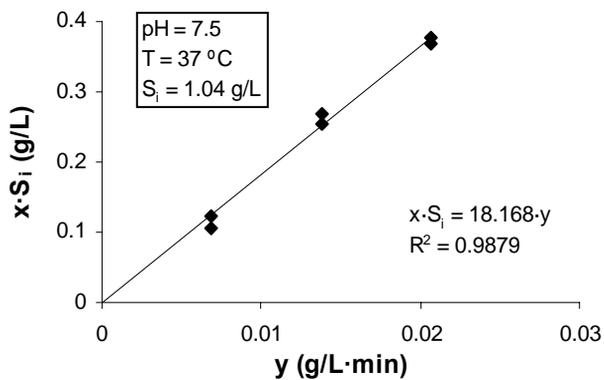


Figura 6.13

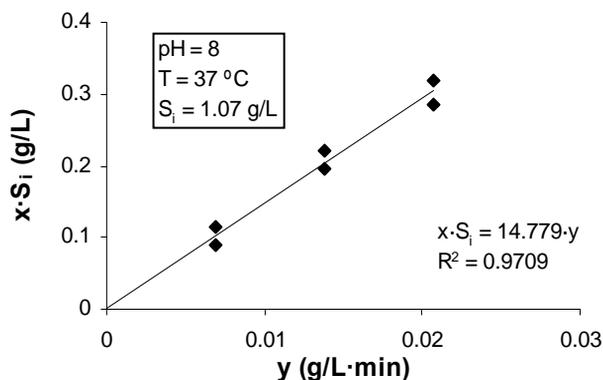


Figura 6.14

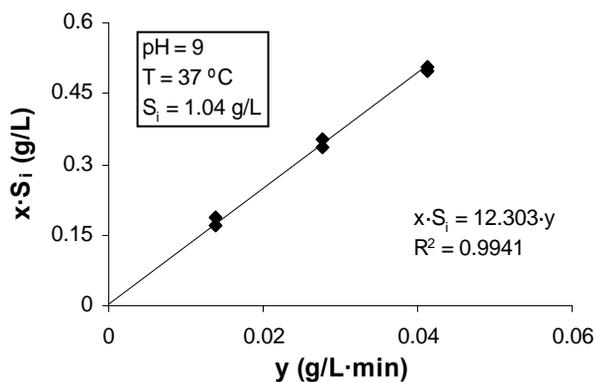


Figura 6.15

Los valores obtenidos para la pendiente de estas rectas, cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima, se recogen en la Tabla 6.8 y se representan frente al pH en la Figura 6.16. Se observa que los valores de  $r/e_0$  presentan un máximo,  $18.2\text{ min}^{-1}$ , a pH igual a 7.5 con reducciones muy significativas a pH inferiores,  $2.2\text{ min}^{-1}$  a pH igual a 7, y menos acusadas a pH superiores,  $12.3\text{ min}^{-1}$  a pH igual a 9, por lo que el control del pH debe ser muy eficiente, especialmente para que no se produzcan disminuciones ya que conducirían a reducciones drásticas de la velocidad de reacción.

Por otra parte, en las Tablas 6.2 a 6.7 también se han incluido para cada pH el valor de la actividad correspondiente a cada intensidad de tratamiento, deduciéndose que no existen variaciones definidas, por lo que se ha determinado un valor medio para cada pH, valores que junto con el obtenido a pH = 6 en el apartado 6.1.1 se recogen en la Tabla 6.8 y se representan (como actividad relativa:  $\text{Actividad}_{\text{media}}/\text{Actividad}_{\text{máxima}} \cdot 100$ ) frente al pH en Figura 6.17 obteniéndose una variación de la actividad con el pH análoga a la establecida para el cociente  $r/e_0$ .

T = 37 °C			
pH	$r/e_0$ g almidón / (g enzima · min)	Actividad <sub>media</sub> UA	Actividad <sub>relativa</sub> %
5	1.6093	1.64	9
6	1.8959	1.88	11
6.5	2.1862	1.98	11
7	2.1597	2.22	12
7.5	18.1680	17.85	100
8	14.7790	14.86	83
9	12.3030	12.55	70

Tabla 6.8 Influencia del pH sobre el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima y sobre la actividad .

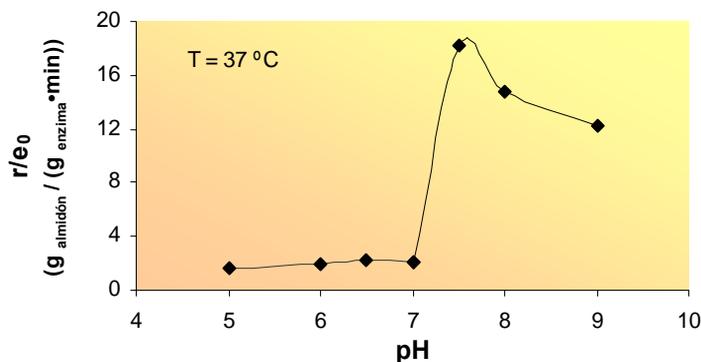


Figura 6.16 Influencia del pH sobre el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima.

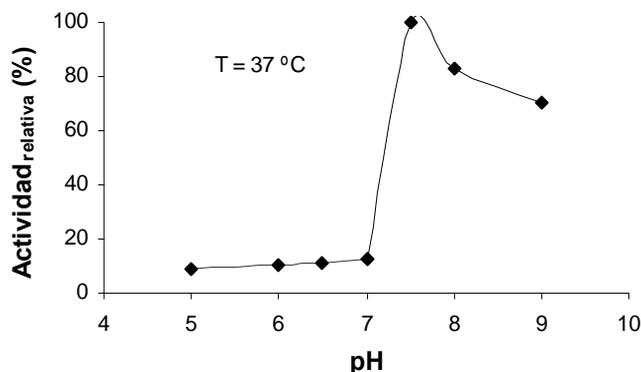


Figura 6.17 Influencia del pH sobre la actividad relativa de la enzima.

### **6.1.3. Influencia de la temperatura: Desactivación térmica**

Uno de los problemas principales que afecta a la hidrólisis enzimática es la posible desactivación térmica que pueden sufrir las enzimas en las condiciones de lavado empleadas con los detergentes. En el presente apartado se analizará la cinética de desactivación térmica de la  $\alpha$ -amilasa. Para ello se ha seguido el procedimiento de planificación e interpretación de resultados desarrollado por *Camacho Rubio y col. 1988*. Así, para la hidrólisis enzimática irreversible del almidón sí se refiere la conversión,  $x$ , a la concentración másica inicial de almidón,  $S_i$ , la concentración en cada instante vendrá dada por

$$S = S_i \cdot (1 - x) \quad \text{Ec. (6.3)}$$

y de acuerdo con los mecanismos usualmente propuestos para las reacciones enzimáticas, la velocidad de desaparición de sustrato puede expresarse en la forma

$$r = -\frac{dS}{dt} = S_i \cdot \frac{dx}{dt} = e \cdot f(x, S_i) \quad \text{Ec. (6.4)}$$

donde  $e$  representa la concentración de enzima libre activa.

Separando variables e integrando desde el instante inicial hasta el tiempo de reacción  $t_r$  se obtiene:

$$y = \int_0^{t_r} e \cdot dt = S_i \cdot \int_{x_0}^x \frac{dx}{f(x, S_i)} \quad \text{Ec. (6.5)}$$

Para la aplicación del método integral será necesaria la resolución de las dos integrales de esta ecuación. La primera integral que determina la intensidad de tratamiento,  $y$ , depende de la cinética de desnaturalización de la enzima  $y$ , de no existir desnaturalización, sería igual al producto  $e_0 \cdot t_r$ , representando  $e_0$  la concentración inicial de enzima libre activa. Mientras que la segunda integral depende de la forma de la ecuación de velocidad de la reacción enzimática.

La desnaturalización de la enzima es un proceso que transcurre por mecanismos generalmente complejos (*Ikai y Tanford 1971, Hijazi y Laidler 1972*), aunque su cinética se suele ajustar a ecuaciones del tipo

$$\frac{de}{dt} = -k_d \cdot e^n \quad \text{Ec. (6.6)}$$

con valores de  $n$  entre 0 y 5 (*Laidler y Bunting 1973*), lo que confirma la complejidad ya indicada. La integración de esta última ecuación permite obtener la expresión de la concentración de enzima activa en función del tiempo

$$n = 1 \quad e = e_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad \text{Ec. (6.7)}$$

$$n \neq 1 \quad e = \left[ e_0^{1-n} + (n-1) \cdot k_d \cdot t \right]^{\frac{1}{1-n}} \quad \text{Ec. (6.8)}$$

Sustituyendo las Ecuaciones (6.7) y (6.8) en la (6.5) e integrando nuevamente se puede calcular la intensidad de tratamiento. Las ecuaciones obtenidas son

$$n = 1 \quad y = \frac{e_0}{k_d} \cdot [1 - \exp(-k_d \cdot t_r)] \quad \text{Ec. (6.9)}$$

$$n = 2 \quad y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) \quad \text{Ec. (6.10)}$$

$$n \neq 1, n \neq 2 \quad y = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) \cdot k_d} \cdot \left\{ 1 - [1 - (1-n) \cdot e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t_r]^{\frac{2-n}{1-n}} \right\} \quad \text{Ec. (6.11)}$$

Inicialmente se realizaron dos series de experimentos, a 65 y 75 °C, a pH de 7.5, con una concentración inicial de almidón,  $S_i'$ , de aproximadamente 1 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima,  $e_0$ :  $6.9 \cdot 10^{-4}$ ,  $4.6 \cdot 10^{-4}$ ,  $3.45 \cdot 10^{-4}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-4}$  y  $1.15 \cdot 10^{-4}$  g/L, y diferentes tiempos de reacción: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Los resultados se encuentran recogidos en las Tablas 5.15 a 5.25. De acuerdo con las Ecuaciones (6.5), (6.9), (6.10) y (6.11) si se representan los resultados obtenidos para cada temperatura en un gráfico de  $x$  frente a  $e_0 \cdot t_r$ , puede resultar que los puntos experimentales se agrupan en una línea única, lo que indicaría o que no existe desactivación ( $y = e_0 \cdot t_r$ ) o que la reacción de desactivación es de segundo orden, o bien puede resultar líneas distintas para cada valor de  $e_0$ , lo que indicaría desactivación con un orden distinto a 2. Puesto que en los experimentos existen pequeñas variaciones de  $S_i'$  (0.95-1.11 g/L) y en algún caso las conversiones a tiempo 0,  $x_0$ , fueron distintas de 0 aunque muy pequeñas ( $x_0 \leq 0.035$ ), en vez de representar  $x$  en la ordenada se utiliza  $S_i' \cdot (x - x_0)$  para corregir las pequeñas diferencias que puedan existir entre los experimentos por dichos motivos, resultando los gráficos representados en las Figuras 6.18 y 6.19.

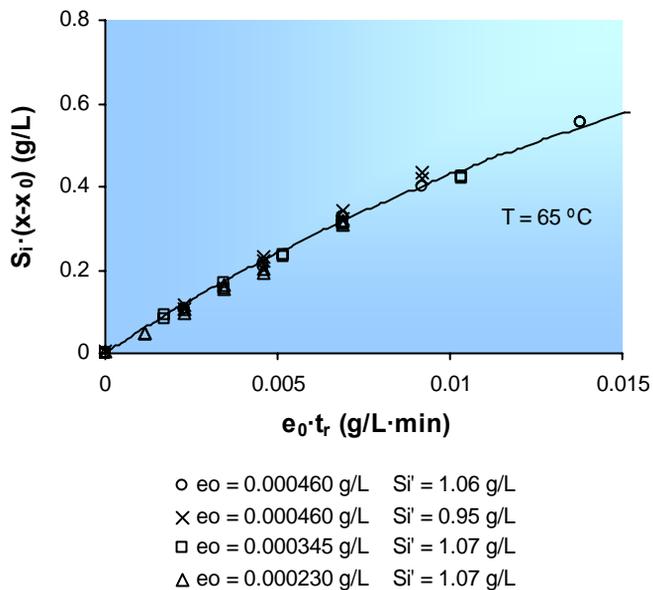


Figura 6.18 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 65 °C.

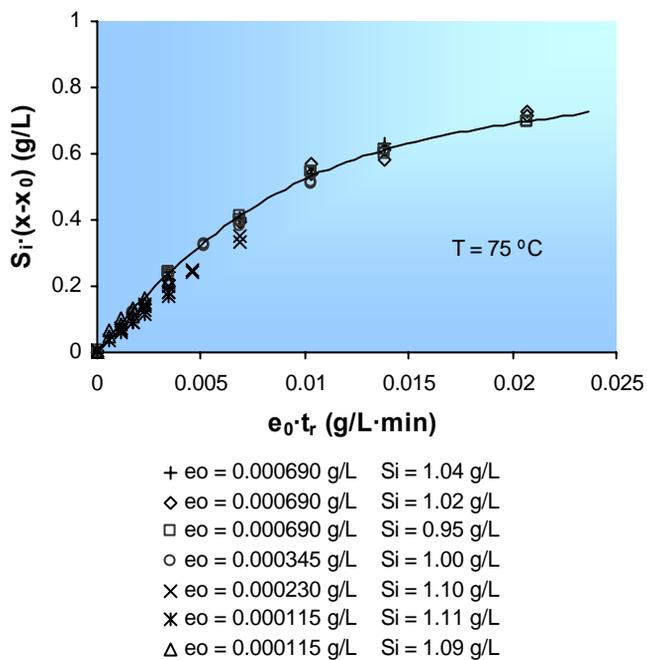


Figura 6.19 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 75 °C.

Para las dos temperaturas ensayadas, 65 y 75 °C, se observa que todos los puntos se alinean en una única tendencia y por tanto o no hay desactivación o bien el orden de la reacción de desactivación es 2. Para comprobar si existe desactivación se pueden realizar experimentos con tiempo previo,  $t_p$ , es decir, mantener la enzima durante un tiempo previo a la reacción a la temperatura de ésta; posteriormente se comparan los resultados obtenidos para una misma concentración inicial de enzima y distintos tiempos previos. Con este objetivo se realizaron experimentos en las mismas condiciones de pH, con  $S_i'$  aproximadamente igual a 1 g/L, a las temperaturas de 60, 65, 70 y 75 °C, y diferentes tiempos de reacción,  $t_r$ : 0, 5, 10, 15, 20 minutos. Los resultados obtenidos para los distintos tiempos previos,  $t_p$ , ensayados se recogen en las Tablas 5.15, 5.16, 5.19 a 5.21 y 5.26 a 5.40, y se muestran en las Figuras 6.20 a 6.23.

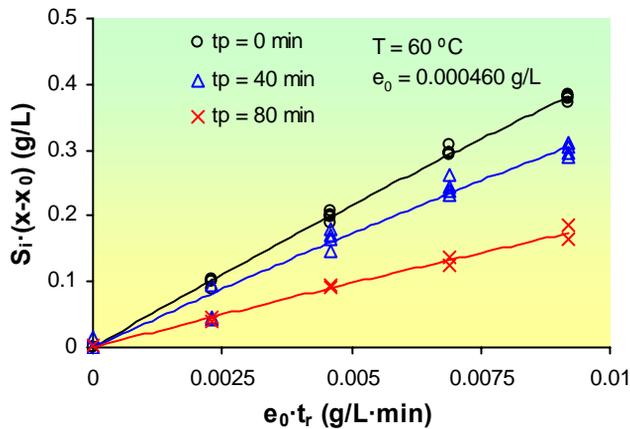


Figura 6.20 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 60 °C para distintos tiempos previos.

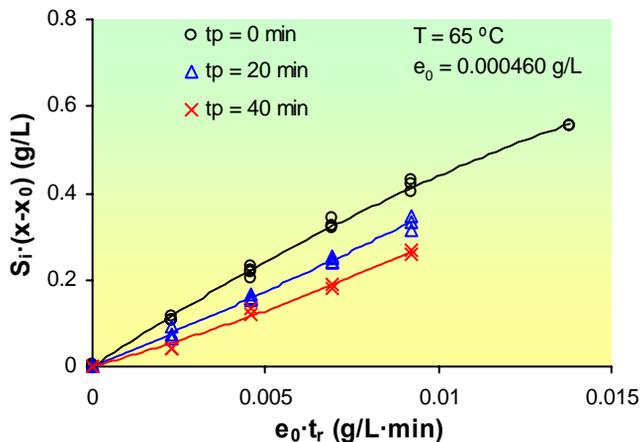


Figura 6.21 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 65 °C para distintos tiempos previos.

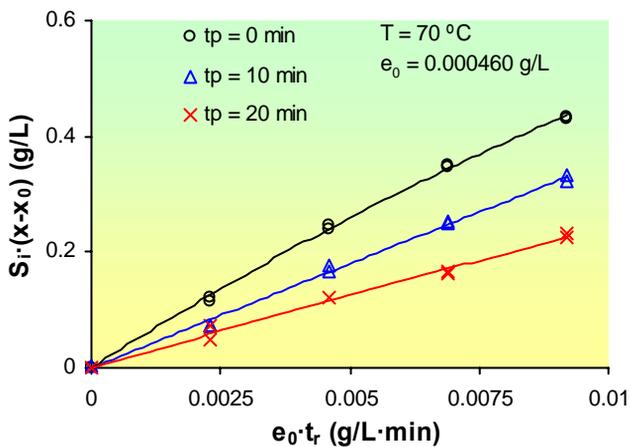
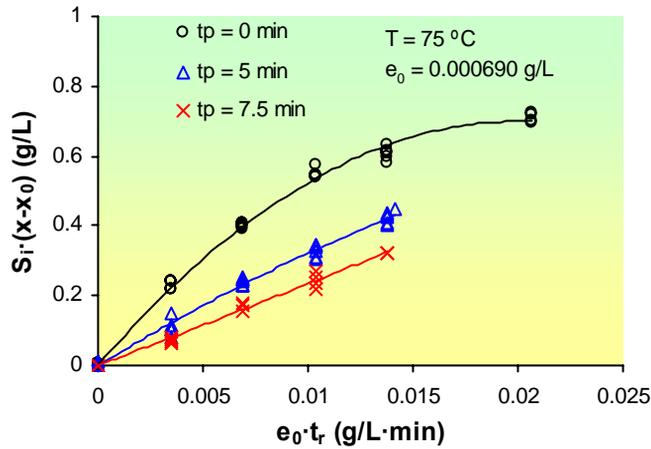


Figura 6.22 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 70 °C para distintos tiempos previos.



**Figura 6.23** Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 75 °C para distintos tiempos previos.

Para todas las temperaturas ensayadas se observa que existen diferentes tendencias en función del tiempo previo, lo cual indica que existe desactivación y que por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos realizados sin tiempo previo, que el orden de dicha desactivación debe ser muy próximo a 2. Para poder calcular la constante de desactivación,  $k_d$ , y comprobar el orden de reacción es necesario replantear el modelo propuesto a partir de la Ecuación (6.5), considerando dentro de los límites de integración el tiempo previo, deduciéndose:

$$y = \int_{t_p}^{t_r+t_p} e \cdot dt = S_i \cdot \int_{x_0}^x \frac{dx}{f(x, S_i)} \quad \text{Ec. (6.12)}$$

de forma que una conversión dada  $x$  se alcanzará siempre para un mismo valor de la intensidad de tratamiento,  $y$ . De no existir desnaturalización de la enzima la intensidad de tratamiento seguiría siendo igual a al producto  $e_0 \cdot t_r$ , mientras que de existir desnaturalización de la enzima se obtendría, en función del orden de desactivación, las siguientes ecuaciones:

$$n = 1 \quad y = \frac{e_0}{k_d} \cdot \exp(-k_d \cdot t_p) \cdot [1 - \exp(-k_d \cdot t_r)] \quad \text{Ec. (6.13)}$$

$$n = 2 \quad y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left[ \frac{1 + k_d \cdot e_0 \cdot (t_r + t_p)}{1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_p} \right] \quad \text{Ec. (6.14)}$$

$n \neq 1, n \neq 2$

$$y = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) \cdot k_d} \cdot \left\{ \left[ 1 - (1-n) e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t_p \right]^{2-n} - \left[ 1 - (1-n) e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot (t_r + t_p) \right]^{2-n} \right\} \quad \text{Ec. (6.15)}$$

Se puede comprobar que estas ecuaciones se reducen a las (6.9), (6.10) y (6.11) respectivamente cuando se considera que el tiempo previo es nulo.

Para comprobar que el orden de desactivación es 2 y obtener el valor de  $k_d$  para cada temperatura se puede partir de la Ecuación (6.15) y aplicar como método de optimización de los parámetros  $k_d$  y  $n$  el método unidireccional alternante. Para ello se puede representar  $S_i(x-x_0)$  frente a la intensidad de tratamiento,  $y$ , calculada con los valores iniciales  $n = 2$  (realmente se utiliza  $n = 1.99999$  para evitar la indeterminación que supone  $n = 2$ ) y un valor estimado para  $k_d$ . La estimación se puede realizar eligiendo en las Figuras 6.20 a 6.23 para cada temperatura dos puntos con igual conversión, a los que por lo tanto les corresponde igual valor de la intensidad de tratamiento, el primero con tiempo previo igual a  $t_{p1}$  y tiempo de reacción  $t_{r1}$  y el segundo con tiempo previo igual a  $t_{p2}$  y tiempo de reacción  $t_{r2}$ , aceptando  $n$  igual a 2 a partir de la Ecuación (6.14) se deduce

$$k_d = \frac{1}{e_0} \cdot \frac{t_{r1} - t_{r2}}{t_{p1} \cdot t_{r2} - t_{p2} \cdot t_{r1}} \quad \text{Ec. (6.16)}$$

Con los valores iniciales estimados para  $k_d$  y  $n$ , recogidos en la Tabla 6.9, y mediante regresión lineal se obtiene la ecuación de la curva que mejor ajusta a cada temperatura las parejas de valores de  $S_i \cdot (x-x_0)$  e  $y$ , lo que permite calcular los valores teóricos de  $S_i \cdot (x-x_0)$  y por tanto el sumatorio de las desviaciones entre los valores calculados y experimentales elevadas al cuadrado.

$$\sum \left\{ \left[ S_i \cdot (x-x_0) \right]_{\text{calculado}} - \left[ S_i \cdot (x-x_0) \right]_{\text{experimental}} \right\}^2 \quad \text{Ec. (6.17)}$$

El valor de este sumatorio se puede minimizar utilizando el método unidireccional alternante sobre los parámetros  $n$  y  $k_d$ , resultando los valores recogidos en la Tabla 6.9. Se deduce que  $n$  es prácticamente igual a 2 y se puede repetir el proceso de optimización pero fijando este valor, variando  $k_d$  y calculando la intensidad de tratamiento con la Ecuación (6.14), obteniéndose finalmente los valores recogidos en la Tabla 6.9.

T (°C)	Valores iniciales	Comprobación de n = 2		Valores finales para n = 2
	$k_d$ ((g/L) <sup>-1</sup> /min)	n	$k_d$ ((g/L) <sup>1-n</sup> /min)	$k_d$ ((g/L) <sup>-1</sup> /min)
60	27	2.01	26	23
65	39	2.01	44	39
70	52	1.96	78	109
75	248	1.99	305	325

**Tabla 6.9** Valores iniciales de  $k_d$  para  $n = 2$ , valores optimizados de  $n$  y  $k_d$  en la comprobación de  $n = 2$  y valores optimizados de  $k_d$  para  $n = 2$ , a las temperaturas de 60, 65, 70 y 75 °C.

A modo de comprobación del ajuste alcanzado en las Figuras 6.24 a 6.27 se representan los valores de  $S_i \cdot (x-x_0)$  frente a la intensidad de tratamiento calculada con la Ecuación (6.14) y los valores finales determinados para  $k_d$ . Se observa como ahora, frente a los resultados de las Figuras 6.20 a 6.23, todos los datos experimentales se ajustan satisfactoriamente a una única línea, concluyéndose que los parámetros cinéticos de desactivación térmica determinados para la enzima estudiada permiten ajustar los datos experimentales a las diferentes temperaturas ensayadas.

Finalmente se ha realizado un ajuste tipo Arrhenius de la constante de desactivación térmica en función de la temperatura, Figura 6.28, resultando una energía de activación de 172 kJ/mol y un factor preexponencial de  $2.01 \cdot 10^{28} \text{ L}/(\text{g} \cdot \text{min})$ .

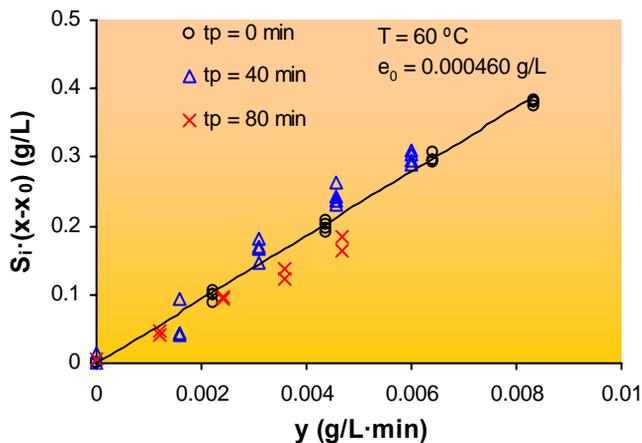


Figura 6.24 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 60 °C.

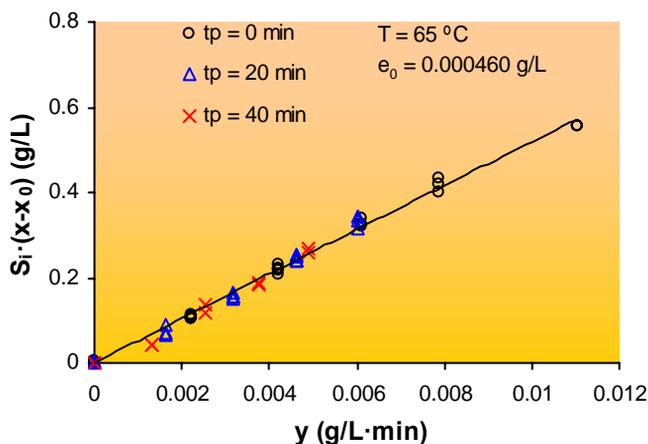


Figura 6.25 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 65 °C.

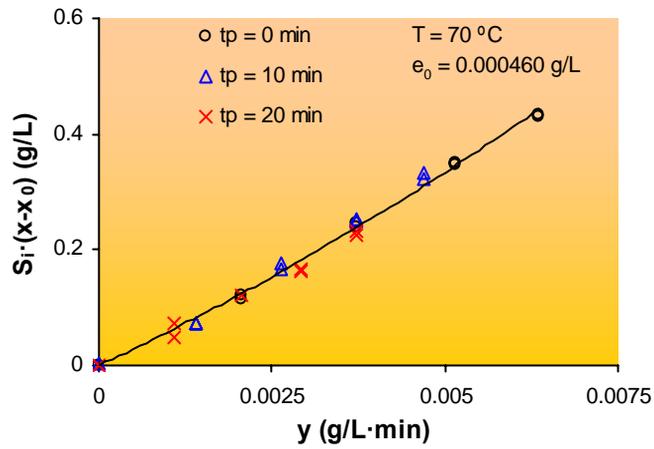


Figura 6.26 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

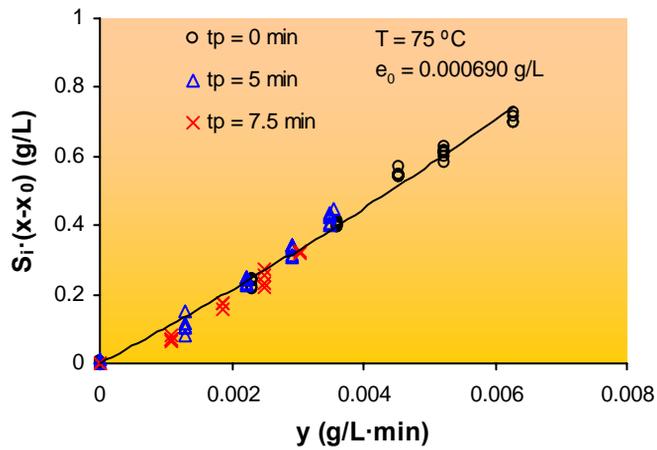


Figura 6.27 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ .

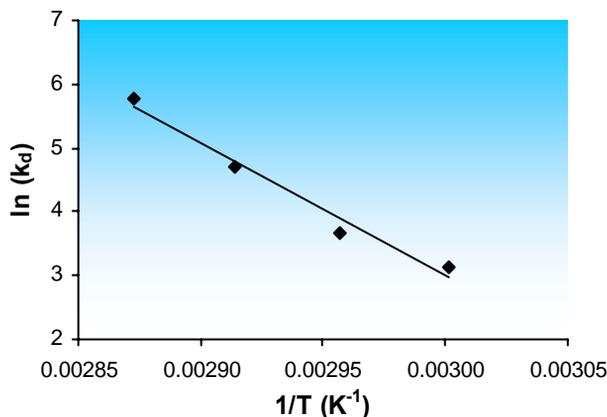


Figura 6.28 Ajuste tipo Arrhenius de la constante de desactivación de segundo orden.

#### **6.1.4. Influencia de la concentración de sustrato: Modelo cinético**

La concentración de sustrato es uno de los factores principales que determinan la velocidad de la reacción enzimática. Existen numerosos estudios sobre la cinética de la hidrólisis de almidón con  $\alpha$ -amilasas. Los modelos cinéticos utilizados se pueden dividir en dos categorías: los determinísticos y los probabilísticos (Wojciechowski y col. 2001), siendo los primeros lo más utilizados. Dentro de los determinísticos la mayoría de los autores ajusta la cinética a la ecuación de Michaelis-Menten, Fujii y col. 1981, Fujii y Kawamura 1985, Gorinstein 1993, Park y Rollings 1994, Heitmann y col. 1997, Batlle y col. 2000, Slaughter y col. 2001, Tanaka y Hoshino 2002b, Byoung-Wook y col. 2003, Ayoub y col. 2003, Bayramoglu y col. 2004 siendo minoritarios los modelos empíricos, Rosendal y col. 1979, Paolucci-Jeanjean y col. 2000b, Ozbek y Yuceer 2001. A la hora de calcular los parámetros  $K_M$  y  $k$  de la ecuación de Michaelis-Menten los distintos autores recurren al método de las

velocidades iniciales de reacción y posterior linealización de Lineweaver-Burk. La aplicación del método de las velocidades iniciales de reacción facilita la interpretación de los resultados experimentales evitando la influencia de varios factores sobre la velocidad de reacción, pérdida de actividad enzimática por cambios de pH, desactivación térmica, inhibición por producto, etc. Sin embargo el modelo cinético obtenido sólo es válido para los momentos iniciales de la reacción, pudiendo no serlo a tiempos de reacción superiores. Para extender la validez del modelo cinético obtenido a tiempos superiores en el presente apartado se aplica el método integral para la evaluación de  $K_M$  y  $k$  a diferentes temperaturas de operación y pH constante. Para ello será necesario conocer la cinética de desactivación térmica de la enzima con la temperatura, la cual se ha establecido en el apartado 6.1.3.

De acuerdo con las Ecuaciones (6.3) y (6.4), y suponiendo que la cinética se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten resulta:

$$r = -\frac{dS}{dt} = S_i \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{k \cdot e \cdot S}{K_M + S} \quad \text{Ec. (6.18)}$$

Separando variables e integrando se obtiene:

$$y = \int_0^{t_r} e \cdot dt = S_i \cdot \int_{x_0}^x \frac{K_M + S}{k \cdot S} dx \quad \text{Ec. (6.19)}$$

Para la aplicación del método integral será necesaria la resolución de las dos integrales de esta ecuación. La primera integral es la intensidad de tratamiento,  $y$ , que depende de la cinética de desnaturalización de la enzima. En el apartado 6.1.3 se demostró que la desnaturalización térmica de la enzima es de 2º orden, y por tanto la ecuación para la intensidad de tratamiento vendría dada por la Ecuación (6.10). También se ajustó la variación de  $k_d$  con la temperatura a la ecuación de Arrhenius obteniéndose una energía de activación de 172 kJ/mol, y un factor preexponencial de  $2.01 \cdot 10^{28}$  L/(g·min).

Teniendo en cuenta la Ecuación (6.10) y resolviendo la segunda integral de la Ecuación (6.19), se obtiene:

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) = \frac{1}{k} \cdot \left[ K_M \cdot \ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right) + S_i \cdot (x-x_0) \right] \quad \text{Ec. (6.20)}$$

que se puede reordenar en la forma:

$$A = \frac{K_M}{k} \cdot B + \frac{1}{k} \quad \text{Ec. (6.21)}$$

$$A = \frac{1}{k_d \cdot S_i \cdot (x-x_0)} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) \quad \text{Ec. (6.22)}$$

$$B = \frac{\ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right)}{S_i \cdot (x-x_0)} \quad \text{Ec. (6.23)}$$

Por tanto si se representa A frente a B se debe obtener una línea recta de cuya pendiente y ordenada en el origen se puede determinar  $K_M$  y  $k$  respectivamente.

Se realizaron experimentos a 37, 55, 65 y 75 °C, a un pH de 7.5, con diferentes concentraciones iniciales de almidón,  $S_i$ , 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L, a distintas concentraciones iniciales de enzima,  $e_0$ ,  $13.8 \cdot 10^{-4}$ ,  $6.9 \cdot 10^{-4}$ ,  $4.6 \cdot 10^{-4}$ ,  $3.45 \cdot 10^{-4}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-4}$ ,  $1.53 \cdot 10^{-4}$ ,  $1.15 \cdot 10^{-4}$  y  $0.575 \cdot 10^{-4}$  g/L, y con tiempos de reacción de 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. A partir de los resultados obtenidos (Tablas 5.15 a 5.25 y 5.41 a 5.70) y de acuerdo con la Ecuación (6.21) se representa en las Figuras 6.29 a 6.32 A frente a B para cada una de las temperaturas ensayadas. Los valores obtenidos de  $K_M$  y  $k$  a cada temperatura se recogen en la Tabla 6.10.

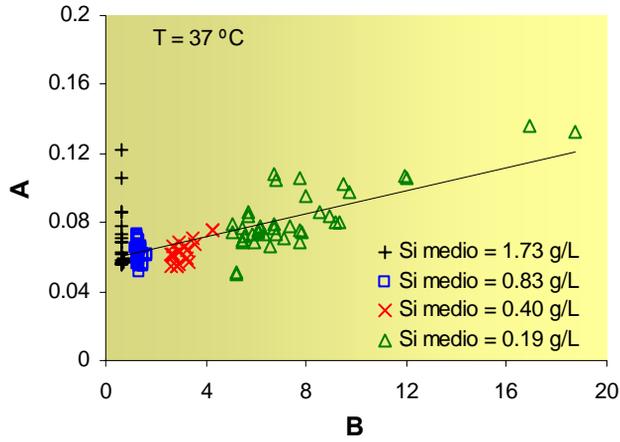


Figura 6.29 Representación de A frente a B a 37 °C.

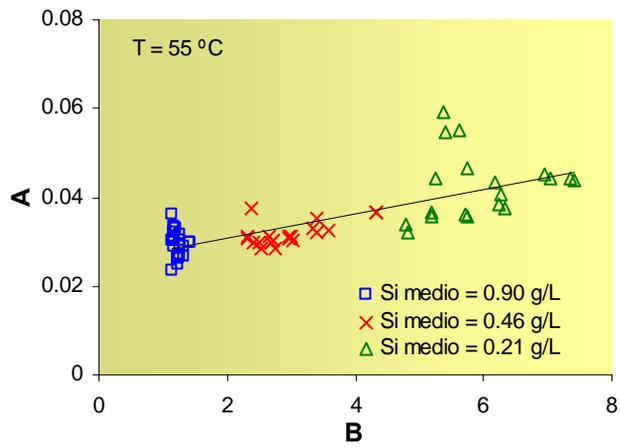


Figura 6.30 Representación de A frente a B a 55 °C.

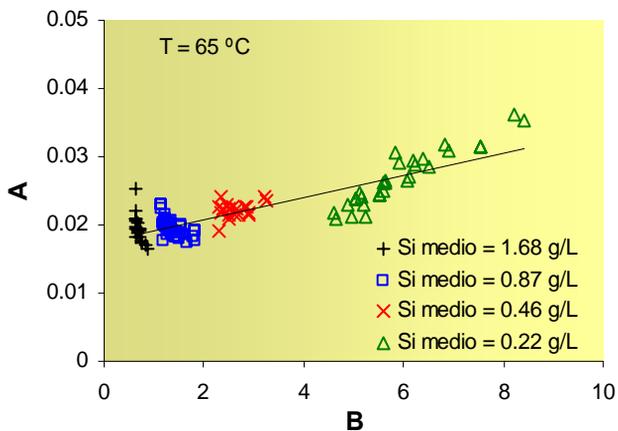


Figura 6.31 Representación de A frente a B a 65 °C.

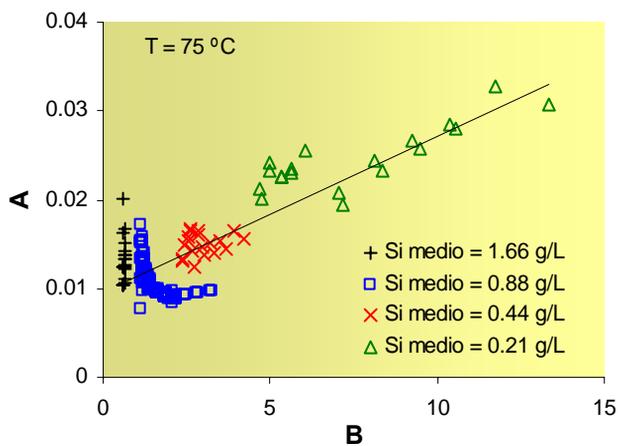


Figura 6.32 Representación de A frente a B a 75 °C.

T (°C)	K <sub>M</sub> (g/L)	k (min <sup>-1</sup> )
37	0.057	17.05
55	0.110	39.68
65	0.092	56.71
75	0.186	105.22

Tabla 6.10 Valores obtenidos de K<sub>M</sub> y k a 37, 55, 65 y 75 °C.

Los valores resultantes de  $K_M$  y  $k$  a cada temperatura se pueden ajustar mediante la ecuación de Arrhenius. Según la hipótesis de equilibrio de formación del complejo enzima-sustrato,  $K_M$  es el cociente entre la constante desaparición y de formación del complejo, y por tanto debe de ajustarse a la ecuación de Arrhenius por ser cociente de constantes cinéticas elementales. Los gráficos resultantes se recogen en las Figuras 6.33 y 6.34, obteniéndose una energías de activación de 24.4 y de 41.7 kJ/mol y unos factores preexponenciales de 735 g/L y  $1.74 \cdot 10^8 \text{ min}^{-1}$  para  $K_M$  y  $k$  respectivamente.

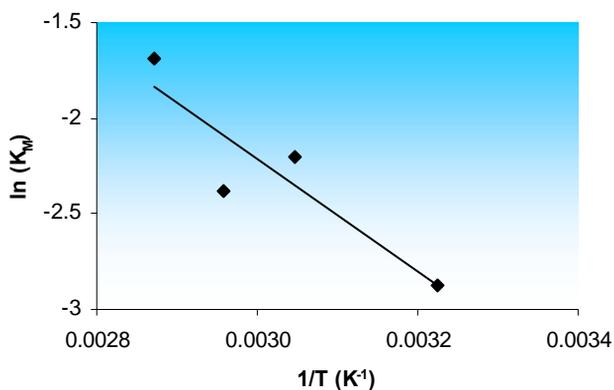


Figura 6.33 Ajuste tipo Arrhenius de  $K_M$ .

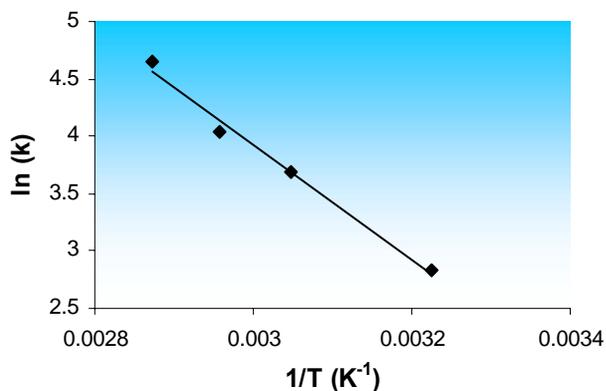
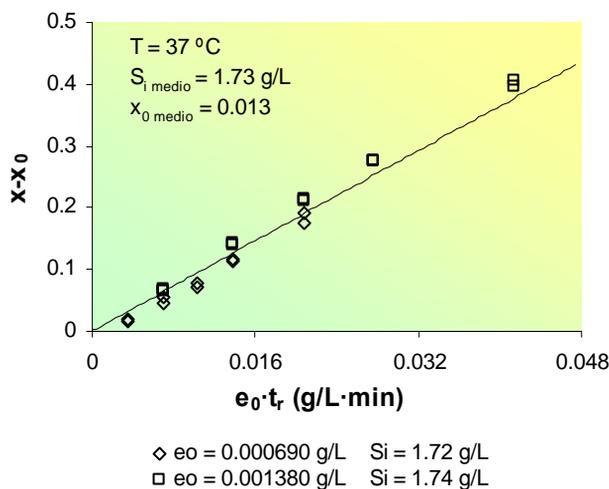


Figura 6.34 Ajuste tipo Arrhenius de  $y$  y  $k$ .

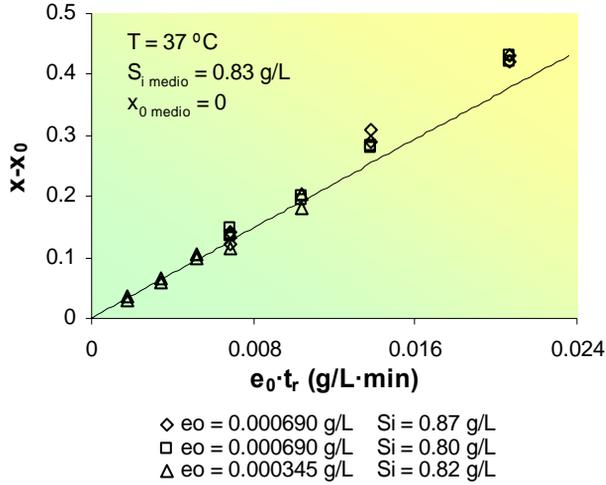
Con los valores de las energías de activación y de los factores preexponenciales de la ecuación de Arrhenius para los tres parámetros cinéticos,  $K_M$ ,  $k$  y  $k_d$  y mediante la Ecuación (6.20) se puede comprobar como se ajusta el modelo cinético a los resultados experimentales. Para ello se representa la conversión menos la conversión inicial,  $x-x_0$ , frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción,  $e_0 \cdot t_r$ . Se utiliza  $x-x_0$  para corregir las pequeñas diferencias que puedan existir entre los experimentos ya que en algún caso las conversiones a tiempo 0,  $x_0$ , fueron distintas de 0 aunque muy pequeñas. Para aplicar la Ecuación (6.20) y para el cálculo de  $x-x_0$  del modelo cinético se tomaron  $S_i$  y  $x_0$  como los valores medios de los obtenidos experimentalmente para cada temperatura y concentración inicial de sustrato. Así se obtienen las curvas representadas en las Figuras 6.35 a 6.38.

a)



**Figura 6.35** Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 37 °C. a)  $S_{i \text{ medio}} = 1.73 \text{ g/L}$ . b)  $S_{i \text{ medio}} = 0.83 \text{ g/L}$ . c)  $S_{i \text{ medio}} = 0.40 \text{ g/L}$ . d)  $S_{i \text{ medio}} = 0.19 \text{ g/L}$ .

b)



c)

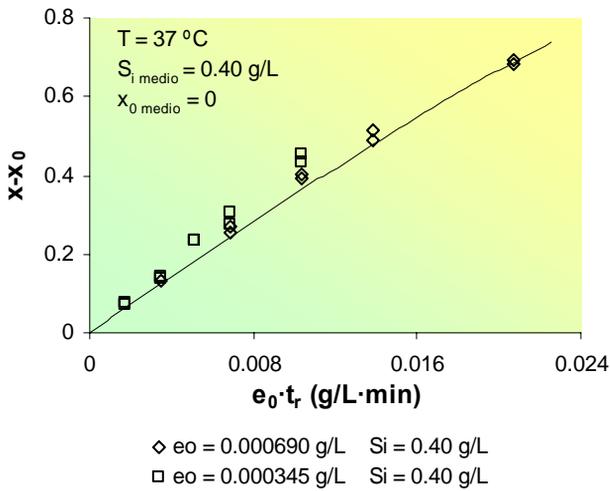


Figura 6.35 (continuación) Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 37 °C. a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.73\text{ g/L}$ . b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.83\text{ g/L}$ . c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.40\text{ g/L}$ . d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.19\text{ g/L}$ .

d)

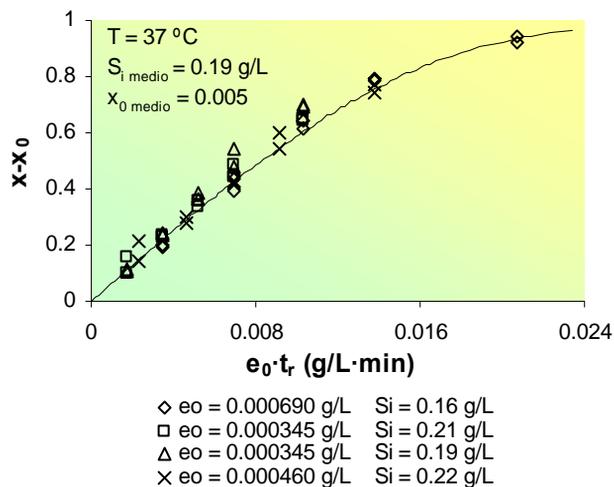


Figura 6.35 (continuación) Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 37 °C. a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.73\text{ g/L}$ . b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.83\text{ g/L}$ . c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.40\text{ g/L}$ . d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.19\text{ g/L}$ .

a)

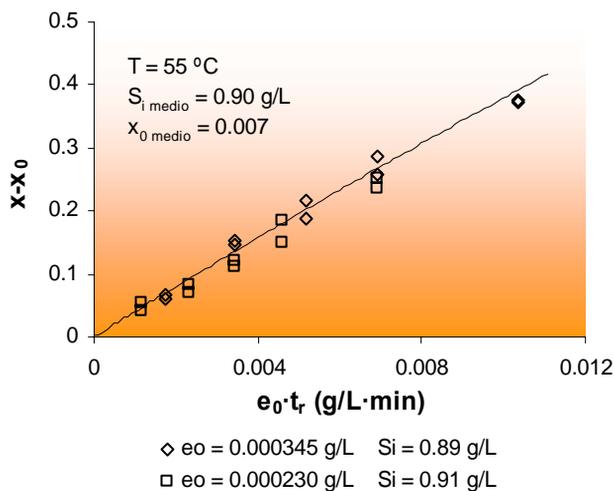
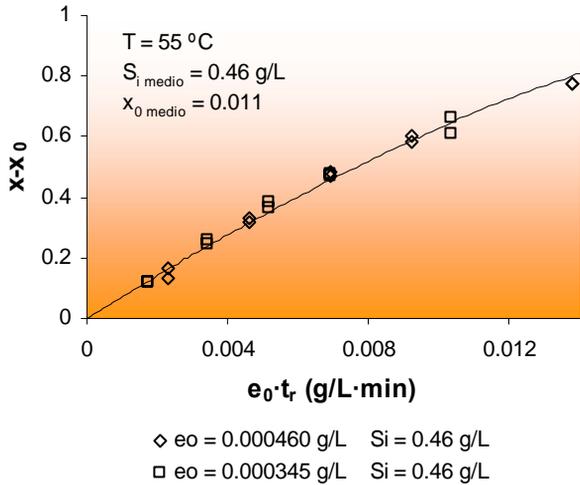
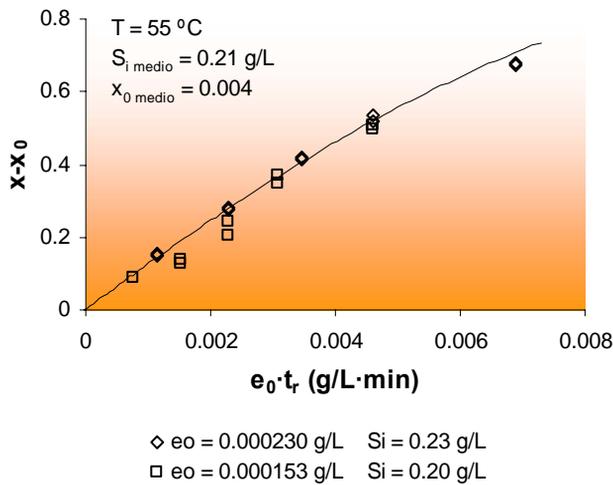


Figura 6.36 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 55 °C. a)  $S_{i\text{ medio}} = 0.90\text{ g/L}$ . c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.40\text{ g/L}$ . d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.19\text{ g/L}$ .

b)

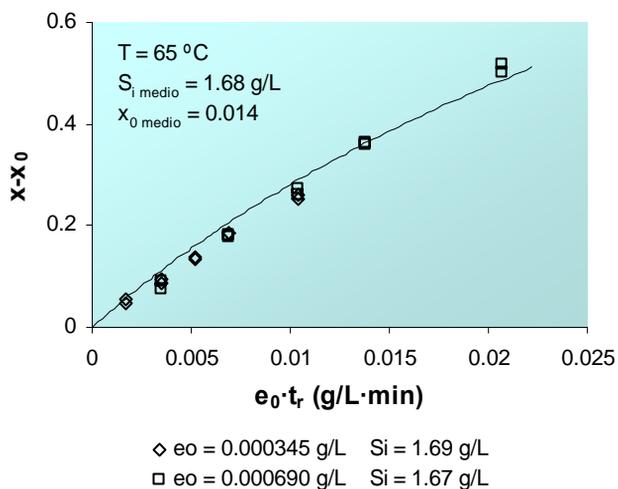


c)



**Figura 6.36 (continuación) Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 55 °C.**    a)  $S_{i\text{ medio}} = 0.90\text{ g/L}$ .    c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.46\text{ g/L}$ .  
 d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.21\text{ g/L}$ .

a)



b)

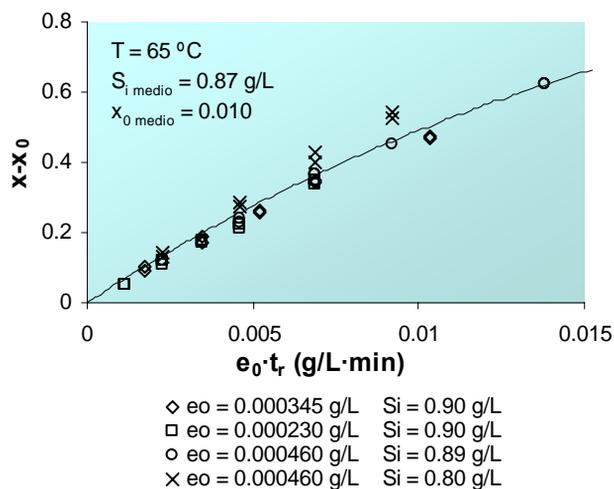
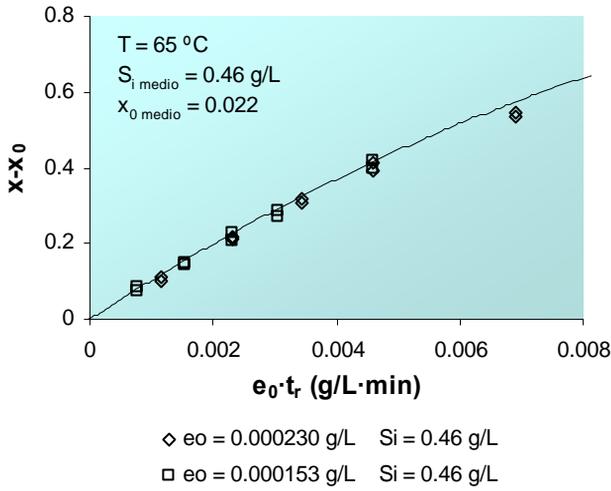
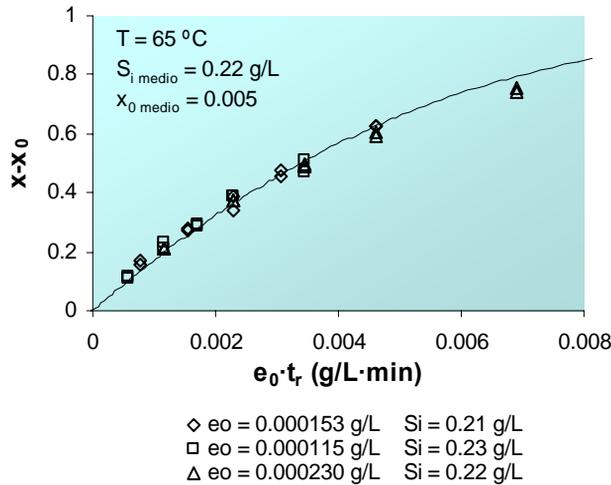


Figura 6.37 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 65 °C. a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.68\text{ g/L}$ . b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.87\text{ g/L}$ . c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.46\text{ g/L}$ . d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.22\text{ g/L}$ .

c)

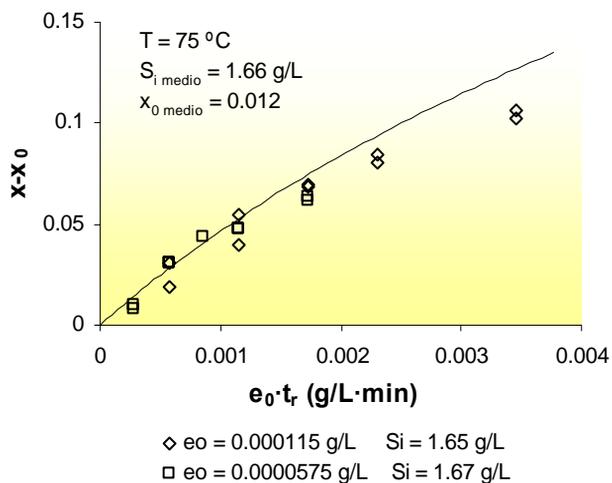


d)



**Figura 6.37 (continuación) Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 65 °C.**    a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.68\text{ g/L}$ .    b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.87\text{ g/L}$ .  
 c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.46\text{ g/L}$ .    d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.22\text{ g/L}$ .

a)



b)

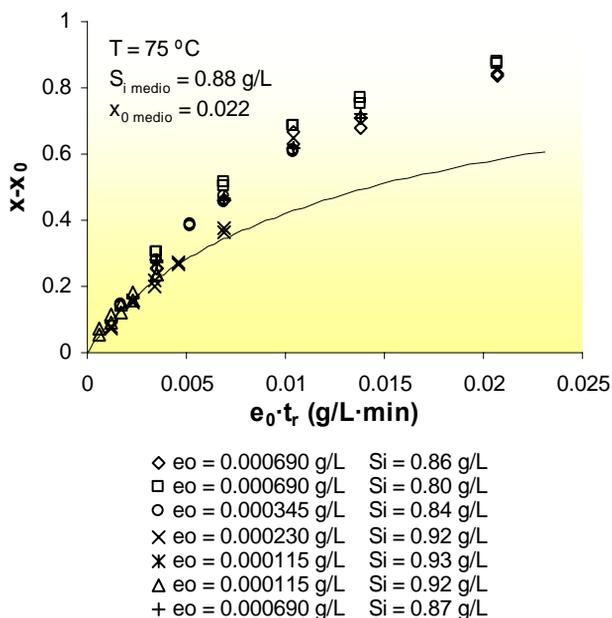
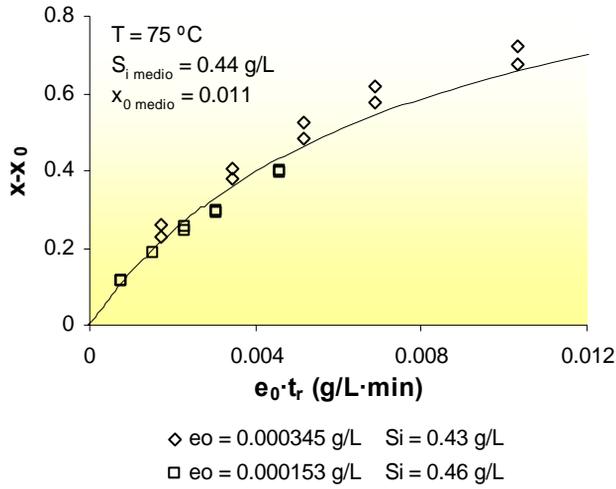
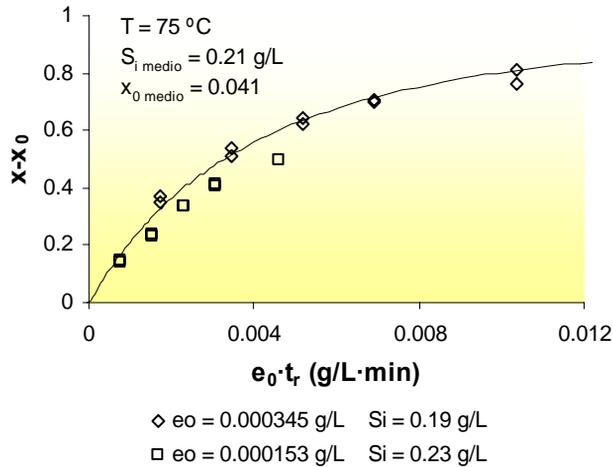


Figura 6.38 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 75 °C. a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.66\text{ g/L}$ . b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.88\text{ g/L}$ . c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.44\text{ g/L}$ . d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.21\text{ g/L}$ .

c)



d)



**Figura 6.38 (continuación)** Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 75 °C.    a)  $S_{i\text{ medio}} = 1.66\text{ g/L}$ .    b)  $S_{i\text{ medio}} = 0.88\text{ g/L}$ .  
 c)  $S_{i\text{ medio}} = 0.44\text{ g/L}$ .    d)  $S_{i\text{ medio}} = 0.21\text{ g/L}$ .

Se observa como el modelo cinético propuesto ajusta razonablemente bien los resultados experimentales obtenidos a las temperaturas ensayadas de 37, 55, 65 y 75 °C, a las que se alcanzan conversiones de hasta 0.95. Sólo en el caso de 75 °C a concentraciones iniciales de sustrato de 0.88 g/L (en base seca) existe una desviación significativa del modelo cinético respecto de los resultados experimentales cuando la conversión es superior a 0.3.

### **6.1.5. Influencia de los tensioactivos sobre la actividad enzimática**

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 3.5.2.3, se hace evidente que para el empleo de la  $\alpha$ -amilasa Termamyl en formulaciones detergentes es preciso estudiar el efecto que producen diferentes tensioactivos sobre su actividad. Dada la capacidad manifiesta de formación de complejos entre tensioactivos y almidón (tema que se describió en el apartado 3.6 y en el que se profundizará en el apartado 6.2.1) el método yodométrico deja de ser válido para el seguimiento de la reacción enzimática ya que la formación de dichos complejos interfieren con la formación del complejo yodo-almidón (*Kim y Robinson 1979, Moulik y Gupta 1979*). En la presente tesis se constató experimentalmente este hecho al tratar de medir disoluciones de almidón con una concentración aproximada de 1 g/L en presencia y ausencia de Findet 1214N/23. Así al medir con el método yodométrico en ausencia del tensioactivo  $S_i'$  resultó ser 0.95 g/L, mientras que en su presencia en concentraciones de 2.5 y 1.25 g/L,  $S_i'$  descendió a 0.80 g/L. Por tanto se cambió el método yodométrico por el método de las tabletas Phadebas® descrito en el apartado 4.1.2.2. Como tensioactivos no iónicos se emplearon alquilpoliglucósidos, alcoholes grasos etoxilados y nonilfenol etoxilado (con 9.5 moles de óxido de etileno). Además también se empleó un tensioactivo aniónico, el LAS (alquilbenceno sulfonato lineal). Para cada tensioactivo se midió la actividad relativa de la enzima a dos concentraciones,  $C$ , diferentes. Los resultados obtenidos para los distintos tensioactivos comerciales empleados se han recogido en la Tabla 5.71. Para todos los tensioactivos estudiados excepto Findet 10/15 se observa que la actividad relativa de la enzima, AER, es prácticamente independiente de la

concentración de tensioactivo empleado por lo que se puede definir un valor medio,  $AER_m$ . Para el Findet 10/15 se ha calculado el valor medio a cada una de las concentraciones ensayadas. Estos valores se recogen en la Tabla 6.11.

Tensioactivo	Tipo	Carácter	C (g/L)	$AER_m$ (%)
Glucopon 215	Alquilpoliglucósido	No iónico	0.6-1.2	104.0
Glucopon 600	Alquilpoliglucósido	No iónico	0.05-0.10	107.8
Glucopon 650	Alquilpoliglucósido	No iónico	0.1-0.3	102.4
Findet 10/15	Alcohol Graso Etoxilado	No iónico	0.2 1	77.5 40.1
Findet 1214N/23	Alcohol Graso Etoxilado	No iónico	0.006-0.060	95.9
Findet 9Q/21.5NF	Nonilfenol	No iónico	0.015-0.025	90.5
LAS	Alquilbenceno Sulfonato Lineal	Aniónico	0.2-0.8	62.5

**Tabla 6.11 Actividad enzimática relativa media en presencia de diferentes tensioactivos.**

Teniendo en cuenta que el error del método de las tabletas Phadebas® es del 5-10 % (*Novozymes A/S 2002b*), todos los tensioactivos no iónicos ensayados, a excepción del Findet 10/15, no producen una pérdida significativa en la actividad enzimática, lo cual concuerda con el hecho de la no presencia de interacciones electrostáticas que pudieran desnaturalizar la enzima, tal y como señalan *Russell y Britton 2002*; además estos autores indican que la presencia de alcoholes etoxilados estabilizan proteasas en presencia de tensioactivos aniónicos como el LAS, impidiendo de esta forma la pérdida de actividad enzimática. También es conocido el hecho de que los alquilpoliglucósidos estabilizan las enzimas en formulaciones de detergentes líquidos (*von Rybinski y Hill 1998*), por lo que era de esperar que no se produjera pérdida de actividad. A su vez se comprueba como el LAS, además de su ya señalada capacidad para desestabilizar proteasas, también es capaz de producir una pérdida significativa de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa estudiada, muy probablemente debida a las interacciones electrostáticas propias de su carácter aniónico. Con respecto al Findet 10/15, por tratarse de un alcohol graso etoxilado y tener carácter no iónico era de esperar que no afectase a la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, sin embargo se observa que sí produce pérdida de actividad y que esta pérdida aumenta conforme lo hace la concentración del tensioactivo en el medio. De todos los tensioactivos no iónicos

ensayados el Findet 10/15 es el que presenta menor HLB (ver Tabla 4.4); además su  $HLB = 9.6$  es ligeramente inferior a 10, es decir los grupos lipofílicos predominan sobre los hidrofílicos, por lo que por su mayor carácter hidrofóbico puede determinar una mayor interacción con la enzima y por lo tanto una reducción de la actividad enzimática que resulta ser más significativa cuanto mayor era su concentración.

## **6.2. INTERACCIÓN ALMIDÓN-TENSIOACTIVO**

### **6.2.1. Tensiones superficiales en presencia y ausencia de almidón**

A fin de cuantificar las posibles interacciones entre el almidón y diferentes tensioactivos no iónicos, alquilpoliglucósidos, alcoholes grasos etoxilados y nonilfenol etoxilado, y entre el almidón y el tensioactivo aniónico LAS, se realizaron medidas de tensiones superficiales a diferentes concentraciones de tensioactivo en presencia y en ausencia de almidón. Los resultados obtenidos se han recogido en las Tablas 5.72 a 5.88. A partir de ellas se han representado los gráficos de tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de tensioactivo que se muestran en las Figuras 6.39 a 6.46.

El almidón que se ha utilizado proviene de patata por lo que la fracción de amilosa se puede considerar como un polímero no iónico, mientras que por su parte la fracción de amilopectina sí tendrá cierta carga eléctrica por la presencia de grupos fosfato (*Muhrbeck y Tellier 1991*).

En el caso del LAS (Figura 6.39), al ser un tensioactivo aniónico se producen interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de la amilopectina, observándose como la presencia de almidón conlleva una reducción de la tensión superficial. La carga eléctrica al ser de igual signo debe impedir la formación del complejo, tal y como puntualiza *Goddard 1986b* en su estudio de sistemas en los que tanto el polímero como el tensioactivo presentan carga eléctrica. La disminución observada en

la cmc en presencia de almidón podría atribuirse a que la amilopectina se comportara como una sal en la disolución produciendo el efecto de disminución de la cmc tal y como señalan *Murata y Arai 1973* con respecto a la cmc de SDS en presencia de sales.

El resto de sistemas estudiados están formados por almidón y tensioactivos no iónicos (alquilpoliglucósidos, alcoholes grasos etoxilados y nonilfenol etoxilado) por lo que serían equivalentes a los descritos por *Goddard 1986a* de formación de complejos entre polímeros no iónicos solubles en agua y tensioactivos iónicos, y por lo tanto no se producirían interacciones electrostáticas entre el polímero y los tensioactivos. En las Figuras 6.40 a 6.46 se comprueba que efectivamente el sistema presenta el comportamiento descrito por *Goddard 1986a*, todos estos tensioactivos deben formar complejos con el almidón ya que en su presencia se produce un aumento de la tensión superficial para la misma concentración de tensioactivo con respecto a los experimentos sin almidón. En las Figuras 6.40 a 6.46 también se ha incluido la representación de la tensión superficial frente a la concentración de tensioactivo pero sólo hasta alcanzar la concentración micelar crítica en presencia de almidón.

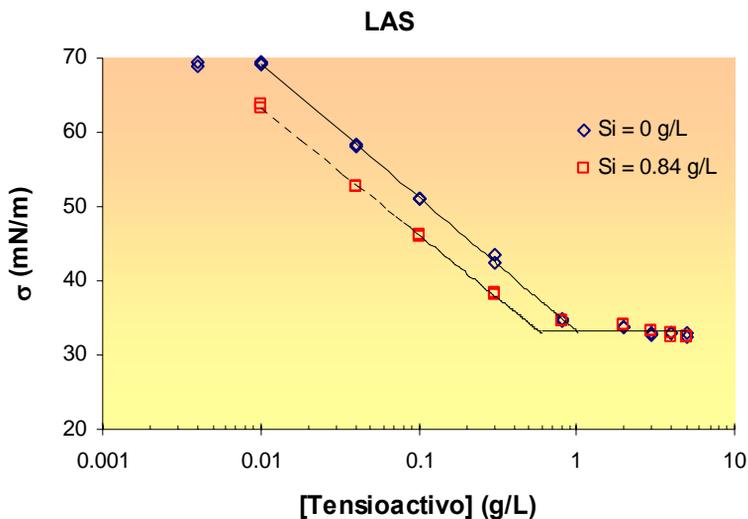
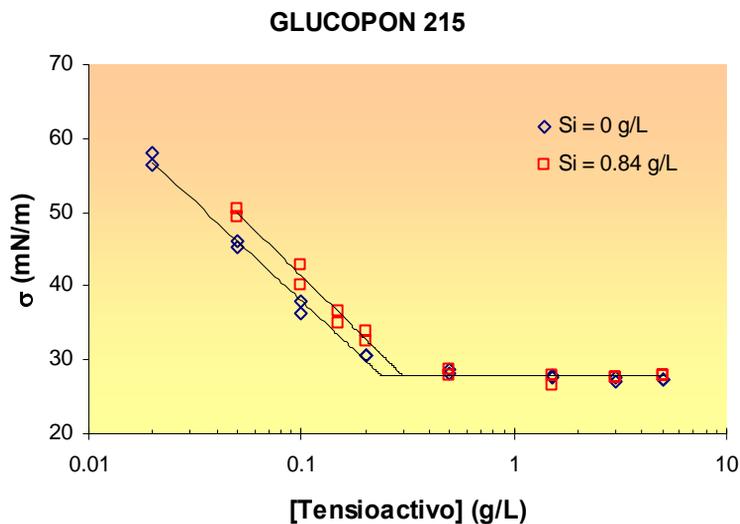


Figura 6.39 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de LAS a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

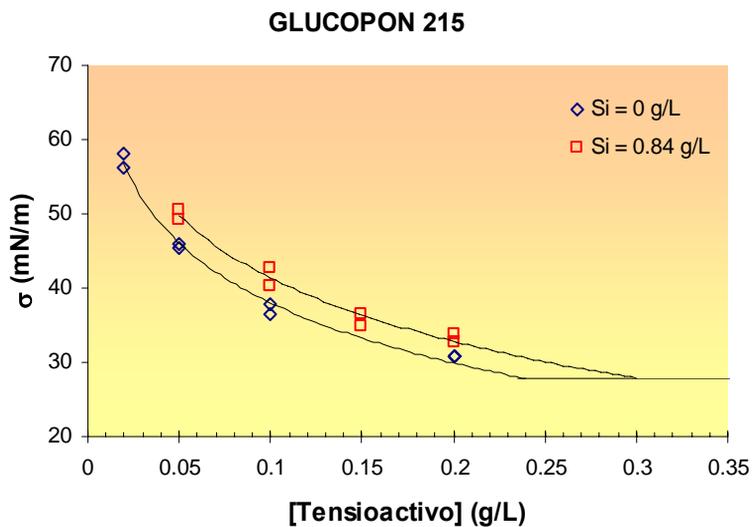
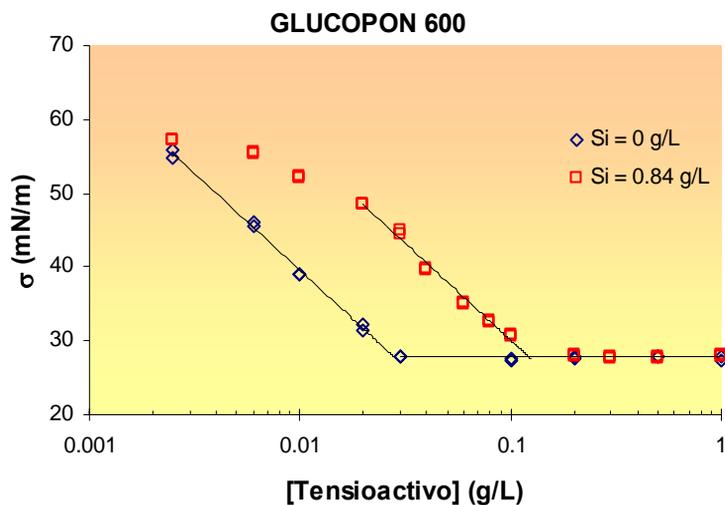


Figura 6.40 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucopon 215, a), y frente a la concentración de Glucopon 215, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

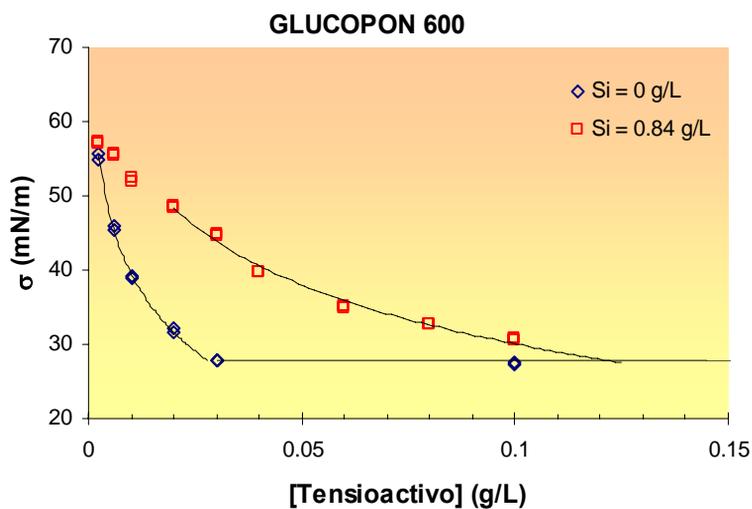
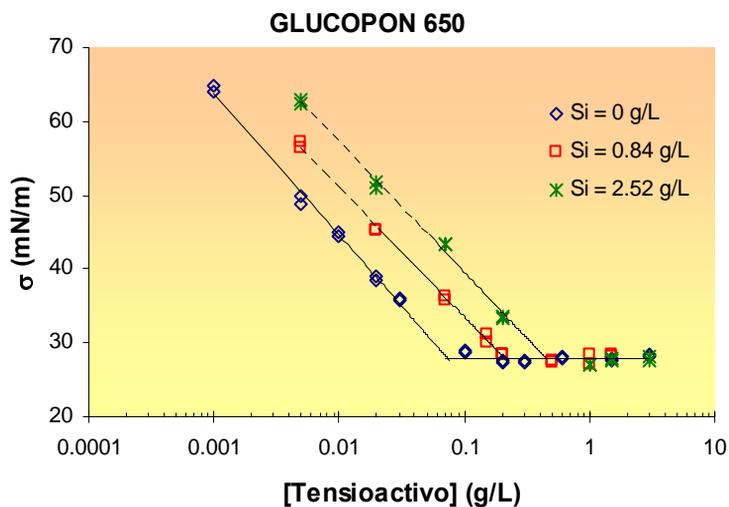


Figura 6.41 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucopon 600, a), y frente a la concentración de Glucopon 600, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

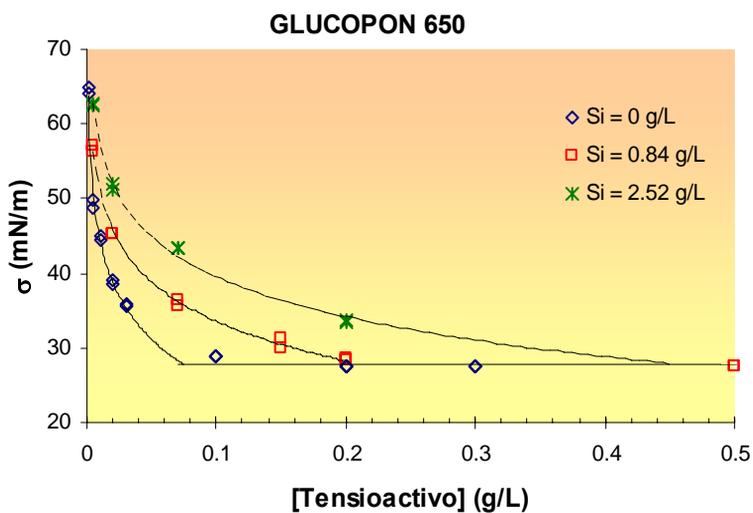
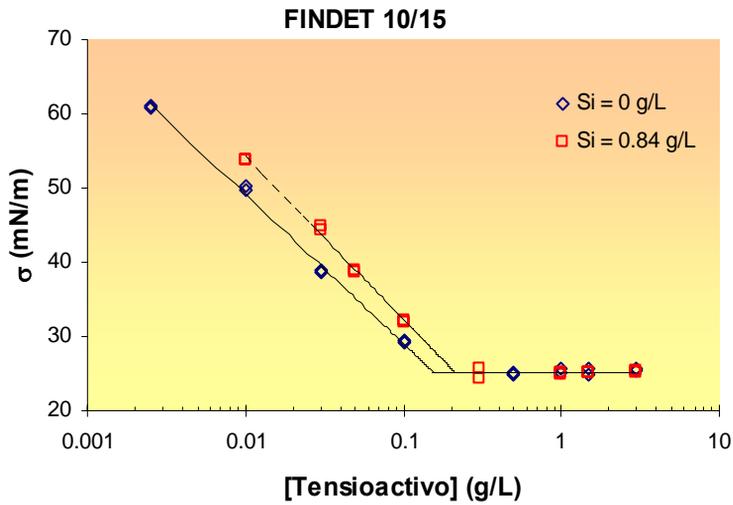


Figura 6.42 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucopon 650, a), y frente a la concentración de Glucopon 650, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

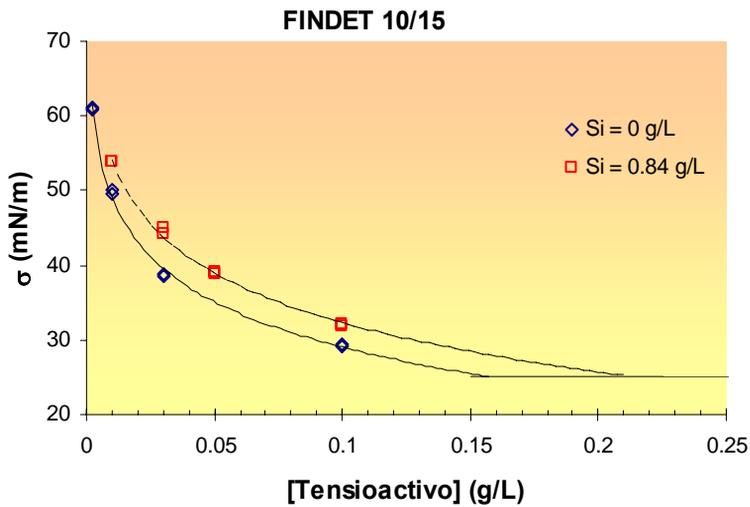
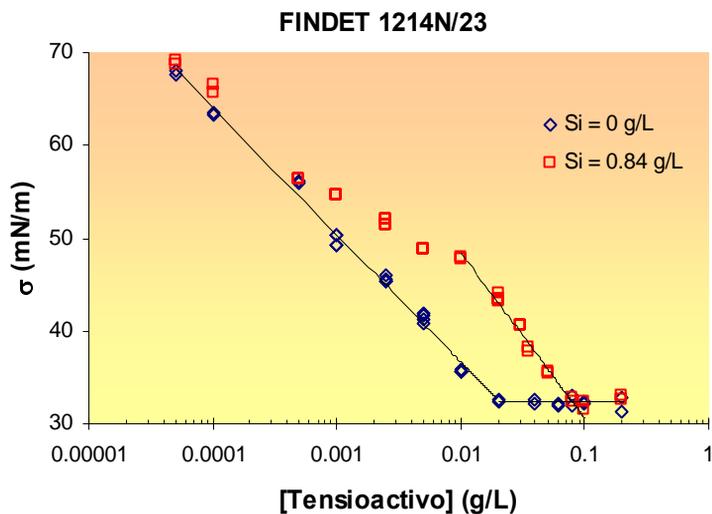


Figura 6.43 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 10/15, a), y frente a la concentración de Findet 10/15, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

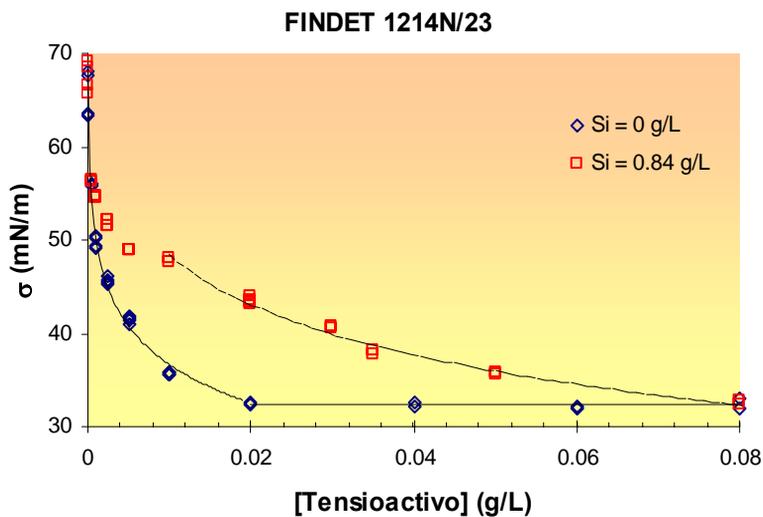
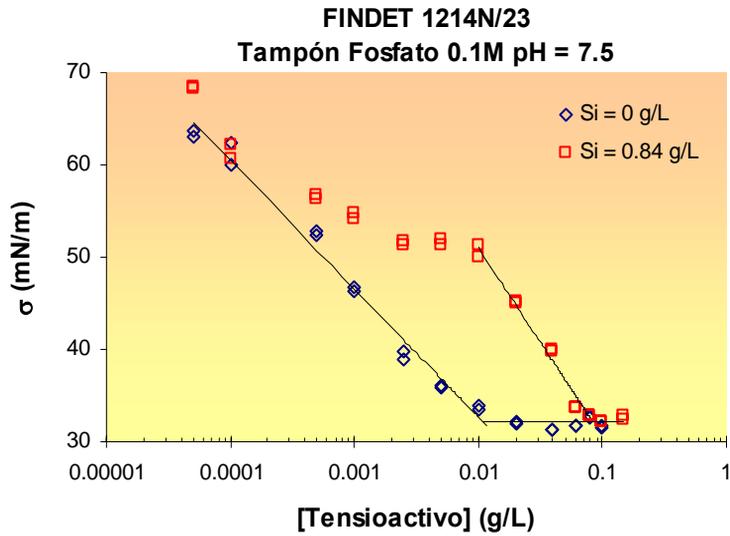


Figura 6.44 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 1214N/23, a), y frente a la concentración de Findet 1214N/23, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

a)



b)

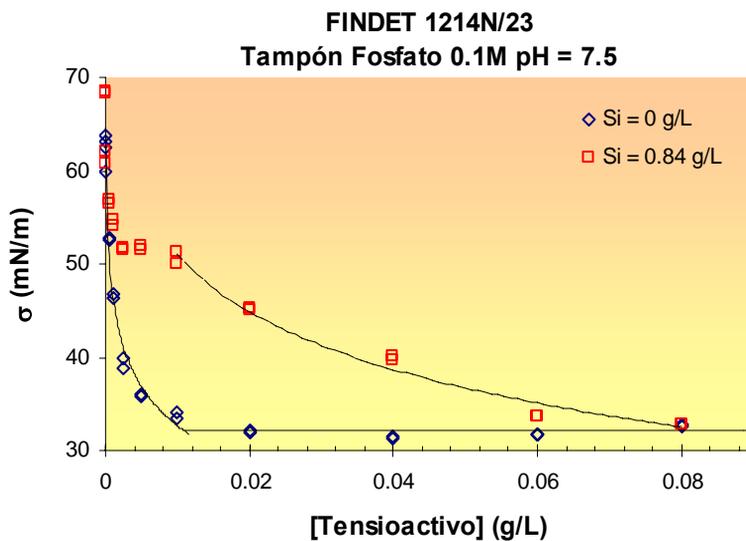
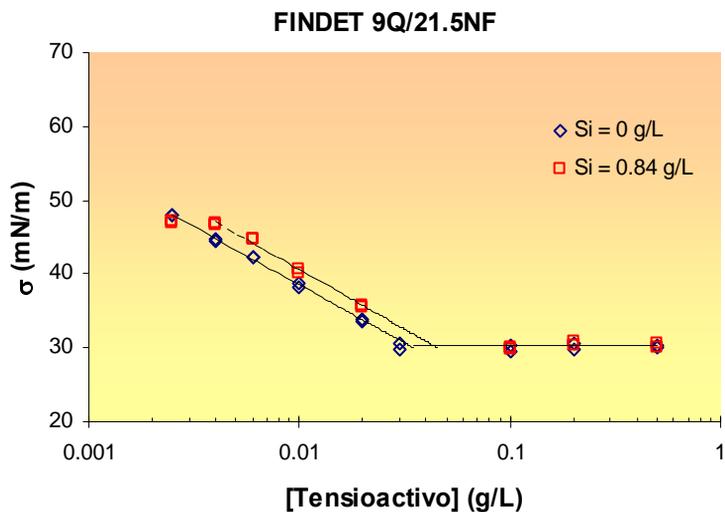


Figura 6.45 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 1214N/23, a), y frente a la concentración de Findet 1214N/23, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón, con tampón fosfato 0.1M y pH de 7.5.

a)



b)

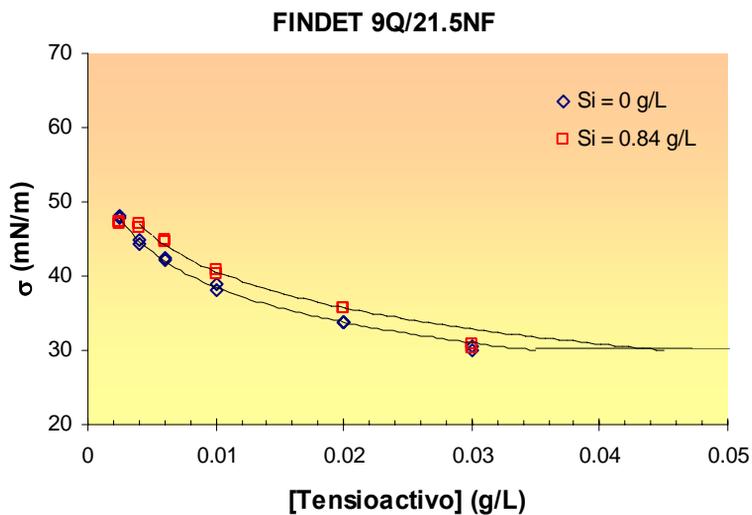


Figura 6.46 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 9Q/21.5NF, a), y frente a la concentración de Findet 9Q/21.5NF, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón.

A partir de las Figuras 6.39 a 6.46 a) se han calculado las concentraciones micelares críticas en presencia y ausencia de almidón, puntos C1 y C2 de la Figura 3.14, que permiten calcular la concentración máxima de tensioactivo ligado al complejo. El punto B1 correspondiente a la concentración crítica de asociación no se observa con los tensioactivos Glucocon® 215, Glucocon® 650, Findet 10/15 y Findet 9Q/21.5NF, ya que existiría a concentraciones muy reducidas e inferiores a las ensayadas, y no se ha determinado para los otros dos, Glucocon® 600 y Findet 1214N/23, ya que resulta incierta su estimación. El punto B2 correspondiente a la concentración de saturación de tensioactivo ligado al almidón no es detectable en los sistemas ensayados, ya que en todos los casos en las representaciones de  $\sigma$  frente a la concentración de tensioactivo, Figuras 6.40 a 6.46 b), se observa que para alcanzar igual valor de la tensión superficial la diferencia entre la concentración de tensioactivo necesaria con y sin almidón va aumentando, según disminuye la tensión superficial, hasta alcanzar la tensión superficial mínima y comenzar el proceso de formación de micelas.

Para calcular la concentración de tensioactivo libre,  $[L]^*$  g/L en base seca, en disoluciones de tensioactivo con almidón se ha considerado que debe ser igual a la que le corresponde el mismo valor de la tensión superficial en disoluciones de tensioactivo sin almidón (ya que la tensión superficial es una medida de la concentración de monómeros del tensioactivo libre en disolución) por lo que se han realizado ajustes lineales de la tensión superficial en ausencia de almidón frente al logaritmo de la concentración de tensioactivo. A partir de las concentraciones de tensioactivo total,  $[L]^*_{total}$  g/L en base seca, y de tensioactivo libre,  $[L]^*$  g/L en base seca, se ha obtenido por diferencia la de tensioactivo ligado,  $[L]^*_{ligado}$ . En las Figuras 6.47 a 6.53 se representan para los diferentes sistemas estudiados los valores de  $[L]^*_{ligado}$  frente a  $[L]^*_{total}$ : se observa que en todos los casos existe una relación de proporcionalidad directa entre ambos valores, líneas continuas de las figuras, de manera que en todos los sistemas la formación del complejo tensioactivo-almidón continua hasta que se alcanza la tensión superficial mínima sin que se detecte una saturación del almidón previa a la formación de micelas de tensioactivo, manteniéndose constante durante el proceso de formación del complejo la fracción de

tensioactivo ligado,  $f^*$ , cociente entre las concentraciones de tensioactivo ligado y total,  $[L]^*_{\text{ligado}} / [L]^*_{\text{total}}$ .

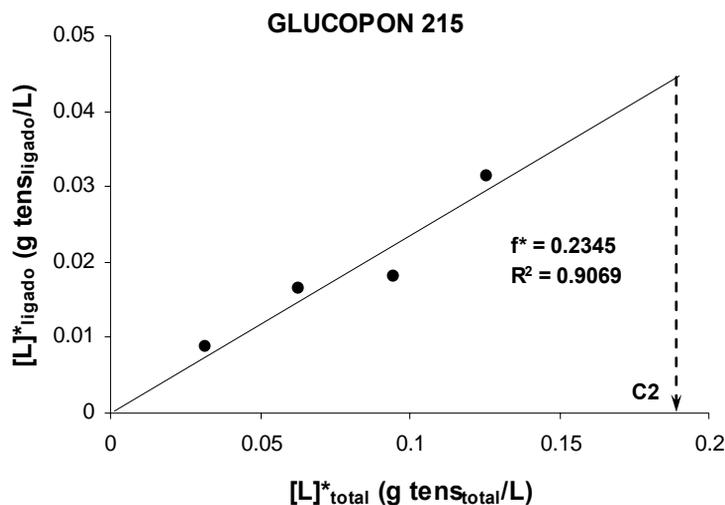


Figura 6.47 Concentración de Glucopon 215 ligado frente a concentración total de Glucopon 215, a 37 °C y en presencia de almidón  $S_i = 0.84$  g/L.

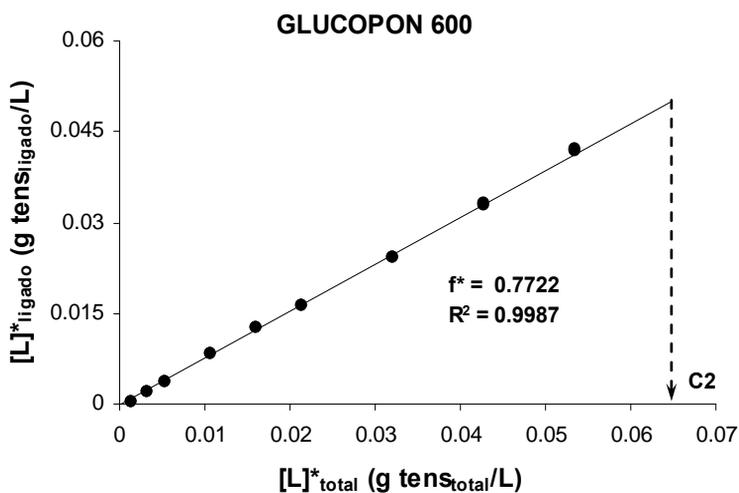


Figura 6.48 Concentración de Glucopon 600 ligado frente a concentración total de Glucopon 600, a 37 °C y en presencia de almidón  $S_i = 0.84$  g/L.

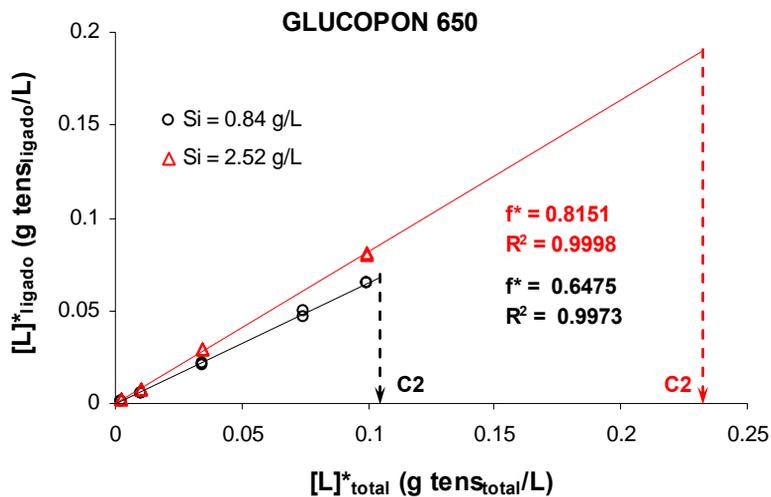


Figura 6.49 Concentración de Glucopon 650 ligado frente a concentración total de Glucopon 650, a 37 °C y en presencia de almidón a concentraciones de  $S_i = 0.84 \text{ g/L}$  y de  $S_i = 2.52 \text{ g/L}$ .

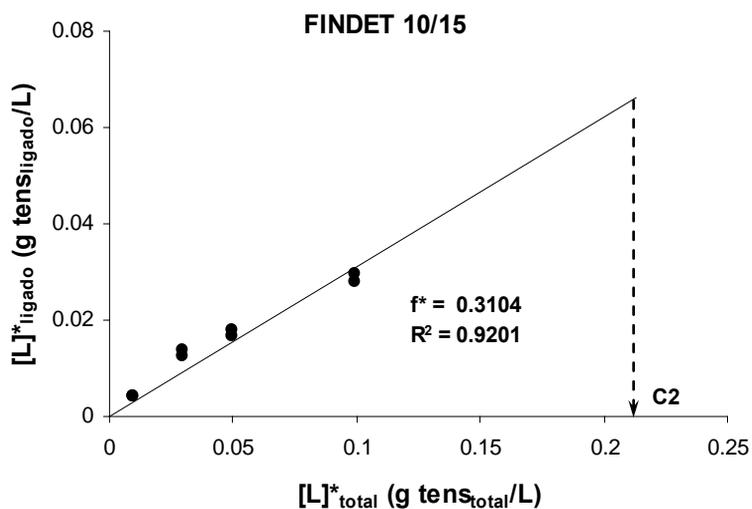


Figura 6.50 Concentración de Findet 10/15 ligado frente a concentración total de Findet 10/15, a 37 °C y en presencia de almidón  $S_i = 0.84 \text{ g/L}$ .

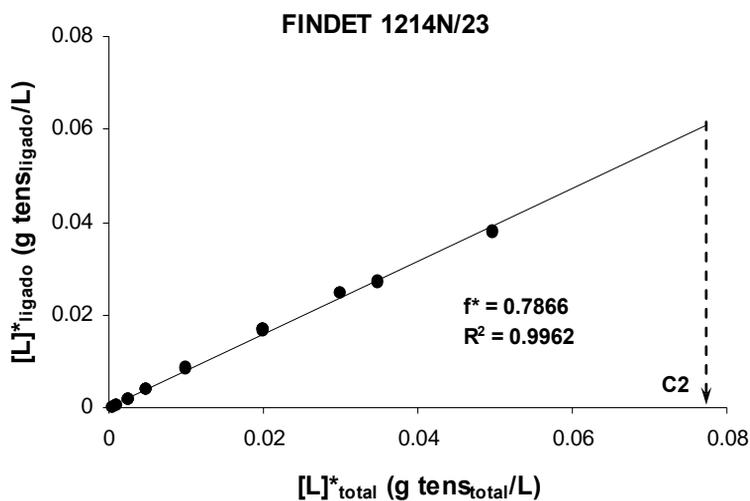


Figura 6.51 Concentración de Findet 1214N/23 ligado frente a concentración total de Findet 1214N/23, a 37 °C y en presencia de almidón  $S_i = 0.84 \text{ g/L}$ .

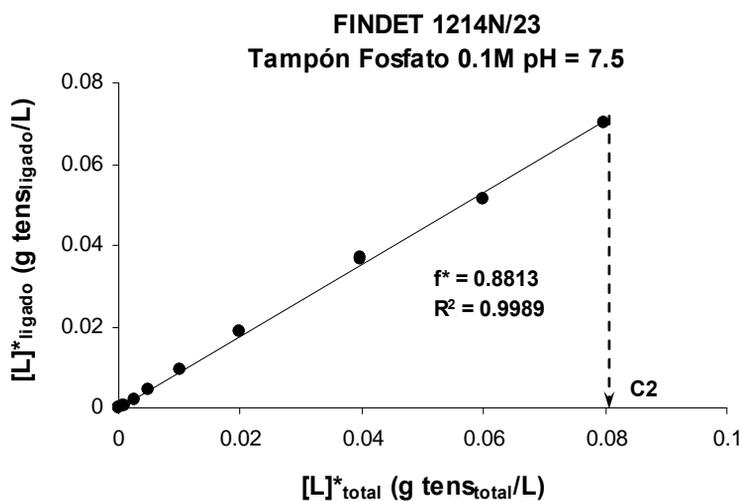
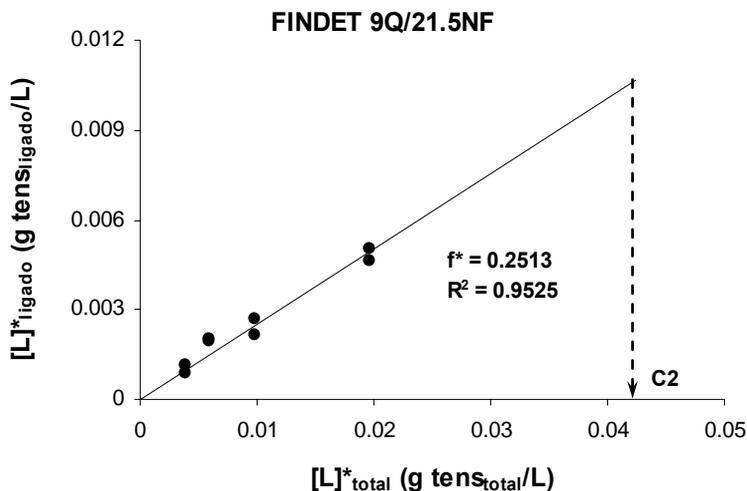


Figura 6.52 Concentración de Findet 1214N/23 ligado frente a concentración total de Findet 1214N/23, a 37 °C, en presencia de almidón  $S_i = 0.84 \text{ g/L}$  y de tampón fosfato 0.1M y pH de 7.5.



**Figura 6.53** Concentración de Findet 9Q/21.5NF ligado frente a concentración total de Findet 9Q/21.5NF, a 37 °C y en presencia de almidón  $S_i = 0.84$  g/L.

Por otra parte, los resultados obtenidos para C1, C2, sus correspondientes tensiones superficiales,  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  respectivamente, y la cantidad máxima de tensioactivo ligado calculada a partir de C1 y C2 y expresada como gramos de tensioactivo ligado por gramo de almidón,  $v_{cmc}^*$ , se recogen en la Tabla 6.12. Teniendo en cuenta que los tensioactivos son preparados comerciales que vienen con una determinada humedad (ver Tabla 4.4), en la Tabla 6.13 se han recalculado los resultados obtenidos considerando el tensioactivo puro sin la humedad. Según los resultados obtenidos se pueden ordenar los tensioactivos de menor a mayor capacidad para formar complejos: Findet 9Q/21.5NF < Glucocon® 215 < Glucocon® 600 < Findet 1214N/23 < Findet 10/15 < Glucocon® 650.

Si se comparan los tres alquilpoliglucósidos, teniendo en cuenta que la interacción hidrofóbica es la responsable de la formación de los complejos (*French y Murphy 1977, Hui y col. 1983, Goddard 1986a*), se observa como Glucocon 215 al tener un HLB más elevado (es más hidrofílico) tiene una capacidad menor para ligarse que Glucocon 600 y Glucocon 650 que presentan HLB más bajos y muy parecidos entre sí (ver Tabla 4.4). Si se comparan ahora los alcoholes grasos

etoxilados se observa un resultado análogo, Findet 10/15 tiene un HLB más bajo que Findet 1214N/23 y por tanto aquel tiene una mayor capacidad para ligarse. Empleando el criterio del HLB no se pueden comparar directamente los alquilpoliglucósidos con los alcoholes grasos etoxilados ni con el nonilfenol etoxilado pues, aparte del HLB, su naturaleza y estructuras químicas diferentes también influyen sobre su capacidad de formar complejos.

Tensioactivo	Sin almidón		Con almidón			$V_{cmc}^*$ (g tensigado/g alm)
	C1 (g/L)	$\sigma_1$ (mN/m)	C2 (g/L)	$\sigma_2$ (mN/m)	$S_i$ (g/L)	
Glucopon 215	0.241	27.7	0.302	27.8	0.84	0.072
Glucopon 600	0.028	27.8	0.122	27.8	0.84	0.111
Glucopon 650	0.073	28.0	0.469	27.6	0.84	0.157
	0.073	28.0	0.211	27.8	2.52	0.165
Findet 10/15	0.152	25.4	0.214	25.1	0.84	0.074
Findet 1214N/23	0.021	32.3	0.078	32.5	0.84	0.067
+ Tampón Fosfato. 0.1M	0.011	31.9	0.081	32.4	0.84	0.083
Findet 9Q/21.5NF	0.034	30.2	0.043	30.4	0.84	0.011
LAS	1.018	33.1	0.564	33.4	0.84	-

**Tabla 6.12 Concentraciones micelares críticas, tensiones superficiales y cantidad de tensioactivo comercial ligado en presencia de almidón.**

Tensioactivo puro sin humedad	Sin almidón		Con almidón			$V_{cmc}^*$ (g tensigado/g alm)
	C1 (g/L)	$\sigma_1$ (mN/m)	C2 (g/L)	$\sigma_2$ (mN/m)	$S_i$ (g/L)	
Glucopon 215	0.152	27.7	0.190	27.8	0.84	0.046
Glucopon 600	0.015	27.8	0.065	27.8	0.84	0.059
Glucopon 650	0.036	28.0	0.233	27.6	0.84	0.078
	0.036	28.0	0.105	27.8	2.52	0.082
Findet 10/15	0.151	25.4	0.213	25.1	0.84	0.074
Findet 1214N/23	0.021	32.3	0.077	32.5	0.84	0.067
+ Tampón Fosfato. 0.1M	0.011	31.9	0.081	32.4	0.84	0.082
Findet 9Q/21.5NF	0.034	30.2	0.042	30.4	0.84	0.011
LAS	1.018	33.1	0.564	33.4	0.84	-

**Tabla 6.13 Concentraciones micelares críticas, tensiones superficiales y cantidad de tensioactivo puro (sin humedad) ligado en presencia de almidón.**

Por otra parte, si se observa la cmc de los tensioactivos sin almidón se puede comprobar que se cumple que al aumentar el tamaño de la cadena alquílica en una serie homóloga de tensioactivos disminuye su valor. Si se considera el número medio de átomos de carbono de las cadenas alquílicas,  $N_c$ , recogidos en la Tabla 4.4 y se compara Findet 10/15 con Findet 1214N/23, el primero tiene un valor de 10 carbonos mientras que el segundo de 12.6, es decir, Findet 1214N/23 presenta una longitud promedia de cadena alquílica superior a Findet 10/15 y por tanto su cmc es menor, tal y como se refleja en la Tabla 6.13. Ahora bien según *Valea y Gozález 1990* la cmc aumenta con el número de moles de óxido de etileno en los tensioactivos no iónicos, y en ese caso Findet 10/15 (OE igual a 2.6 frente al valor 9.9 correspondiente al Findet 1214N/23, ver Tabla 4.4) debería presentar menor cmc. Por los resultados obtenidos se comprueba que tiene mayor peso la influencia del tamaño de la cadena que el número de moles de óxido de etileno, determinando que Findet 1214N/23 tenga menor cmc. Con respecto a los alquilpoliglucósidos si se consideran los valores medios de las cadenas alquílicas se deduce que Glucocon 215 tiene las cadenas más cortas con  $N_c = 9.3$ , el siguiente sería Glucocon 650 con  $N_c = 11.0$ , y por último el que tendría las cadenas alquílicas de mayor longitud sería Glucocon 600 con  $N_c = 11.7$ . Por tanto la cmc de Glucocon 600 debe ser menor que la de Glucocon 650 y ésta a su vez menor que la de Glucocon 215, tal y como se recoge en la Tabla 6.13. Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de *von Rybinski y Hill 1998*.

Los alcoholes grasos etoxilados y los alquilpoliglucósidos tienen valores de cmc inferiores a los de los tensioactivos aniónicos (*Harris y Brown 1950, von Rybinski y Hill 1998*). Los resultados reflejados en la Tabla 6.13 corroboran éste hecho, obteniéndose una cmc muy superior para el LAS en comparación con los Findet y los Glucocon ensayados. Además la tensión superficial correspondiente para el LAS a concentraciones iguales o superiores a la cmc también es superior a la de los Findet o los Glucocon. Por tanto con dosis inferiores de alcoholes grasos etoxilados o alquilpoliglucósidos se conseguirán mejores propiedades de mojado que con dosis superiores de LAS siendo de esperar pues un mejor rendimiento en el lavado por parte de aquellos.

Para el Glucocon 650 se hicieron experimentos a dos concentraciones diferentes de almidón siendo una de ellas tres veces superior a la otra. De acuerdo con *Goddard 1986a* se observa que la cantidad máxima de tensioactivo ligado es directamente proporcional a la cantidad de almidón y que por tanto  $v_{cmc}^*$  es prácticamente igual para los experimentos independientemente de la concentración de almidón. Para todos los tensioactivos ensayados también se comprueba que la tensión superficial correspondiente a la concentración micelar crítica no varía significativamente al añadir almidón ya que éste carece de actividad superficial.

Con respecto a los experimentos realizados con Findet 1214N/23, con y sin tampón fosfato, se comprueba que la presencia de las sales del tampón produce una disminución de las concentraciones micelares críticas C1 y C2, y que la cantidad máxima de tensioactivo ligado aumenta. Si se comparan las Figuras 6.43 y 6.44 se comprueba que la concentración crítica de asociación, B1, disminuye aproximadamente de 0.0005 g/L a 0.0001 g/L al estar presente el tampón, es decir se favorece la formación del complejo. Todo ello encaja con las afirmaciones de *Goddard 1986a*.

Debido a la formación del complejo almidón-tensioactivo, a la hora de emplear uno de estos tensioactivos para la formulación de un detergente se ha de tener en cuenta, además de la tensión superficial que determinan en el baño de lavado, dos aspectos:

- La formación de complejos puede aumentar la solubilidad de los polímeros (*Goddard 1986a*).
- La formación de complejos, a concentraciones por debajo de la micelar crítica, disminuye la actividad superficial para una concentración definida de tensioactivo.

Por tanto habrá que atender a ambos factores, pues un aumento en la solubilidad del almidón facilitará su eliminación y dificultará fenómenos de redeposición, sin embargo la disminución de la actividad superficial hará perder

eficacia detergente al tensioactivo. Se deduce pues que un tensioactivo con buena capacidad de formar complejos con el almidón ayudará a la limpieza de superficies manchadas con almidón, aunque requerirá mayor concentración de tensioactivo para alcanzar la concentración micelar crítica. Ese tensioactivo podría ser el Glucocon® 600 o el Glucocon® 650, los cuales además no afectan apreciablemente a la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, por lo que podrían ser adecuados para la formulación de detergentes industriales de base enzimática.

#### 6.2.1.1. Isotermas tensioactivo-almidón

A partir de los datos de tensiones superficiales es posible construir las isotermas de enlace y sus correspondientes gráficos de Scatchard para los tensioactivos puros (sin humedad) ensayados. Dado que se desconoce el peso molecular medio y el grado de polimerización de la amilosa y la amilopectina, así como el grado de ramificación de la amilopectina, no es posible calcular los moles de glucosa que intervienen en los enlaces. Por tanto se ha decidido trabajar con las isotermas en base másica, de tal forma que sus ecuaciones seguirían siendo válidas con el inconveniente de que no sería posible calcular los valores verdaderos de los parámetros  $K$ ,  $m$ ,  $n_m$ ,  $w$  y  $R$ , sino valores aparentes de ellos en los que se englobarían los datos desconocidos para la amilosa y la amilopectina. A pesar de ello si es posible interpretar los resultados obtenidos a partir de la forma de las gráficas de las isotermas y de los gráficos de Scatchard. Al trabajar en base másica, la concentración de ligando libre  $[L]$  pasa a expresarse en g/L según la variable  $[L]^*$  y la variable  $v$  en base molar se transforma en  $v^*$  expresada en base másica como los gramos de tensioactivo ligados por gramo de almidón. Los valores de tensión superficial en presencia de almidón representados en las Figuras 6.40 a 6.46 se han ajustado con el logaritmo de la concentración de tensioactivo, para concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica  $C_2$ , mediante funciones polinómicas del grado mínimo suficiente para describir adecuadamente las variaciones experimentales obtenidas: segundo para Glucocon® 600, sexto para Findet 1214N/23 con tampón, cuarto para Findet 1214N/23 sin tampón y primer grado para los restantes tensioactivos. Los ajustes han permitido realizar una simulación de todos los valores de  $[L]^*$  para concentraciones de tensioactivo inferiores a  $C_2$  en presencia de almidón. Los gráficos

de las isothermas así como los graficos de Scatchard obtenidos se han representado en las Figuras 6.54 a 6.67 (las líneas continuas correspondes a los ajustes). En el caso del Glucopon 215, al haber mayor dispersión entre las réplicas de las medidas de tensión superficial para cada concentración de tensioactivo en presencia de almidón se ha decidido tomar el valor medio de ellas para los cálculos y representaciones.

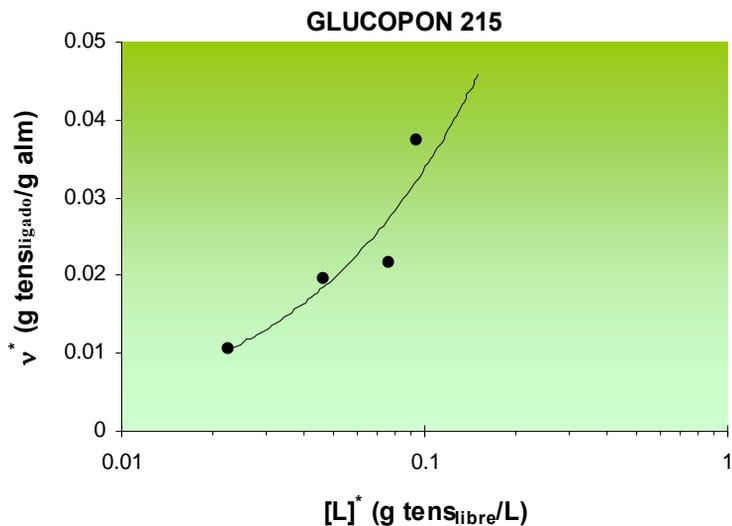


Figura 6.54 Isoterma de enlace del Glucopon 215 al almidón de patata.

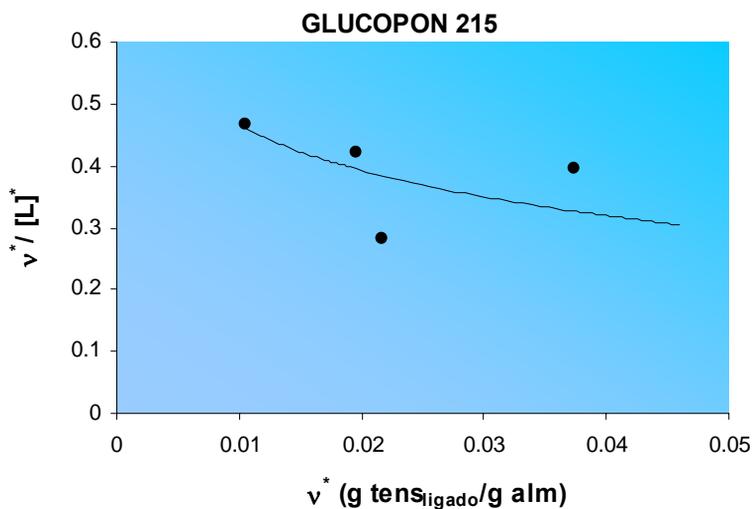


Figura 6.55 Gráfico de Scatchard para el Glucopon 215.

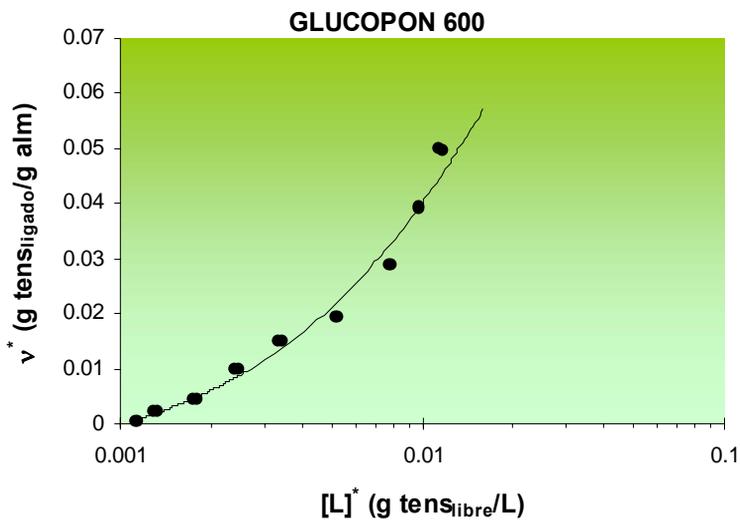


Figura 6.56 Isotherma de enlace del Glucopon 600 al almidón de patata.

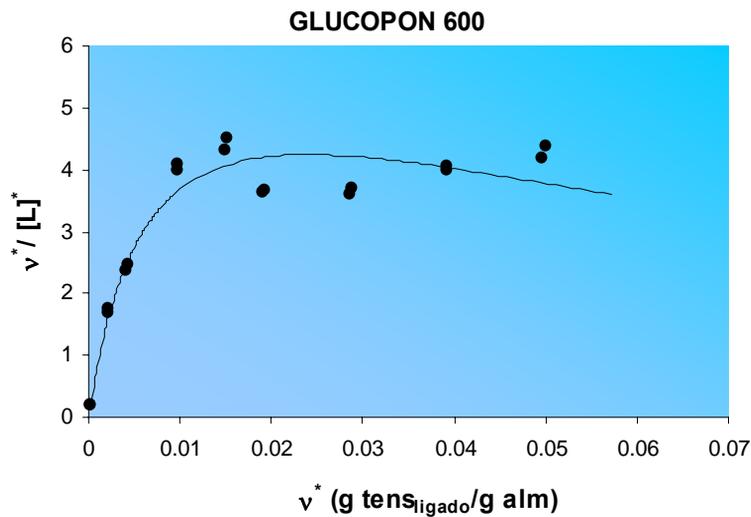


Figura 6.57 Gráfico de Scatchard para el Glucopon 600.

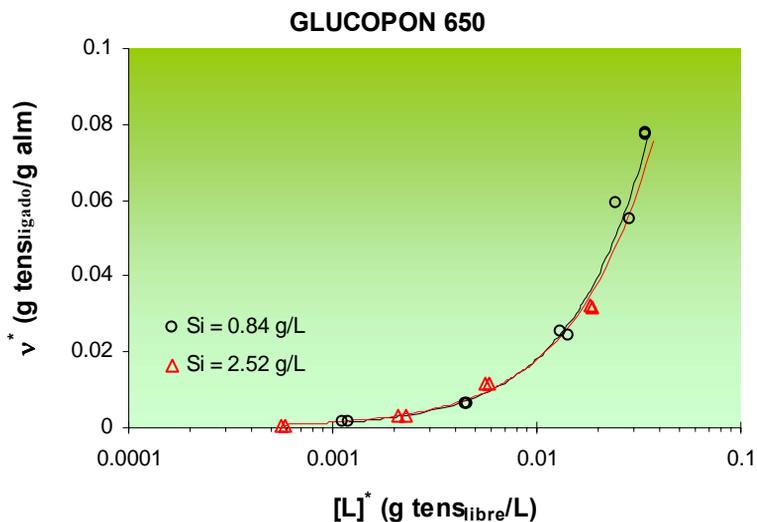


Figura 6.58 Isotherma de enlace del Glucopon 650 al almidón de patata.

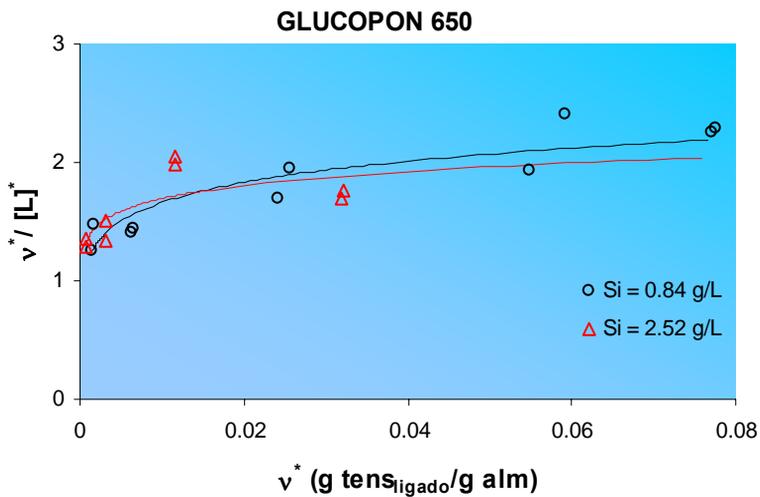


Figura 6.59 Gráfico de Scatchard para el Glucopon 650.

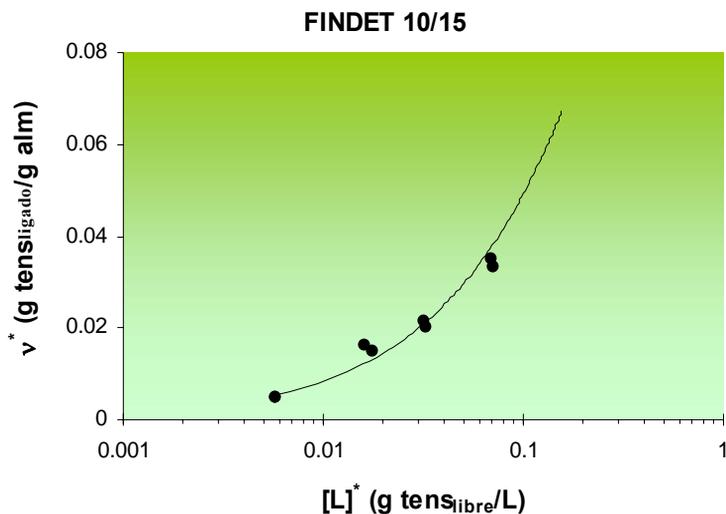


Figura 6.60 Isotherma de enlace del Findet 10/15 al almidón de patata.

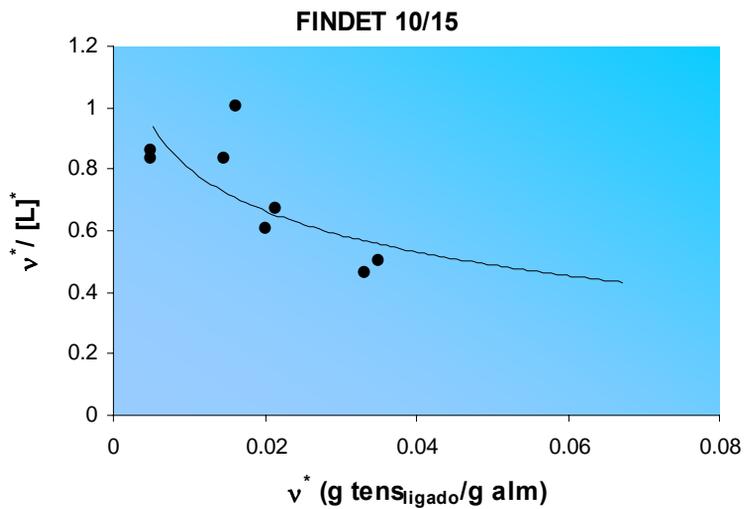


Figura 6.61 Gráfico de Scatchard para el Findet 10/15.

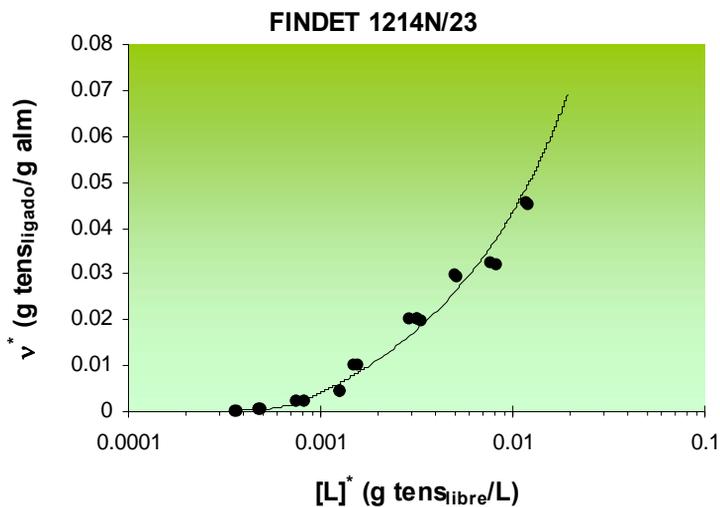


Figura 6.62 Isotherma de enlace del Findet 1214N/23 al almidón de patata.

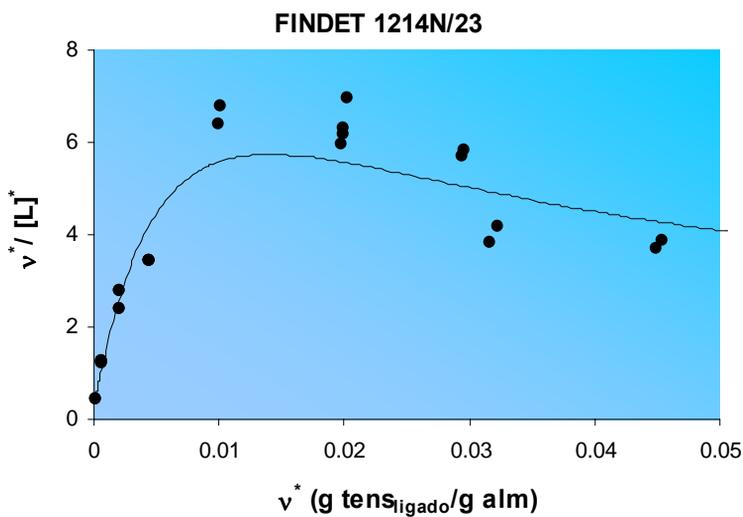


Figura 6.63 Gráfico de Scatchard para el Findet 1214N/23.

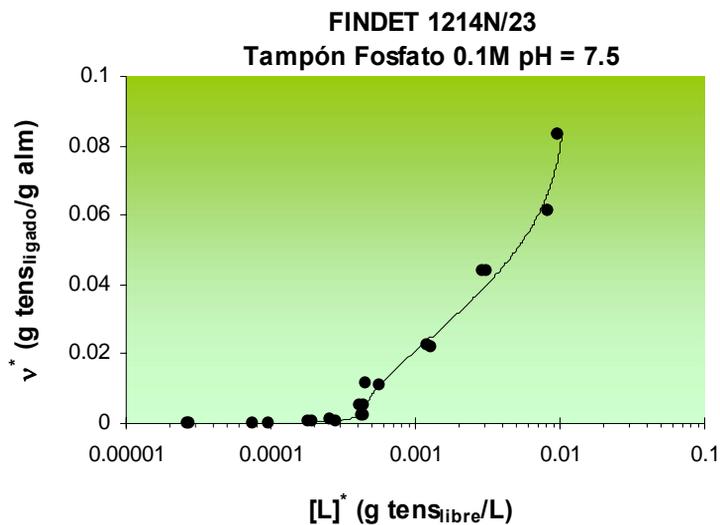


Figura 6.64 Isoterma de enlace del Findet 1214N/23 al almidón de patata en disolución de tampón fosfato 0.1M pH = 7.5.

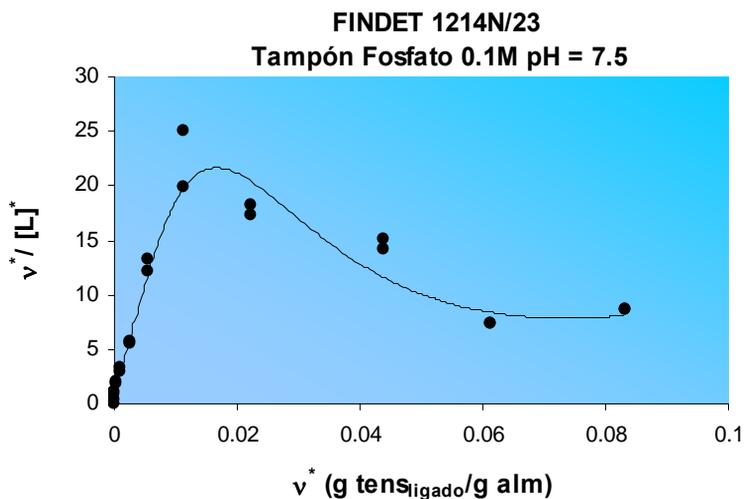


Figura 6.65 Gráfico de Scatchard para el Findet 1214N/23 en disolución de tampón fosfato 0.1M pH = 7.5.

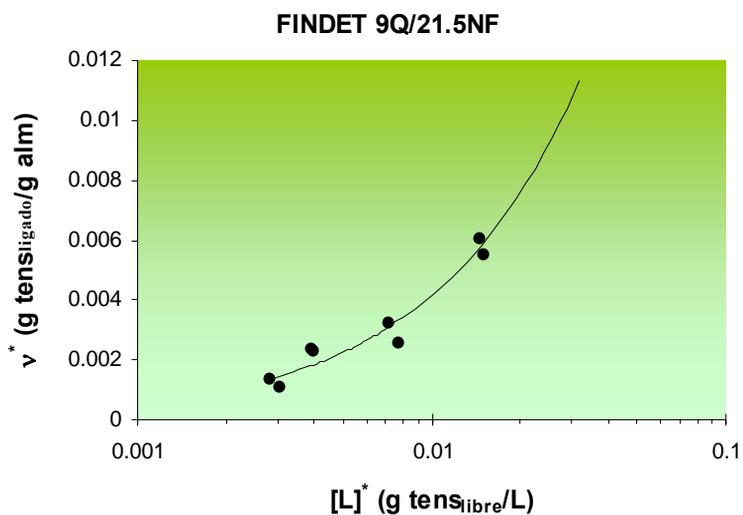


Figura 6.66 Isotherma de enlace del Findet 9Q/21.5NF al almidón de patata.

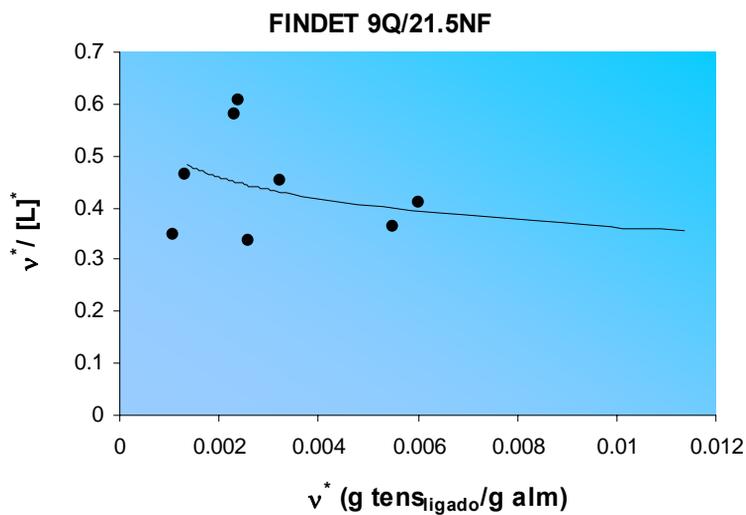


Figura 6.67 Gráfico de Scatchard para el Findet 9Q/21.5NF.

Para analizar estos gráficos es preciso tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- De acuerdo con *Gudmundsson y Eliasson 1990*, *Gudmundsson 1992*, *Svensson y col. 1996*, la amilopectina sólo es capaz de ligar tensioactivos con sus cadenas externas. Dado que el tamaño de éstas es suficientemente pequeño el tipo de enlace que presenta sólo puede ser tipo Langmuir (*Yamamoto y col. 1983*, *Lundqvist y col. 2002b*) pudiendo unirse solamente una molécula de tensioactivo por cada cadena externa no siendo posible la cooperatividad. Por tanto es aplicable la forma clásica de la isoterma de enlace tal y como viene recogida en la Ecuación (3.5).
- El tamaño de las cadenas externas de la amilopectina no es fijo, sino que sigue una distribución, de tal forma que las cadenas de mayor tamaño se ligan antes que las más pequeñas, presentando pues un rango amplio de concentraciones donde se liga tensioactivo a la amilopectina (*Lundqvist y col. 2002b*). Esta heterogeneidad de las cadenas de la amilopectina puede llevar a una ligera curvatura de los gráficos de Scatchard.
- Según (*Yamamoto y col. 1983*, *Lundqvist y col. 2002b*) la unión de ligandos a la amilosa es de tipo cooperativo positivo siendo capaz de unirse a concentraciones de tensioactivo inferiores a las que se une la amilopectina. Por tanto será aplicable la isoterma de enlace de *McGhee y Von Hippel 1974* definida en la Ecuación (3.7).
- Las isotermas de enlace y los gráficos de Scatchard para el almidón son la suma de las contribuciones individuales de la amilosa y la amilopectina (*Lundqvist y col. 2002b*).

Para el Findet 1214N/23 (con y sin tampón) y para el Glucopon 600 se dispone de datos de toda la isoterma completa desde que comienza a ligarse el

tensioactivo a la concentración de asociación crítica hasta que se alcanza la concentración micelar crítica. Se observa que la isoterma de enlace de estos tensioactivos al almidón de patata (Figuras 6.56, 6.62 y 6.64) presenta una forma similar a la propuesta por *Lundqvist y col. 2002b* (ver Figura 3.22). En todos ellos la parte final correspondiente a altas concentraciones es claramente ascendente debido al enlace tipo Langmuir (no cooperativo) de la amilopeptina. A concentraciones de tensioactivo pequeñas, donde se liga la amilosa se observa en el gráfico de Scatchard (Figuras 6.57, 6.63 y 6.65) la curvatura típica del enlace cooperativo de tipo positivo. Por tanto Findet 1214N/23 (con y sin tampón) y Glucocon 600 presentan el patrón esperado para su unión al almidón, de tal forma que inicialmente se unirán a la amilosa por enlace cooperativo positivo y cuando la amilosa esté saturada se unirán a la amilopeptina hasta que se alcance la concentración micelar crítica y se empiecen a formar las micelas de tensioactivo.

Con respecto al efecto del tampón fosfato sobre la isoterma de enlace del Findet 1214N/23 se deduce al comparar ambas isotermas (Figuras 6.62 y 6.64) que se produce un aumento significativo de la cantidad de tensioactivo ligado para la misma concentración de tensioactivo libre. Además en los gráficos de Scatchard (Figuras 6.63 y 6.65) se observa que el valor de la ordenada correspondiente al máximo de la curva aumenta considerablemente en presencia del tampón, es decir que de acuerdo con *McGhee y Von Hippel 1974* o bien el valor del parámetro de cooperatividad  $w$  es mayor (ver Figura 3.20) o el número de monómeros de glucosa,  $n_m$ , necesarios para ligar el tensioactivo es menor, por lo que en cualquier caso se incrementa la capacidad de ligar tensioactivo por parte de la amilosa. Esto está de acuerdo con los resultados del apartado 6.2.1 (ver Tabla 6.13) y con las afirmaciones de *Goddard 1986a* de que la presencia de sales, en este caso el tampón, favorece la formación del complejo entre el polímero (almidón) y el ligando (tensioactivo).

Para los restantes tensioactivos no se ha podido establecer experimentalmente la isoterma para bajas concentraciones de tensioactivo, precisamente donde se liga la amilosa, por lo que no es constatable el enlace cooperativo con ella. Sin embargo dado que Findet 1214N/23 y Findet 10/15 son homólogos, al igual que Glucocon 215, Glucocon 600 y Glucocon 650 lo son entre sí,

es de esperar que se puedan unir de forma cooperativa positiva con la amilosa al igual que lo hacen el Findet 1214N/23 y el GlucoPON 600. En la representación de las isotermas, para todos ellos se observa el comportamiento típico de unión no cooperativa tipo Langmuir para la amilopeptina a elevadas concentraciones de tensioactivo libre. Por consiguiente tanto los alcoholes grasos etoxilados como los alquilpoliglucósidos se unen primeramente a la amilosa de forma cooperativa y una vez saturada ésta lo harán de forma no cooperativa a la amilopeptina.

Con respecto al efecto de la concentración de almidón, de acuerdo a las Figuras 6.58 y 6.59 correspondientes al GlucoPON 650 se ha determinado que la cantidad de tensioactivo ligado es directamente proporcional a la cantidad de almidón presente, tal y como ya se constató en el apartado 6.2.1

Por último, en referencia al nonilfenol etoxilado (Findet 9Q/21.5NF), si bien no es posible observar la unión de éste a la amilosa porque no se ha establecido experimentalmente la isoterma para bajas concentraciones de tensioactivo libre, y a pesar de que su estructura y composición química es diferente a la de los alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos, a partir de los resultados obtenidos para estos tensioactivos no iónicos así como de los resultados obtenidos por otros autores para tensioactivos catiónicos (*Lundqvist y col. 2002b*), aniónicos (*Yamamoto y col. 1983*) y otros ligandos (*Yamamoto y col. 1982, Rutschmann y Solms 1990*) se puede aventurar que su comportamiento será análogo, presentando unión cooperativa positiva con la amilosa. Por otro lado a altas concentraciones de tensioactivo libre sí se observa el crecimiento rápido de la isoterma (Figura 6.66) indicativo de unión no cooperativa a la amilopeptina.

## **7. CONCLUSIONES**



La investigación desarrollada a lo largo de la presente Tesis Doctoral permite alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Para la hidrólisis de almidón con una  $\alpha$ -amilasa comercial, de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*) y utilizada en formulaciones detergentes, se ha comprobado mediante el método yodométrico que la conversión es directamente proporcional a la intensidad de tratamiento, y, producto del tiempo de reacción por la concentración inicial de enzima, hasta valores de aproximadamente 0.8 para la conversión, lo que permite determinar el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima,  $r/e_0$ . Los valores de  $r/e_0$  a 37 °C presentan un máximo, 18.2 min<sup>-1</sup>, a pH igual a 7.5 con reducciones muy significativas a pH inferiores, 2.2 min<sup>-1</sup> a pH igual a 7, y menos acusados a pH superiores, 12.3 min<sup>-1</sup> a pH igual a 9, por lo que el control del pH debe ser muy eficiente.
2. Se ha desarrollado una nueva metodología de estudio de la desactivación térmica de enzimas, basada en la realización de experimentos integrales, tiempo de reacción  $t_r$ , pero manteniendo las disoluciones de enzima a la temperatura de reacción durante diferentes tiempos previos,  $t_p$ , que permite obtener el orden de desactivación,  $n$ , y la constante de desactivación térmica,  $k_d$ , incluso en el caso particular de que la desactivación sea de segundo orden.
3. Se ha determinado que la desactivación térmica de la  $\alpha$ -amilasa, a las temperaturas ensayadas de 60, 65, 70 y 75 °C, sigue una cinética de segundo orden. Estimando unos valores iniciales para  $n$  y  $k_d$ , se han calculado, mediante la aplicación del método unidireccional alternante de optimización, sus valores a las temperaturas ensayadas, comprobándose que el orden de desactivación es dos y por tanto la intensidad de tratamiento viene dada por:

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left[ \frac{1 + k_d \cdot e_0 \cdot (t_r + t_p)}{1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_p} \right]$$

Los valores de la constante de desactivación térmica,  $k_d$ , en función de la temperatura se ajustan a una ecuación tipo Arrhenius, resultando una energía de activación de 172 kJ/mol y un factor preexponencial de  $2.01 \cdot 10^{28}$  L/(g·min).

- Para analizar la influencia de la concentración de almidón, a las diferentes temperaturas de operación ensayadas, se ha aplicado el método integral. Conocida la cinética de desactivación térmica de la enzima y suponiendo que la velocidad de reacción cumple con la ecuación de Michaelis-Menten el modelo cinético planteado para la hidrólisis es el siguiente:

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) = \frac{1}{k} \cdot \left[ K_M \cdot \ln \left( \frac{1 - x_0}{1 - x} \right) + S_i \cdot (x - x_0) \right]$$

Los valores obtenidos a cada temperatura para los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k$  se ajustan a la ecuación de Arrhenius, obteniéndose una energías de activación de 24.4 y de 41.7 kJ/mol y unos factores preexponenciales de 735 g/L y  $1.74 \cdot 10^8$  min<sup>-1</sup> para  $K_M$  y  $k$  respectivamente.

- Con los valores de las energías de activación y de los factores preexponenciales de la ecuación de Arrhenius para los tres parámetros cinéticos,  $K_M$ ,  $k$  y  $k_d$  se ha comprobado que el modelo cinético propuesto ajusta satisfactoriamente los resultados experimentales obtenidos a las temperaturas ensayadas de 37, 55, 65 y 75 °C, a las que se alcanzan conversiones de hasta 0.95. Sólo en el caso de 75 °C y una concentración inicial de sustrato intermedia de 0.88 g/L (en base seca) existe una desviación significativa del modelo cinético respecto de los resultados experimentales cuando la conversión es superior a 0.3.

6. La formación de complejos entre tensioactivos y almidón determina que el método yodométrico deje de ser válido para el seguimiento de la reacción de hidrólisis enzimática, habiéndose empleado el método de las tabletas Phadebas® para determinar el efecto de los tensioactivos sobre la actividad de la enzima.

En general, la actividad enzimática no se ve afectada apreciablemente por los tensioactivos no iónicos ensayados: los alquilpoliglucósidos Glucocon® 215, Glucocon® 600 y Glucocon® 650, el alcohol graso etoxilado Findet 1214N/23 y el nonilfenol etoxilado Findet 9Q/21.5NF; únicamente el alcohol graso etoxilado Findet 10/15, que es el que presenta mayor carácter hidrofóbico, determina una pérdida de actividad enzimática, tanto más significativa cuanto mayor es su concentración.

El alquilbenceno sulfonato lineal, LAS, determina también una pérdida importante de actividad enzimática debido las interacciones electrostáticas propiciadas por su carácter aniónico.

7. Todos los tensioactivos no iónicos ensayados, alquilpoliglucósidos, alcoholes grasos etoxilados y nonilfenol etoxilado, forman complejos con el almidón, por lo que se produce para la misma concentración de tensioactivo un aumento de la tensión superficial con respecto a los valores en ausencia de almidón. Según los resultados obtenidos se pueden ordenar los tensioactivos de menor a mayor capacidad para formar complejos con almidón: Findet 9Q/21.5NF < Glucocon® 215 < Glucocon® 600 < Findet 1214N/23 < Findet 10/15 < Glucocon® 650.

La interacción hidrofóbica es la responsable de la formación de los complejos, aumentando la capacidad de ligarse al almidón, dentro de cada familia de tensioactivos, conforme disminuye el HLB. Además, mediante los experimentos realizados con el tensioactivo de mayor capacidad para formar complejos con almidón, Glucocon® 650, se ha comprobado que la cantidad de

tensioactivo ligado es directamente proporcional a la cantidad de almidón presente en el medio.

8. En experimentos con Findet 1214N/23, la presencia de sales (tampón fosfato) produce una disminución de las concentraciones micelares críticas correspondientes al Findet 1214N/23, tanto en presencia como en ausencia de almidón, aumentando la cantidad máxima de tensioactivo ligado. El aumento puede ser debido a un aumento en el parámetro de cooperatividad,  $w$ , o a un descenso en el número de unidades de glucosa,  $n_m$ , necesarias para ligar el tensioactivo por parte de la amilosa.

En el caso del LAS, al ser un tensioactivo aniónico se producen interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de la amilopectina, que al tener la carga eléctrica del mismo signo puede impedir la formación del complejo e incluso produce para la misma concentración de tensioactivo una disminución de la tensión superficial con respecto a los valores en ausencia de almidón, que podría atribuirse a un efecto salino de los grupos fosfato de la amilopectina.

9. Los alcoholes grasos etoxilados y los alquilpoliglucósidos se unen a la amilosa por enlace cooperativo positivo y a la amilopectina por enlace no cooperativo tipo Langmuir. Al ir aumentando la concentración de alcoholes grasos etoxilados o de alquilpoliglucósidos en una disolución de almidón, estos inicialmente se unirán de forma preferente a la amilosa hasta que se sature, y después se irán uniendo a la amilopectina hasta que comience la formación de micelas del tensioactivo.

También se ha comprobado que, para estos sistemas, existe una relación de proporcionalidad directa entre las concentraciones de tensioactivo ligado y total, de manera que la formación del complejo tensioactivo-almidón continúa hasta que se alcanza la tensión superficial mínima sin que se detecte una saturación del almidón previa a la formación de micelas.

10. Se ha comprobado que al aumentar el tamaño de la cadena alquílica en una serie homóloga de tensioactivos no iónicos disminuye el valor de la concentración micelar crítica. Los valores tanto de la concentración micelar crítica como de la correspondiente tensión superficial de los tensioactivos no iónicos ensayados resultan inferiores a los del tensioactivo aniónico LAS. Por tanto con dosis inferiores de alcoholes grasos etoxilados o alquilpoliglucósidos se conseguirán mejores propiedades de mojado que con dosis superiores de LAS y es de esperar un mejor rendimiento en el lavado.

Por otra parte, un tensioactivo con buena capacidad de formar complejos con el almidón facilitará su eliminación, ayudando a la limpieza de superficies manchadas con almidón y dificultando fenómenos de redeposición, sin embargo, la disminución de la actividad superficial hará perder eficacia detergente al tensioactivo, requiriendo mayor concentración de tensioactivo para alcanzar la tensión superficial correspondiente a la concentración micelar crítica.

Atendiendo a todos los factores anteriores y a que la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasa no se afecte de forma significativa, los tensioactivos Glucocon 600 y Glucocon 650 podrían ser adecuados para la formulación de detergentes industriales de base enzimática.



## **8. NOMENCLATURA**



$\bar{A}$	Absorbancia media
Abs	Absorbancia
Abs <sub>575</sub>	Absorbancia a 575 nm
AE	Actividad enzimática en ausencia de tensioactivo, NU/mL
AE <sub>T</sub>	Actividad enzimática en presencia de tensioactivo, NU/mL
AER	Actividad enzimática relativa, %
AER <sub>m</sub>	Actividad enzimática relativa media, %
AM	Cantidad de amilosa en el almidón, % (p/p)
APE	Alquilfenol polietoxilado
APG	Alquilpoliglucósido
Ar	Área bajo la curva de absorbancia frente a un intervalo de longitudes de onda
B1	Concentración de asociación crítica, g/L
B2	Concentración de saturación en tensioactivo para un polímero, g/L
C	Concentración de tensioactivo, g/L
C1	Concentración micelar crítica en ausencia de polímero, g/L
C2	Concentración micelar crítica en presencia de polímero, g/L
CAPB	Cocamidopropil betaina
cmc	Concentración micelar crítica, g/L
C <sub>mon</sub>	Concentración de monómeros de tensioactivo libre, mmol/L
CP	Temperatura del punto de enturbiamiento, °C
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DP	Grado de polimerización
e	Concentración de enzima libre activa en cualquier instante, g/L
e <sub>0</sub>	Concentración de enzima libre activa en el instante inicial, g/L
F	Fuerza, mN
f*	Fracción de tensioactivo ligado
FAEO	Alcohol graso etoxilado
FAES	Éter sulfato del alcohol graso
FAS	Sulfato de alcohol graso
h	Humedad, % (p/p)
HLB	Balance lipófilo-hidrófilo
k	Constante cinética de la reacción de hidrólisis, min <sup>-1</sup>

K	Constante de asociación entre el ligando y la macromolécula, L/mol
$k_d$	Constante cinética de desactivación de la enzima, $(\text{g/L})^{1-n}/\text{min}$
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten, g/L
KNU	Kilo Novo Unit. Unidad de actividad amilásica de Novozymes A/S
L	Ligando
[L]	Concentración de tensioactivo (ligando) libre, mol/L
[L] <sup>*</sup>	Concentración de tensioactivo (ligando) libre, g/L en base seca
[L] <sup>*</sup> <sub>ligado</sub>	Concentración de tensioactivo (ligando) ligado, g/L en base seca
[L] <sup>*</sup> <sub>total</sub>	Concentración de tensioactivo (ligando) total, g/L en base seca
$L_B$	Longitud de la base de la placa de platino del tensiómetro, mm
LAS	Alquilbenceno sulfonato lineal
m	Número de puntos de unión de la macromolécula
M	Macromolécula
[M]	Concentración de macromoleculas en base molar, mol/L
n	Orden de la reacción de desactivación de la enzima
$N_c$	Número de átomos de carbono medio de las cadenas alquílicas
$n_m$	Número de monómeros de la macromolécula que son ocupados por una molécula de ligando
NU	Novo Unit. Unidad de actividad amilásica de Novozymes A/S
OE	Moles de óxido de etileno, mol
PM	Peso molecular, g/mol
r	Velocidad de desaparición de almidón, $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{min})$
$r_m$	Velocidad de reacción máxima, $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{min})$
R	Parámetro definido en la Ecuación (3.8)
$R^2$	Coefficiente de regresión
S	Concentración de almidón en cualquier instante, g/L en base seca
S'	Concentración de almidón en cualquier instante, g/L en base húmeda
Sd	Desviación estándar
SDS	Sodio dodecil sulfato
$S_i$	Concentración de almidón en el instante inicial, g/L en base seca
$S_i'$	Concentración de almidón en el instante inicial, g/L en base húmeda
$S_m'$	Concentración de almidón en el matraz, g/L en base húmeda

T	Temperatura, °C
t	Tiempo, min
$t_p$	Tiempo previo, min
$t_r$	Tiempo de reacción, min
UA	Unidad de actividad amilásica, (g almidón hidrolizado)/(g enzima·min)
V	Volumen de reacción, mL
$V_m$	Volumen del matraz, mL
w	Parámetro de cooperatividad
x	Conversión de la reacción en cualquier instante
$x_0$	Conversión de la reacción en el instante inicial
y	Intensidad de tratamiento, g/L·min
$\alpha_{int}$	Fracción de tensioactivo ligado
$\Delta\lambda$	Incremento de longitud de onda, nm
$\lambda$	Longitud de onda, nm
v	Cantidad de ligando unido a la macromolécula, mol ligando/mol monómero de la macromolécula
$v_i$	Cantidad de ligando unido a la macromolécula en el punto de unión i-ésimo, mol ligando/mol monómero de la macromolécula
$v^*$	Cantidad de tensioactivo unido al almidón, g tensioactivo/g almidón
$v_{cmc}^*$	Cantidad de tensioactivo unido al almidón calculada a partir de la diferencia de concentraciones micelares críticas en presencia y ausencia de almidón, g tensioactivo/g almidón
$\theta$	Ángulo de contacto, °
$\sigma$	Tensión superficial, mN/m



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



- **Adkins, G.K.; Banks, W. y Greenwood, C.T.** *"Enzymic assay of the average length of the unit-chain of amylopectin"*. Carbohydrate Research 2 (6), 502-503 (1966).
- **Andree, H. y Middelhaue, B.** *"Possibilities of the use of alkylpolyglucosides in detergents and cleaning liquids"*. Tenside, Surfactants, Detergents 28 (6), 413-418 (1991).
- **Arai, H.; Murata, M. y Shinoda, K.** *"Interaction between polar and surfactant. Composition of the complex between poly(vinylpyrrolidinone) and sodium alkyl sulfate as revealed by surface tension, dialysis, and solubilization"*. Journal of Colloid and Interface Science 37 (1), 223-227 (1971).
- **Aronson, M.P.; Gum, M.L. y Goddard, E.D.** *"Behavior of surfactant mixtures in model oily-soil detergency studies"*. Journal of the American Oil Chemists' Society 60 (7), 1333-1339 (1983).
- **Atkinson, B. y Mavituna, F.** *"Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook"*. 2nd Edition. Macmillan Publishers Ltd, England. 552-559 (1991).
- **Axelsen, K.; Pedersen, A.; Gibson, K. y Borchert, T.V.** *"Detergent enzymes: recent developments and outlook on entering the Twenty-First Century"*. En "Proceedings of the World Conference on Detergents: Strategies for the 21st Century". 176-182 (1999).
- **Ayoub, A.; Gruyer, S. y Bliard, C.** *"Enzymatic degradation of hydroxypropyltrimethylammonium wheat starches"*. International Journal of Biological Macromolecules 32 (3-5), 209-216 (2003).

- **Baas, E.J.; Bollier, M.M.P.; Plank, P.F. y Winetzky, D.S.** *"Enzymes: Their Applications and Biochemical Characterization"*. En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 69, 23-59 (1997).
- **Bailón Moreno, R.** *"Ingeniería del Conocimiento y Vigilancia Tecnológica Aplicada a la Investigación en el Campo de los Tensioactivos. Desarrollo de un Modelo Científico Unificado"*. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada (2003).
- **Balzer, D.** *"Alkylpolyglucosides, their physicochemical properties and their uses"*. Tenside, Surfactants, Detergents 28 (6), 419-427 (1991).
- **Balzer, D.** *"Cloud point phenomena in the phase behavior of alkyl polyglucosides in water"*. Langmuir 9 (12), 3375-3384 (1993).
- **Banks, W.; Greenwood, C.T. y Khan, K.M.** *"Physicochemical studies on starches. 50. Properties of synthetic amylopectin with long external chains"*. Starch/Staerke 22 (9), 292-296 (1970).
- **Barfoed, H.C.** *"Enzymes in starch processing"*. Cereal Foods World 21 (11), 588-593 (1976).
- **Battle, N.; Carbonell, J.V. y Sendra, J.M.** *"Determination of depolymerization kinetics of amylose, amylopectin, and soluble starch by Aspergillus oryzae  $\alpha$ -amylase using a fluorimetric 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate/flow-injection analysis system"*. Biotechnology and Bioengineering 70 (5), 544-552 (2000).
- **Batres, L.V. y White, P.J.** *"Interaction of amylopectin with monoglycerides in model systems"*. Journal of the American Oil Chemists' Society 63 (12), 1537-1540 (1986).

- **Battersby, N.S.; Sherren, A.J.; Bumpus, R.N.; Eagle, R. y Molade, I.K.** *"The fate of linear alcohol ethoxylates during activated sludge sewage treatment"*. Chemosphere 45 (1), 109-121 (2001).
- **Bayramoglu, G.; Yilmaz, M. y Arica, M.Y.** *"Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis"*. Food Chemistry 84 (4), 591-599 (2004).
- **Belitz, H.D. y Grosch, W.** *"Química de los Alimentos"*. ACRIBIA, Zaragoza. 257-264 (1988).
- **Bender, H. y Wallenfels, K.** *"Pullulan. II. Specific decomposition by a bacterial enzyme"*. Biochemische Zeitschrift 334, 79-95 (1961).
- **Blanshard, J.M.V.** *"Starch granule structure and function: a physicochemical approach"*. Critical Reports on Applied Chemistry 13 (Starch: Prop. Potential), 16-54 (1987).
- **Borglum, G.B.** *"Starch hydrolysis for ethanol production"*. En "Fuels for Biomass and Wastes". Editores: Klass, D.L. y Emert, G.H. 297-310 (1981).
- **Brambilla, A.M.; Calvosa, L.; Monteverdi, A.; Polesello, S. y Rindone, B.** *"Ozone oxidation of polyethoxylated alcohols"*. Water Research 27 (8), 1313-1322 (1993).
- **Bravo Rodríguez, V.; Jurado Alameda, E.; Reyes Requena, A.; García López, A.I.; Bailón Moreno, R. y Cuevas Aranda, M.** *"Determination of Average Molecular Weight of Commercial Surfactants: Alkylpolyglucosides and Fatty-alcohol Ethoxylates"*. Journal of Surfactants and Detergents (en prensa).

- **Brena, B.M.; Pazos, C.; Franco-Fraguas, L. y Batista-Viera, F.** *"Chromatographic methods for amylases"*. Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications 684 (1 + 2), 217-237 (1996).
- **Bressan, G.** *"Substitution of sodium tripolyphosphate in detergents"*. Tintoria 84 (7), 74-80 (1987).
- **Buleon, A.; Colonna, P. y Leloup, V.** *"Les amidons et leurs dérivés dans les industries des cereales"*. Industries Alimentaires et Agricoles 107 (6), 515-532 (1990).
- **Byoung-Wook, K.; Jung-In, K.; Myo-Jeong, K. y Jae-Cherl, K.** *"Porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area"*. Biotechnology Progress 19 (4), 1162-1166 (2003).
- **Cairns, P.; LeLoup, V.; Miles, M.J.; Ring, S.G. y Morris, V.J.** *"Resistant starch: an x-ray diffraction study into the effect of enzymic hydrolysis on amylose gels in vitro"*. Journal of Cereal Science 12 (3), 203-206 (1990).
- **Camacho Rubio, F.; Bravo Rodríguez, V. y Páez Duenas, M.P.** *"Influencia de la desnaturalización de la enzima en la cinética enzimática"*. Afinidad 45 (418), 506-508 (1988).
- **Ceska, M.; Hultman, E. y Ingelman, B.G.A.** *"Determination of  $\alpha$ -amylase"*. Experientia 25 (5), 555-556 (1969a).
- **Ceska, M.; Birath, K. y Brown, B.** *"New and rapid method for the clinical determination of  $\alpha$ -amylase activities in human serum and urine. Optimal conditions"*. Clinica Chimica Acta 26 (3), 437-444 (1969b).

- **Ceska, M.; Brown, B. y Birath, K.** "*Ranges of  $\alpha$ -amylase activities in human serum and urine and correlations with some other  $\alpha$ -amylase methods*". *Clinica Chimica Acta* 26 (3), 445-453 (1969c).
- **Cluskey, J.E.; Knutson, C.A. y Inglett, G.E.** "*Fractionation and characterization of dent corn and amylo maize starch granules*". *Starch/Staerke* 32 (4), 105-109 (1980).
- **Colonna P; Leloup V y Buleon A.** "*Limiting factors of starch hydrolysis*". *European journal of clinical nutrition* 46 (Suppl 2), S17-S32. (1992).
- **Conrad, L.S.; Damhus, T.; Kirk, O. y Schneider, P.** "*Enzymatic inhibition of dye transfer*". *Novozymes Inform* 8 (9), 950-957. <http://www.novozymes.com> (1997).
- **Coultate, T.P.** "*Manual de química y bioquímica de los alimentos*". 2ª Edición. ACRIBIA, Zaragoza. 29-36 (1997).
- **Cuevas Aranda, M.** "*Caracterización de tensioactivos para formulación de detergentes líquidos*". Trabajo de investigación. Memoria del Programa de Doctorado Tecnología y Calidad de los Alimentos. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada (2001).
- **Dahlquist, F.W.** "*The meaning of Scatchard and Hill plots*". En "*Enzyme Structure*". Editores: Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N. Academic Press, New York. *Methods in Enzymology* 48 (Part F), 270-299 (1978).
- **Damhus, T.; Conrad, L.S. y Hansen, T.T.** "*An Enzymatic System for Dye Transfer Inhibition in Laundry Detergents*". En "88<sup>th</sup> AOCS Annual Meeting & Exposition". (1997).

- **Dobolyi, E.** *"Identification of different phosphorus forms and their role in the eutrophication process of Lake Balaton"*. *Developments in Hydrobiology* 2 (Hypertrophic Ecosyst.), 13-22 (1980).
- **Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. y Smith, F.** *"Colorimetric method for determination of sugars and related substances"*. *Analytical Chemistry* 28, 350-356 (1956).
- **Ducroo, P.** *"Utilisation industrielle des enzymes"*. *Industries Alimentaires et Agricoles* 99, 401 (1982).
- **Duedahl-Olesen, L.; Haastrup Pedersen, L. y Lambertsen Larsen, K.** *"Suitability and limitations of methods for characterisation of activity of malto-oligosaccharide-forming amylases"*. *Carbohydrate Research* 329 (1), 109-119 (2000).
- **Dygert, S.; Li, L.H.; Florida, D. y Thoma, J.A.** *"Determination of reducing sugar with improved precision"*. *Analytical Biochemistry* 13 (3), 367-374 (1965).
- **Egmond, M.R.** *"Application of Proteases in Detergents"*. En *"Enzymes in detergency"*. Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. *Surfactant Science Series* 69, 61-74 (1997).
- **Eichhorn, P. y Knepper, T.P.** *"Investigations on the metabolism of alkyl polyglucosides and their determination in waste water by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry"*. *Journal of Chromatography, A* 854 (1-2), 221-232 (1999).
- **Elsner, M.; Schulz, H.-P. y Weuthen, M.** *"Modern detergents: aspects of material compatibility and cleaning properties"*. *SOFW Journal* 128 (3), 2-7 (2002).

- **Fendler, J.H. y Fendler, E.J.** *"Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems"*. Academic Press, New York. 331-312 (1975).
- **Fernández, A.; Salager, J.L. y Scorzza, C.** *"Surfactantes IV. Surfactantes no iónicos"*. En "Cuaderno FIRP S303-PP". Universidad de los Andes, Facultad de Ingeniería Química, Mérida, Venezuela. (2004).
- **Fischer, W.K.; Gerike, P. y Kurzyca, G.** *"Sodium aluminum silicates in detergents: effect on the aerobic biological sewage treatment"*. Tenside Detergents 15 (2), 60-64 (1978).
- **Florescu, S.; Leca, M.; Rob, M.; Zahanagiu, F.; Stanciu, I. y Filipescu, L.** *"Synergistic effects in binary mixtures of alkylpolyglucosides with anionic and nonionic surfactants"*. Chimica Oggi 15 (9-10), 43-46 (1997).
- **Fogarty, W.M. y Kelly, C.T.** *"Starch-degrading enzymes of microbial origin. Part I. Distribution and characteristics"*. Progress in Industrial Microbiology 15, 87-150 (1979).
- **French, A.D. y Murphy, V.G.** *"Computer modeling in the study of starch"*. Cereal Foods World 22 (2), 61-70 (1977).
- **Fujii, M.; Homma, T. y Taniguchi, M.** *"Synergism of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules"*. Biotechnology and Bioengineering 32 (7), 910-915 (1988).
- **Fujii, M. y Kawamura, Y.** *"Synergistic action of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch"*. Biotechnology and Bioengineering 27 (3), 260-265 (1985).

- **Fujii, M.; Murakami, S.; Yamada, Y.; Ona, T. y Nakamura, T.** "A kinetic equation for hydrolysis of polysaccharides by mixed exo- and endoenzyme systems". *Biotechnology and Bioengineering* 23 (6), 1393-1398 (1981).
- **Fukuda, K.; Söderman, O.; Shinoda, K. y Lindman, B.** "Microemulsions formed by alkyl polyglucosides and an alkyl glycerol ether". *Langmuir* 9 (11), 2921-2925 (1993).
- **Fullbrook, P.D.** "The enzymic production of glucose syrups". En "Glucose Syrups: Science and Technology". Editores: Dziedzic, S.Z. y Kearsley, M.W. Elsevier Appl. Sci, London. 65-115 (1984).
- **Fuwa, H.** "A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate". *Journal of Biochemistry* 41, 583-603 (1954).
- **García Domínguez, J.J.** "Tensioactivos y Detergencia". Dossat, Madrid. 22-76, 103-124 (1986).
- **García, M.T.; Ribosa, I.; Campos, E. y Leal, J.S.** "Ecological properties of alkylglucosides". *Chemosphere* 35 (3), 545-556 (1997).
- **Gibson, K.** "The importance of detergent amylases for whiteness maintenance". *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 75 (4), 207-211 (1998).
- **Gibson, K.** "Anti-redeposition effects from enzymes". *Tenside, Surfactants, Detergents* 36 (6), 388-392 (1999).
- **Goddard, E.D.** "Polymer-surfactant interaction. Part I. Uncharged water-soluble polymers and charged surfactants". *Colloids and Surfaces* 19 (2-3), 255-300 (1986a).

- **Goddard, E.D.** "*Polymer-surfactant interaction. Part II. Polymer and surfactant of opposite charge*". Colloids and Surfaces 19 (2-3), 301-329 (1986b).
- **Gomori, G.** "*Histochemical demonstration of sites of cholinesterase activity*". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 68, 354-358 (1948).
- **Gorinstein, S.** "*Kinetic studies during enzyme hydrolysis of potato and cassava starches*". Starch/Staerke 45 (3), 91-95 (1993).
- **Gudmundsson, M.** "*Effects of an added inclusion-amylose complex on the retrogradation of some starches and amylopectin*". Carbohydrate Polymers 17 (4), 299-304 (1992).
- **Gudmundsson, M. y Eliasson, A.C.** "*Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers*". Carbohydrate Polymers 13 (3), 295-315 (1990).
- **Guerrero Conejo, A.; Rodríguez Patino, J.M.; Gallegos Montes, C. y Flores Luque, V.** "*Características reológicas de pastas de detergentes que contiene tripolifosfato pentasódico y zeolita*". Comunicaciones presentadas a la Jornadas del Comité Español de la Detergencia 19, 387-401 (1988).
- **Gómez Antón, M.R.** "*Síntesis de Detergentes*". En "Detergentes". Pérez Dorado, A.A. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid. 51-85 (1996).
- **Hagihara, Y.; Hong, D.-P.; Hoshino, M.; Enjyoji, K.; Kato, H. y Goto, Y.** "*Aggregation of  $\beta$ (2)-glycoprotein I induced by sodium lauryl sulfate and lysophospholipids*". Biochemistry 41 (3), 1020-1026 (2002).
- **Hahn, D.E. y Hood, L.F.** "*Factors influencing corn starch-lipid complexing*". Cereal Chemistry 64 (2), 81-85 (1987).

- **Harada, T.; Yokobayashi, K. y Misaki, A.** *"Formation of isoamylase by Pseudomonas"*. Applied Microbiology 16 (10), 1439-1444 (1968).
- **Harris, J.C. y Brown, E.L.** *"Detergency evaluation. I. Wash test methods"*. Journal of the American Oil Chemists' Society 27, 564-570 (1950).
- **Heitmann, T.; Wenzig, E. y Mersmann, A.** *"Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymic hydrolysis by an  $\alpha$ -amylase"*. Enzyme and Microbial Technology 20 (4), 259-267 (1997).
- **Helme, J.P.; Pages, X.; Morin, O. y Parmentier, J.** *"Non-food applications of fats and oils"*. En "Oils-Fats-Lipids 1995, Proceedings of the World Congress of the International Society for Fat Research, 21st". 3, 437-451 (1996).
- **Hijazi, N.H. y Laidler, K.J.** *"Kinetic equations for consecutive reversible reactions with special reference to protein denaturations"*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases 68 (Pt. 7), 1235-1242 (1972).
- **Hizukuri, S.** *"Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules"*. Carbohydrate Research 141 (2), 295-306 (1985).
- **Hizukuri, S.** *"Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance"*. Carbohydrate Research 147 (2), 342-347 (1986).
- **Hizukuri, S.; Takeda, Y.; Yasuda, M. y Suzuki, A.** *"Multibranched nature of amylose and the action of debranching enzymes"*. Carbohydrate Research 94 (2), 205-213 (1981).

- **Hoshino, E. y Tanaka, A.** "Enhancement of enzymatic catalysis of bacillus amyloliquefaciens  $\alpha$ -amylase by nonionic surfactant micelles". Journal of Surfactants and Detergents 6 (4), 299-303 (2003).
- **Houston, J.H.** "Detergent Enzyme's Market". En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 69, 11-21 (1997).
- **Hui, Y.; Russell, J.C. y Whitten, D.G.** "Photochemical reactivity in organized assemblies. 33. Host-guest interactions in amylose inclusion complexes: photochemistry of surfactant stilbenes in helical cavities of amylose". Journal of the American Chemical Society 105 (5), 1374-1376 (1983).
- **Ikai, A. y Tanford, C.** "Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins". Nature 230 (5289), 100-102. (1971).
- **INE.** "Encuesta Industrial de Productos". <http://www.ine.es> (2005).
- **Isemura, T. y Takagi, T.** "Interaction of Taka-Amylase- $\alpha$  with Surface Active Agent". Journal of Biochemistry 46 (12), 1637-1644 (1959).
- **Jakobi, G. y Loehr, A.** "Detergents and Textile Washing: Principles and Practice". VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 248 pp. (1987).
- **Jenkins, D.; Kaufman, W.J.; McGauhey, P.H.; Horne, A.J. y Gasser, J.** "Environmental impact of detergent builders in California waters". Water Research 7 (1-2), 265-281 (1974).
- **Jensen J.** "Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment". Science of the total environment 226 (2-3), 93-111. (1999).

- **John, M.; Schmidt, J. y Kneifel, H.** *"Iodine-maltosaccharide complexes: relation between chain-length and color"*. Carbohydrate Research 119, 254-257 (1983).
- **Jones, M.N.** *"The interaction of sodium dodecyl sulfate with poly-(ethylene oxide)"*. Journal of Colloid and Interface Science. 23 (1), 36-42 (1967).
- **Jost, F.; Leiter, H. y Schwuger, M.J.** *"Synergisms in binary surfactant mixtures"*. Colloid and Polymer Science 266 (6), 554-561 (1988).
- **Kiermeier, F.; Wildbrett, G. y Mrozek, H.** *"Chemical aids for cleaning and disinfection"*. En "Reinigung und Desinfektion in der Lebensmittelindustrie". 33-78 (1996).
- **Kim, Y.J. y Robinson, R.J.** *"Effect of surfactants on starch in a model system"*. Starch/Staerke 31 (9), 293-300 (1979).
- **Kissa, E.** *"Kinetics and mechanisms of soiling and detergency"*. En "Detergency: Theory and Technology". Editores: Cutler, W.G. y Kissa, E. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 20, 193-331 (1987).
- **Knutson, C.A.; Cluskey, J.E. y Dintzis, F.R.** *"Properties of amylose-iodine complexes prepared in the presence of excess iodine"*. Carbohydrate Research 101 (1), 117-128 (1982).
- **Kottwitz, B. y Upadek, H.** *"Application of Cellulases that Contribute to Color Revival and Softening in Detergents"*. En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 69, 133-148 (1997).
- **Krawczyk, T.** *"Detergent Enzymes"*. Novozymes Inform 8 (1), 7-14. <http://www.novozymes.com> (1997).

- **Kugimiya, M.; Donovan, J.W. y Wong, R.Y.** "*Phase transitions of amylose-lipid complexes in starches: a calorimetric study*". Starch/Staerke 32 (8), 265-270 (1980).
- **Lachut, F.J.** "*Foam control strategies for formulating with alkylpolyglycoside surfactants*". En "Pesticide Formulations and Application Systems: A New Century for Agricultural Formulations, Twenty First Volume". ASTM Special Technical Publication STP 1414, 221-235 (2001).
- **Legendijk, J. y Pennings, H.J.** "*Relation Between Complex Formation of Starch With Monoglycerides and Firmness of Bread*". Cereal Science Today 15 (10), 354-356 (1970).
- **Laidler, K.J. y Bunting, P.S.** "*The Chemical Kinetics of Enzyme Action*". 2nd Edition. Clarendon Press, 415-459. (1973).
- **Lange, H.** "*Interactions of sodium alkyl sulfate and poly(vinylpyrrolidinone) in aqueous solutions*". Kolloid Zeitschrift & Zeitschrift fuer Polymere 243 (2), 101-109 (1971).
- **Lee, E.Y.C.; Mercier, C. y Whelan, W.J.** "*The fine structure of amylopectin*". Archives of Biochemistry and Biophysics 125 (3), 1028-1030 (1968).
- **Leidreiter, H.I.; Gruning, B. y Kaseborn, D.** "*Amphoteric surfactants: processing, product composition and properties*". International Journal of Cosmetic Science 19 (5), 239-253 (1997).
- **Leloup, V.; Colonna, P. y Buleon, A.** "*Transformations enzymatiques des glucides*". En "Biotransformations des Produits Céréaliés". Editor: Gondon, B. Tech. Doc. Lavoisier, Paris. 79-128 (1991).

- **Leloup, V.M.; Colonna, P. y Buelon, A.** *"Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties"*. Journal of Cereal Science 13 (1), 1-13 (1991b).
- **Long, J.E.** *"High fructose corn syrup"*. Cereal Foods World 31 (12), 862-865 (1986).
- **Luenser, S.J.** *"Microbial enzymes for industrial sweetener production"*. Developments in Industrial Microbiology Series 24, 79-96 (1983).
- **Lundqvist, H.; Eliasson, A.C. y Olofsson, G.** *"Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part II. Calorimetric study"*. Carbohydrate Polymers 49 (2), 109-120 (2002a).
- **Lundqvist, H.; Eliasson, A.C. y Olofsson, G.** *"Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part I. Surface tension measurements"*. Carbohydrate Polymers 49 (1), 43-55 (2002b).
- **Lundqvist, H.; Nilsson, G.S.; Eliasson, A.-C. y Gorton, L.** *"Changing the amylopectin-sodium dodecyl sulfate interaction by modifying the exterior chain length"*. Starch/Staerke 54 (3-4), 100-107 (2002c).
- **Madsen, G.B.; Norman, B.E. y Slott, S.** *"A new, heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction"*. Starch/Staerke 25 (9), 304-308 (1973).
- **Madsen, T.; Petersen, G.; Seieroe, C. y Toersloev, J.** *"Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate"*. Journal of the American Oil Chemists' Society 73 (7), 929-933 (1996).
- **Martinek, K.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.; Khmel'nitskii, Yu.L. y Berezin, I.V.** *"Micellar enzymology"*. European Journal of Biochemistry 155 (3), 453-468 (1986).

- **McCleary, B.V. y Sheehan, H.** "*Measurement of cereal  $\alpha$ -amylase: a new assay procedure*". Journal of Cereal Science 6 (3), 237-251 (1987).
- **McFarland, J.H. y Kinkel, P.R.** "*Performance and properties of nonionic surfactants from linear secondary alcohols*". Journal of the American Oil Chemists' Society 41 (11), 742-745 (1964).
- **McGhee, J.D. y Von Hippel, P.H.** "*Theoretical aspects of DNA-protein interactions. Co-operative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice*". Journal of Molecular Biology 86 (2), 469-489 (1974).
- **McGrance, S.J.; Cornell, H.J. y Rix, C.J.** "*A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products*". Starch/Staerke 50 (4), 158-163 (1998).
- **McIlvaine, T.C.** "*A buffer solution for colorimetric comparison*". Journal of Biological Chemistry 49, 183-186 (1921).
- **Mercier, C.** "*L'amidon et les enzymes en sucrochimie*". Industries Alimentaires et Agricoles 99, 787-796 (1982).
- **Mercier, C.** "*Les enzymes amylolytiques*". En "Hydrolases et dépolymérasés". Editores: Mouranche, A. y Costes, C. Gauthier Villars, 109-142 (1985).
- **Meyer, K.H. y Bernfeld, P.** "*Starch. V. Amylopectin*". Helvetica Chimica Acta 23, 875-885 (1940).
- **Mezzanotte, V.; Bolzacchini, E.; Orlandi, M.; Rozzi, A. y Rullo, S.** "*Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates*". Bioresource Technology 82 (2), 151-156 (2002).

- **Mezzanotte, V.; Castiglioni, F.; Todeschini, R. y Pavan, M.** *"Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants"*. *Bioresource Technology* 87 (1), 87-91 ( **2003**).
- **Miller, G.L.** *"Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar"*. *Analytical Chemistry* 31, 426-428 ( **1959**).
- **Montserret, R.; McLeish, M.J.; Boeckmann, A.; Geourjon, C. y Penin, F.** *"Involvement of Electrostatic Interactions in the Mechanism of Peptide Folding Induced by Sodium Dodecyl Sulfate Binding"*. *Biochemistry* 39 (29), 8362-8373 ( **2000**).
- **Moulik, S.P. y Gupta, S.** *"Environment-induced, physicochemical behavior of amylose-iodine complexes"*. *Carbohydrate Research* 71, 251-264 ( **1979**).
- **Muhrbeck, P. y Tellier, C.** *"Determination of the phosphorylation of starch from native potato varieties by phosphorus-31 NMR"*. *Starch/Staerke* 43 (1), 25-27 ( **1991**).
- **Munck, L.; Rexen, F. y Haastrup, L.** *"Cereal starches within the European Community: agricultural production, dry and wet milling and potential use in industry"*. *Starch/Staerke* 40 (3), 81-87 ( **1988**).
- **Murata, M. y Arai, H.** *"Interaction between polymer and surfactant. Effect of temperature and added salt on the interaction between poly(vinylpyrrolidinone) and sodium dodecyl sulfate"*. *Journal of Colloid and Interface Science* 44 (3), 475-480 ( **1973**).
- **Negulescu, C. y Negulescu, M.** *"Phosphorus removal from wastewaters. An important target to prevent eutrophication"*. *Environmental Engineering and Management Journal* 3 (4), 611-615 ( **2004**).

- **Nelson, N.** "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". *Journal of Biological Chemistry* 153, 375-80 (1944).
- **Nickel, D.; Nitsch, C.; Kurzendoerfer, P. y Von Rybinski, W.** "Interfacial properties of surfactant mixtures with alkyl polyglycosides". *Progress in Colloid & Polymer Science* 89 (Trends Colloid Interface Sci. VI), 249-252 (1992).
- **Nieendick, C. y Schmid, K.-H.** "Alkyl polyglycosides a new generation of surfactants for the use in manual dishwashing agents". Comunicaciones presentadas a las Jornadas del Comité Español de la Detergencia: 26, 63-77 (1995).
- **Nouri, M.** "Hidrólisis enzimática de harina de trigo". Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada (1993).
- **Novozymes A/S.** "Determination of Alpha-Amylase Activity (KNU and FAU). Analytical Method EB-SM-0009.02/01". <http://www.novozymes.com> (2002a).
- **Novozymes A/S.** "Determination of Alpha-Amylase Activity. Analytical Method LUNA # 2000-10338-01". <http://www.novozymes.com> (2002b).
- **Novozymes A/S.** "Enzyme Handbook (Detergents)". 48-93. <http://www.novozymes.com> (2002c).
- **Ochoa Gómez, J.R.** "Formulaciones industriales". En "Detergentes". Pérez Dorado, A.A. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid. 87-116 (1996).
- **Ohnishi, M. y Hiromi, K.** "General considerations for conditions and methods of amylase assay". En "Handbook of Amylases and Related Enzymes. Their Sources, Isolation Methods, Properties and Applications". Editor: The Amylase Research Society of Japan. Pergamon, Oxford. (10-12), 288 pp (1988).

- **Ohura, H.; Imato, T.; Asano, Y. y Yamasaki, S.** "Potentiometric flow injection determination of amylase activity by using hexacyanoferrate(III)-hexacyanoferrate(II) potential buffer". *Talanta* 45 (3), 565-573 (1998).
- **Okuda, K.; Naka, K.I. y Shimojo, N.** "Clinical assay of  $\alpha$ -amylase activity in body fluids". En "Handbook of Amylases and Related Enzymes. Their Sources, Isolation Methods, Properties and Applications". Editor: The Amylase Research Society of Japan. Pergamon, Oxford. (178-185), 288 pp (1988).
- **Olsen, H.S.** "Cleaning-in-place of process equipment with a solution containing protease and lipase".(Novo Nordisk A/S, D. Patente WO 9702753 (1997).
- **Olsen, H.S. y Falholt, P.** "The role of enzymes in modern detergency". *Journal of Surfactants and Detergents* 1 (4), 555-567 (1998).
- **Ozbek, B. y Yuceer, S.** "  $\alpha$ -Amylase inactivation during wheat starch hydrolysis process". *Process Biochemistry* 37 (1), 87-95 (2001).
- **Padday, J.F.** "The measurement of surface tension". En "Surface and Colloid Science, Vol. 1". Editor: Matijevic, E. Wiley-Interscience, New York. 101-149 (1969).
- **Panati, C.** "Extraordinary Origins of Everyday Things". Harper Perennial, London. 152-155 (1989).
- **Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D. y Mohan, R.** "Advances in microbial amylases". *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31 (2), 135-152 (2000).

- **Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.P.; Rios, G.M. y Zakhia, N.** *"The effect of enzyme concentration and space time on the performance of a continuous recycle membrane reactor for one-step starch hydrolysis"*. Biochemical Engineering Journal 5 (1), 17-22 (2000a).
- **Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.P.; Zakhia, N. y Rios, G.M.** *"Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl enzyme"*. Biotechnology and Bioengineering 68 (1), 71-77 (2000b).
- **Park, J.T. y Johnson, M.J.** *"Submicrodetermination of glucose"*. Journal of Biological Chemistry 181, 149-151 (1949).
- **Park, J.T. y Rollings, J.E.** *"Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I. Amylose/amylopectin  $\alpha$ -amylolysis"*. Biotechnology and Bioengineering 44 (7), 792-800 (1994).
- **Parrish, F.W.; Smith, E.E. y Whelan, W.J.** *"Actions of starch carbohydrases on chemically modified maltodextrins"*. Archives of Biochemistry and Biophysics 137 (1), 185-189 (1970).
- **Patino, J.M.R.; Guerrero, C.A.F. y Gallegos, M.C.** *"Detergentes con bajo contenido en fosfato"*. Ingeniería Química 22 (259), 229-238 (1990).
- **Pitter, P.** *"Polyphosphates in detergents, yes or no?"*. Vodni Hospodarstvi & Ochrana Ovzdusi 43 (4), 9-11 (1993).
- **Pramod, K.; Horner, T.W.; Ohtani, R.; Baeck, A.C. y Rai, S.** *"Dingy fabric clean-up with amylase enzyme in detergent compositions"*. Procter & Gamble Company. Patente WO 9704067 (1997).

- **Przondo, J.** *"Surfactants today and tomorrow"*. Pollena: *Pluszcze, Srodki Piorace, Kosmetyki* 40 (10), 421-430 (1996).
- **Robin, J.P.** *"Study of  $\beta$ -limit dextrins from various native starches. Interpretation in term of amylopectin structure"*. *Sciences des Aliments* 1 (4), 551-567 (1981).
- **Robyt, J.F.** *"Enzymes in the Hydrolysis and Synthesis of Starch"*. En *"Starch: Chemistry and Technology"*. 2nd Edition. Editores: Whistler, R.L.; Bemiller, J.N. y Paschall, E.F. Academic Press, Inc., San Diego, California. 87-123 (1984).
- **Robyt, J.F.; Ackerman, R.J. y Keng, J.G.** *"Reducing value methods for maltodextrins. II. Automated methods and chain-length independence of alkaline ferricyanide"*. *Analytical Biochemistry* 45 (2), 517-524 (1972).
- **Robyt, J.F. y Whelan, W.J.** *"Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper"*. *Analytical Biochemistry* 45 (2), 510-516 (1972).
- **Rosendal, P.; Nielsen, B.H. y Lange, N.K.** *"Stability of bacterial  $\alpha$ -amylase in the starch liquefaction process"*. *Starch/Staerke* 31 (11), 368-372 (1979).
- **Russell, G.L. y Britton, L.N.** *"Use of certain alcohol ethoxylates to maintain protease stability in the presence of anionic surfactants"*. *Journal of Surfactants and Detergents* 5 (1), 5-10 (2002).
- **Rutschmann, M.A. y Solms, J.** *"Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. II. Study of ligand binding in binary model systems with decanal, 1-naphthol, monostearate and monopalmitate"*. *Food Science and Technology* 23 (1), 70-79 (1990).

- **Röhm, O.** "*Disinfecting process for hides and skins in tanning*". Patente alemana DE 283923 (1913).
- **Sabahi, N.** "*Caracterización de Tensioactivos: Poder Espumante y Tensiones Superficiales*". Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada (2004).
- **Sachdev, A. y Krishnan, S.** "*Heavy-duty liquid detergents*". En "Liquid Detergents". Editor: Lai, K.Y. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 67, 261-324 (1997).
- **Scatchard, G.** "*The attraction of proteins for small molecules and ions*". Annals of the New York Academy of Sciences 51, 660-672 (1949).
- **Schmid, K. y Tesmann, H.** "*Alkyl polyglycosides*". En "Detergency of Specialty Surfactants". Editor: Friedli, F.E. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 98, 1-69 (2001).
- **Schulz, P.** "*Chemistry and technology of alkyl glycosides*". Chimica Oggi 10 (8-9), 33-38 (1992).
- **Schwardt, E.** "*Production and use of enzymes degrading starch and some other polysaccharides*". Food Biotechnology 4 (1), 337-351 (1990).
- **Scott, M.J. y Jones, M.N.** "*The biodegradation of surfactants in the environment*". Biochimica et Biophysica Acta 1508 (1-2), 235-251 (2000).
- **Sheehan, H. y McCleary, B.V.** "*A new procedure for the measurement of fungal and bacterial  $\alpha$ -amylase*". Biotechnology Techniques 2 (4), 289-292 (1988).

- **Shirahama, K. y Ide, N.** *"The interaction between sodium alkylsulfates and poly(ethylene oxide) in 0.1 M sodium chloride solutions"*. Journal of Colloid and Interface Science 54 (3), 450-452 (1976).
- **Siegfried, M. y Baumann, U.** *"Biological degradability of alcohol ethoxylates"*. Parfuemerie und Kosmetik 74 (11), 692-698 (1993).
- **Sinner, M. y Puls, J.** *"Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography"*. Journal of Chromatography 156 (1), 197-204 (1978).
- **Slaughter, S.L.; Ellis, P.R. y Butterworth, P.J.** *"An investigation of the action of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase on native and gelatinised starches"*. Biochimica et Biophysica Acta 1525 (1-2), 29-36 (2001).
- **Slott, S.; Madsen, G. y Norman, B.E.** *"Application of a heat stable bacterial amylase in the starch industry"*. En "Enzyme Engineering". Editores: Kendall, P.E. y Wingard, L.B.Jr. Plenum, New York. 343-350 (1974).
- **Somogyi, M.** *"Notes on sugar determination"*. Journal of Biological Chemistry 195, 19-23 (1952).
- **Sorensen, S.P.L.** *"Enzyme Studies. II. The Measurement and Importance of the Hydrogen Ion Concentration in Enzyme Reactions"*. Biochemische Zeitschrift 21, 131-304 (1909).
- **Stephan, R.** *"Cationic surfactants in cleaner formulations"*. Tenside, Surfactants, Detergents 29 (3), 205-210 (1992).
- **Svensson, E.; Gudmundsson, M. y Eliasson, A.-C.** *"Binding of sodium dodecylsulfate to starch polysaccharides quantified by surface tension measurements"*. Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces 6 (4/5), 227-233 (1996).

- **Szymanski, A.; Wyrwas, B.; Swit, Z.; Jaroszynski, T. y Lukaszewski, Z.** "Biodegradation of fatty alcohol ethoxylates in the continuous flow activated sludge test". *Water Research* 34 (16), 4101-4109 (2000).
- **Tanaka, A. y Hoshino, E.** "Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase determined by inactivation kinetics". *Biochemical Journal* 364 (3), 635-639 (2002a).
- **Tanaka, A. y Hoshino, E.** "Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with *Bacillus*  $\alpha$ -amylases in a diluted anionic surfactant solution". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (5), 485-490 (2002b).
- **Tatsumi, T.; Zhang, W.; Nakatsuji, Y.; Miyake, K.; Matsushima, K.; Tanaka, M.; Furuta, T. y Ikeda, I.** "Preparation, surface-active properties, and antimicrobial activities of bis(alkylammonium) dichlorides having a butenylene or a butynylene spacer". *Journal of Surfactants and Detergents* 4 (3), 271-277 (2001).
- **Tester, R.F. y Morrison, W.R.** "Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids". *Cereal Chemistry* 67 (6), 551-557 (1990).
- **Upadek, H. y Kottwitz, B.** "Application of amylases in detergents". En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. *Surfactant Science Series* 69, 203-212 (1997).
- **Valea, A. y Gozález, M.L.** "Comportamiento de los Tensioactivos en Disolución". Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao. 33-36 (1990).

- **van Ee, J.H.** *"Historical Overview"*. En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 69, 1-10 (1997).
- **Vihinen, M. y Mantsala, P.** *"Microbial amylolytic enzymes"*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 24 (4), 329-418 (1989).
- **Violet, M. y Meunier, J.C.** *"Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of Bacillus licheniformis  $\alpha$ -amylase"*. Biochemical Journal 263 (3), 665-670 (1989).
- **von Rybinski, W. y Hill, K.** *"Alkyl polyglycosides - properties and applications of a new class of surfactants"*. Angewandte Chemie, International Edition 37 (10), 1328-1345 (1998).
- **Whistler, R.L. y Daniel, J.R.** *"Molecular structure of starch"*. En "Starch: Chemistry and Technology.". 2nd Edition. Editores: Whistler, R.L.; Bemiller, J.N. y Paschall, E.F. Academic Press, Inc., San Diego, California. 153-184 (1984).
- **Wildbrett, G.** *"Limpieza y desinfección en la industria alimentaria"*. Acribia, Zaragoza. 362 pp. (2000).
- **Wojciechowski, P.M.; Koziol, A. y Noworyta, A.** *"Iteration model of starch hydrolysis by amylolytic enzymes"*. Biotechnology and Bioengineering 75 (5), 530-539 (2001).
- **Wolff, A.M. y Showell, M.S.** *"Application of Lipases in Detergents"*. En "Enzymes in detergency". Editores: van Ee, J.H.; Misset, O. y Baas, E.J. Marcel Dekker Inc., New York. Surfactant Science Series 69, 93-106 (1997).

- **Wüstneck, R. y Wasow, G.** *"Studies on surfactant interaction. Relation between the interaction parameters of a generalized Frumkin-Damaskin isotherm and some properties of surfactant mixtures"*. Tenside, Surfactants, Detergents 33 (2), 130-137 (1996).
- **Yadav, V.G. y Vyas, J.R.** *"Applications of quaternary surface active agents"*. Speciality Chemicals 19 (6), 244-245, 247-248 (1999).
- **Yamamoto, M.; Sano, T.; Harada, S. y Yasunaga, T.** *"Cooperativity in the binding of sodium dodecyl sulfate to amylose"*. Bulletin of the Chemical Society of Japan 56 (9), 2643-2646 (1983).
- **Yamamoto, M.; Sano, T. y Yasunaga, T.** *"Interaction of amylose with iodine. I. Characterization of cooperative binding isotherms for amyloses"*. Bulletin of the Chemical Society of Japan 55 (6), 1886-1889 (1982).
- **Zeleznek, K.J. y Hosoney, R.C.** *"The glass transition in starch"*. Cereal Chemistry 64 (2), 121-124 (1987).



## **LISTA DE FIGURAS**



INTRODUCCIÓN

Figura 3.1 Amilosa.....	26
Figura 3.2 Amilopectina.....	27
Figura 3.3 Estructura ramificada de la amilopectina.....	28
Figura 3.4 Ciclo de la investigación en el desarrollo de los detergentes actuales.....	43
Figura 3.5 Consumo total de tensioactivos en España en el periodo 1993-2003.....	46
Figura 3.6 Cantidad de tensioactivos por tipos consumida en España en el periodo 1993-2003.....	47
Figura 3.7 Gasto económico en tipo de tensioactivo consumido en España en el periodo 1993-2003.....	48
Figura 3.8 Consumo de detergentes y productos limpiadores en España en el periodo 1993-2003.....	49
Figura 3.9 Componentes de las formulaciones detergentes.....	52
Figura 3.10. Principales familias de tensioactivos aniónicos.....	54
Figura 3.11 Principales familias de tensioactivos catiónicos.....	56
Figura 3.12 Principales familias de tensioactivos no iónicos.....	57
Figura 3.13. Consumo de enzimas en detergentes.....	68
Figura 3.14. Representación teórica de la tensión superficial frente a concentración de tensioactivo con y sin polímero.....	77
Figura 3.15 Hélice interrumpida.....	80
Figura 3.16 Complejo amilosa-tensioactivo.....	81
Figura 3.17 Complejo amilopectina-tensioactivo.....	81
Figura 3.18 Gráfico de Scatchard.....	85
Figura 3.19 Grafico de Scatchard para enlace no cooperativo según la isoterma de McGhee y Von Hippel 1974.....	87
Figura 3.20 Grafico de Scatchard para enlace cooperativo según la isoterma de McGhee y Von Hippel 1974.....	88
Figura 3.21 Estructura desordenada tipo “random coil” para la amilosa.....	90
Figura 3.22 Isoterma teórica para la unión entre CTAB y almidón de patata (75 % amilopectina, 25 % amilosa). $\diamond$ Almidón, $\Delta$ contribución de la amilopectina, $\square$ contribución de la amilosa.....	91

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Figura 4.1 Recta patrón para determinación del % en peso de amilosa en una muestra de almidón.....	100
Figura 4.2 Absorbancia frente a longitud de onda a diferentes tiempos de ebullición.....	104
Figura 4.3 Recta de calibrado método yodométrico.....	106
Figura 4.4 Barridos de longitud de onda.....	111
Figura 4.5 Representación del cociente entre la absorbancia media, $\bar{A}$ , y la absorbancia a 575 nm, $Abs_{575}$ , frente al incremento de longitud de onda considerado en torno al máximo, $\Delta\lambda$ .....	114
Figura 4.6 Conversión frente a longitud de onda.....	115
Figura 4.7 Relación entre conversión media y conversión a 575 nm para diferentes valores de $\Delta\lambda$ .....	116
Figura 4.8 Fórmulas moleculares de los tensioactivos.....	121
Figura 4.9 Recta de calibrado para actividad de $\alpha$ -amilasa con tabletas Phadebas®.....	123
Figura 4.10 Esquema del proceso contacto entre la placa y el líquido.....	125

**DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

Figura 6.1.....	161
Figura 6.2.....	162
Figura 6.3.....	162
Figura 6.4.....	162
Figura 6.5.....	163
Figura 6.6.....	163
Figura 6.7.....	163
Figura 6.8.....	164
Figura 6.9 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la concentración de almidón hidrolizado.....	167

Figura 6.10 .....	168
Figura 6.11 .....	169
Figura 6.12 .....	169
Figura 6.13 .....	169
Figura 6.14 .....	170
Figura 6.15 .....	170
Figura 6.16 Influencia del pH sobre el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima .....	171
Figura 6.17 Influencia del pH sobre la actividad relativa de la enzima .....	172
Figura 6.18 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 65 °C. ....	175
Figura 6.19 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 75 °C. ....	175
Figura 6.20 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 60 °C para distintos tiempos previos.....	176
Figura 6.21 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 65 °C para distintos tiempos previos.....	177
Figura 6.22 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 70 °C para distintos tiempos previos.....	177
Figura 6.23 Influencia del producto concentración inicial de enzima por tiempo de reacción sobre la conversión a 75 °C para distintos tiempos previos.....	178
Figura 6.24 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 60 °C.....	181
Figura 6.25 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 65 °C.....	181
Figura 6.26 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 70 °C.....	182
Figura 6.27 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la conversión considerando la desactivación a 75 °C.....	182
Figura 6.28 Ajuste tipo Arrhenius de la constante de desactivación de segundo orden.....	183
Figura 6.29 Representación de A frente a B a 37 °C.....	186
Figura 6.30 Representación de A frente a B a 55 °C.....	186

Figura 6.31 Representación de A frente a B a 65 °C.....	187
Figura 6.32 Representación de A frente a B a 75 °C.....	187
Figura 6.33 Ajuste tipo Arrhenius de $K_M$ .....	188
Figura 6.34 Ajuste tipo Arrhenius de $y$ y $k$ .....	188
Figura 6.35 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 37 °C. a) $S_{i\text{ medio}} = 1.73$ g/L. b) $S_{i\text{ medio}} = 0.83$ g/L. c) $S_{i\text{ medio}} = 0.40$ g/L. d) $S_{i\text{ medio}} = 0.19$ g/L.....	189
Figura 6.36 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 55 °C. a) $S_{i\text{ medio}} = 0.90$ g/L. c) $S_{i\text{ medio}} = 0.40$ g/L. d) $S_{i\text{ medio}} = 0.19$ g/L. ...	191
Figura 6.37 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 65 °C. a) $S_{i\text{ medio}} = 1.68$ g/L. b) $S_{i\text{ medio}} = 0.87$ g/L. c) $S_{i\text{ medio}} = 0.46$ g/L. d) $S_{i\text{ medio}} = 0.22$ g/L.....	193
Figura 6.38 Representación de la conversión frente al producto concentración inicial de enzima por tiempo para los datos experimentales y para el modelo cinético a 75 °C. a) $S_{i\text{ medio}} = 1.66$ g/L. b) $S_{i\text{ medio}} = 0.88$ g/L. c) $S_{i\text{ medio}} = 0.44$ g/L. d) $S_{i\text{ medio}} = 0.21$ g/L.....	195
Figura 6.39 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de LAS a 37°C en presencia y ausencia de almidón.....	200
Figura 6.40 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucocon 215, a), y frente a la concentración de Glucocon 215, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	201
Figura 6.41 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucocon 600, a), y frente a la concentración de Glucocon 600, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	202
Figura 6.42 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Glucocon 650, a), y frente a la concentración de Glucocon 650, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	203
Figura 6.43 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 10/15, a), y frente a la concentración de Findet 10/15, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	204

Figura 6.44 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 1214N/23, a), y frente a la concentración de Findet 1214N/23, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	205
Figura 6.45 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 1214N/23, a), y frente a la concentración de Findet 1214N/23, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón, con tampón fosfato 0.1M y pH de 7.5... ..	206
Figura 6.46 Tensión superficial frente al logaritmo de la concentración de Findet 9Q/21.5NF, a), y frente a la concentración de Findet 9Q/21.5NF, b), a 37°C en presencia y ausencia de almidón. ....	207
Figura 6.47 Concentración de GlucoPON 215 ligado frente a concentración total de GlucoPON 215, a 37 °C y en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L. ....	209
Figura 6.48 Concentración de GlucoPON 600 ligado frente a concentración total de GlucoPON 600, a 37 °C y en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L. ....	209
Figura 6.49 Concentración de GlucoPON 650 ligado frente a concentración total de GlucoPON 650, a 37 °C y en presencia de almidón a concentraciones de $S_i = 0.84$ g/L y de $S_i = 2.52$ g/L. ....	210
Figura 6.50 Concentración de Findet 10/15 ligado frente a concentración total de Findet 10/15, a 37 °C y en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L. ....	210
Figura 6.51 Concentración de Findet 1214N/23 ligado frente a concentración total de Findet 1214N/23, a 37 °C y en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L.....	211
Figura 6.52 Concentración de Findet 1214N/23 ligado frente a concentración total de Findet 1214N/23, a 37 °C, en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L y de tampón fosfato 0.1M y pH de 7.5. ....	211
Figura 6.53 Concentración de Findet 9Q/21.5NF ligado frente a concentración total de Findet 9Q/21.5NF, a 37 °C y en presencia de almidón $S_i = 0.84$ g/L.....	212
Figura 6.54 Isoterma de enlace del GlucoPON 215 al almidón de patata. ....	217
Figura 6.55 Gráfico de Scatchard para el GlucoPON 215.....	217
Figura 6.56 Isoterma de enlace del GlucoPON 600 al almidón de patata. ....	218
Figura 6.57 Gráfico de Scatchard para el GlucoPON 600.....	218
Figura 6.58 Isoterma de enlace del GlucoPON 650 al almidón de patata. ....	219
Figura 6.59 Gráfico de Scatchard para el GlucoPON 650.....	219
Figura 6.60 Isoterma de enlace del Findet 10/15 al almidón de patata.....	220
Figura 6.61 Gráfico de Scatchard para el Findet 10/15. ....	220

Figura 6.62 Isotherma de enlace del Findet 1214N/23 al almidón de patata. ....	221
Figura 6.63 Gráfico de Scatchard para el Findet 1214N/23.....	221
Figura 6.64 Isotherma de enlace del Findet 1214N/23 al almidón de patata en disolución de tampón fosfato 0.1M pH = 7.5.....	222
Figura 6.65 Gráfico de Scatchard para el Findet 1214N/23 en disolución de tampón fosfato 0.1M pH = 7.5.....	222
Figura 6.66 Isotherma de enlace del Findet 9Q/21.5NF al almidón de patata. ....	223
Figura 6.67 Gráfico de Scatchard para el Findet 9Q/21.5NF.....	223

## **LISTA DE TABLAS**



**INTRODUCCIÓN**

Tabla 1.1. Agentes químicos más empleados para la limpieza en la industria .....	4
Tabla 1.2. Desinfectantes más empleados en la industria.....	4
Tabla 3.1 Porcentaje de amilosa y amilopectina de almidones de diferente origen. ..	23
Tabla 3.2 Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón. ....	31
Tabla 3.3 Propiedades y origen de algunas amiloglicosidasas ( <i>Pandey y col. 2000</i> ). 32	
Tabla 3.4 Propiedades y origen de $\alpha$ y $\beta$ amilasas ( <i>Pandey y col. 2000</i> ). ....	33
Tabla 3.5 Propiedades y origen de algunas isoamilasas y pululanasa ( <i>Atkinson y Mavituna 1991</i> .....	34
Tabla 3.6. Tensioactivos más empleados ( <i>Bailón Moreno 2003</i> ).....	45
Tabla 3.7 Composición de algunos detergentes. ....	53

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Tabla 4.1 Análisis elemental y composición teórica del almidón.....	98
Tabla 4.2 Recta patrón para determinación del % en peso de amilosa en una muestra de almidón. ....	100
Tabla 4.3 Recta de calibrado método yodométrico. ....	106
Tabla 4.4 Propiedades de los tensioactivos ensayados. <sup>(1)</sup> Datos suministrados por el fabricante. <sup>(2)</sup> Datos de <i>Cuevas Aranda 2001</i> . <sup>(3)</sup> Datos de <i>Bravo Rodríguez y col. en prensa</i> . <sup>(4)</sup> Datos de <i>Sabahi 2004</i> . <sup>(5)</sup> Valor de dos muestras secadas en una balanza de infrarrojos de la casa AND, modelo AD-4714A, a 102 °C durante 30 minutos. ....	121
Tabla 4.5 Recta de calibrado para actividad de $\alpha$ -amilasa con tabletas Phadebas®. 123	

**RESULTADOS EXPERIMENTALES**

Tabla 5.1.....	131
Tabla 5.2.....	131
Tabla 5.3.....	132

Tabla 5.4 .....	132
Tabla 5.5 .....	132
Tabla 5.6 .....	132
Tabla 5.7 .....	132
Tabla 5.8 .....	132
Tabla 5.9 .....	133
Tabla 5.10 .....	133
Tabla 5.11 .....	133
Tabla 5.12 .....	133
Tabla 5.13 .....	134
Tabla 5.14 .....	134
Tabla 5.15 .....	135
Tabla 5.16 .....	135
Tabla 5.17 .....	135
Tabla 5.18 .....	135
Tabla 5.19 .....	136
Tabla 5.20 .....	136
Tabla 5.21 .....	136
Tabla 5.22 .....	136
Tabla 5.23 .....	137
Tabla 5.24 .....	137
Tabla 5.25 .....	137
Tabla 5.26 .....	137
Tabla 5.27 .....	138
Tabla 5.28 .....	138
Tabla 5.29 .....	138
Tabla 5.30 .....	138
Tabla 5.31 .....	139
Tabla 5.32 .....	139
Tabla 5.33 .....	139
Tabla 5.34 .....	139
Tabla 5.35 .....	140
Tabla 5.36 .....	140

Tabla 5.37.....	140
Tabla 5.38.....	140
Tabla 5.39.....	141
Tabla 5.40.....	141
Tabla 5.41.....	142
Tabla 5.42.....	142
Tabla 5.43.....	142
Tabla 5.44.....	142
Tabla 5.45.....	143
Tabla 5.46.....	143
Tabla 5.47.....	143
Tabla 5.48.....	143
Tabla 5.49.....	144
Tabla 5.50.....	144
Tabla 5.51.....	144
Tabla 5.52.....	144
Tabla 5.53.....	145
Tabla 5.54.....	145
Tabla 5.55.....	145
Tabla 5.56.....	145
Tabla 5.57.....	146
Tabla 5.58.....	146
Tabla 5.59.....	146
Tabla 5.60.....	146
Tabla 5.61.....	147
Tabla 5.62.....	147
Tabla 5.63.....	147
Tabla 5.64.....	147
Tabla 5.65.....	148
Tabla 5.66.....	148
Tabla 5.67.....	148
Tabla 5.68.....	148
Tabla 5.69.....	149

Tabla 5.70 .....	149
Tabla 5.71 .....	150
Tabla 5.72 .....	151
Tabla 5.73 .....	151
Tabla 5.74 .....	152
Tabla 5.75 .....	152
Tabla 5.76 .....	153
Tabla 5.77 .....	153
Tabla 5.78 .....	153
Tabla 5.79 .....	154
Tabla 5.80 .....	154
Tabla 5.81 .....	155
Tabla 5.82 .....	155
Tabla 5.83 .....	156
Tabla 5.84 .....	156
Tabla 5.85 .....	157
Tabla 5.86 .....	157
Tabla 5.87 .....	158
Tabla 5.88 .....	158

**DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

Tabla 6.1 Influencia de la intensidad de tratamiento sobre la concentración de almidón hidrolizado, la conversión y la actividad. ....	165
Tabla 6.2 .....	167
Tabla 6.3 .....	167
Tabla 6.4 .....	168
Tabla 6.5 .....	168
Tabla 6.6 .....	168
Tabla 6.7 .....	168
Tabla 6.8 Influencia del pH sobre el cociente entre la velocidad de reacción y la concentración inicial de enzima y sobre la actividad . ....	171

Tabla 6.9 Valores iniciales de $k_d$ para $n = 2$ , valores optimizados de $n$ y $k_d$ en la comprobación de $n = 2$ y valores optimizados de $k_d$ para $n = 2$ , a las temperaturas de 60, 65, 70 y 75 °C. ....	180
Tabla 6.10 Valores obtenidos de $K_M$ y $k$ a 37, 55, 65 y 75 °C. ....	187
Tabla 6.11 Actividad enzimática relativa media en presencia de diferentes tensioactivos. ....	198
Tabla 6.12 Concentraciones micelares críticas, tensiones superficiales y cantidad de tensioactivo comercial ligado en presencia de almidón. ....	213
Tabla 6.13 Concentraciones micelares críticas, tensiones superficiales y cantidad de tensioactivo puro (sin humedad) ligado en presencia de almidón. ....	213



## **ANEXO: DOCTORADO EUROPEO**



# **USE OF $\alpha$ -AMYLASES IN THE FORMULATION OF INDUSTRIAL DETERGENTS**

Ph.D Student

**Juan Francisco Martínez Gallegos**

Thesis Supervisors

**Ph.D. Vicente Bravo Rodríguez**

**Ph.D. Antonia Reyes Requena**

**Ph.D. Encarnación Jurado Alameda**

Granada, September 2005



## OBJECTIVES

The Spanish Industry of Detergents and Cleaning products has a total annual income of 1450 million euros, with an approximate annual output of 2.025 million metric tons (data from the Industrial Products' Poll of the Spanish Statistics National Institute corresponding to year 2003). Therefore it is an important industrial activity, with large diversification of products, giving employment to thousands of people and with a big impact on the overall economic activity of the Chemical Industry.

The food industries must offer to consumers high quality products, without pathogenic microorganism nor toxins. So it is indispensable to do cleaning and disinfection cycles regularly in short periods of time (*Wildbrett 2000*). There is a special sector in the detergents' market that represents a 10 % of the total market, which produces special cleaning products for industries, restaurants and hotel business. These technical detergents are highly polluting agents due to their special chemical composition, and if it is taken into account the quantity and the frequency of the effluents their effect upon sewage is very intense. These causes eutrophication and eco-toxicity problems, negative effects on human health, etc.

The food industry annually invests millions of euros to prevent pathogenic microorganism growth on their products, being indispensable a high performance cleaning system. The consumption of cleaning and disinfectant agents is very high; as an example *Kiermeier et al 1996* estimated that 130000 tons are annually used in Germany. Furthermore there is a rising tendency in consumers claiming high organoleptic and bacterial quality, the law is every time more restrictive and taxes on the effluents of these industries are continuously increasing.

The future of production and consumption of these detergents and cleaning agents is going to be strongly conditioned to ecological, energetic and health factors. The detergent ought to have a balanced performance regarding its price, low-temperature efficiency (energetic saving), maximum yield for different surfaces, no toxicity, no skin irritability, highly biodegradable, etc. All these facts imply that

the formulation of detergents nowadays requires an extraordinary effort on technical and applied research. This is leading to restate the present formulations in hotel business and food industry, looking for alternatives less harmful to the environment which also provide enough washing efficiency. The use of enzymes in these new formulations allows reducing the employ of other more aggressive chemicals, with the added advantage of higher performance at lower temperatures. Another feasible alternative is the substitution of the classical surfactants for other more respectful to the environment and compatible with those enzymes.

The objectives of this Doctoral Thesis are included in the investigation projects of the Chemical Engineering Department Research Groups “Interface Engineering and Biochemical Technology” and “Enzymes, Surfactants and Emulsions” of the University of Granada, which look for a new possible formulation of technical enzyme based liquid detergents, avoiding or attenuating harmful effects on environment and health due to the effluents, sewages and non voluntary intake of these products, and the reduction of energetic expenditure using lower washing temperatures. Particularly the present Doctoral Thesis is being aimed to characterized  $\alpha$ -amylases and their interactions with non-ionic surfactants such as fatty alcohol ethoxylates and alkyl polyglycosides that can be included in detergent formulations intended for the removal of starchy soils from hard surfaces.

Therefore the objectives are:

- The study of the enzymatic hydrolysis of starch with a commercial  $\alpha$ -amylase used in detergent formulations. It will be considered the influence of the enzyme concentration, pH, temperature and substrate concentration upon the enzymatic reaction. Based on the experimental data obtained a kinetic model for the hydrolysis will be proposed.
- The determination of the influence of the presence of surfactants such as commercial fatty alcohol ethoxylates and alkyl polyglycosides upon the enzymatic activity, and compare the obtained results with those corresponding to

other classical surfactants such as linear alkyl benzene sulphonates and alkyl phenol ethoxylates.

- The analysis of the feasible interactions between the soil (starch) and the surfactants in order to determine their possible influence on the deterative properties of the surfactants.

All this study would give the most meaningful information in order to plan and develop a later research on the removal of starchy soils from hard surfaces based on washing tests

## SUMMARY

The starting point of this Doctoral Thesis was to characterize the substrate which is the source of the soil, i.e. the starch. Soluble potato starch from Panreac was used as substrate. To measure the moisture in the starch an infrared balance was used and the water content obtained was 16.0 %. Afterwards an elemental analysis of the starch was made in order to verify the presence of possible impurities; the experimental composition obtained was compared with the theoretical one and suggested the impurities were negligible. Finally the proportion of amylose and amylopectin in starch was spectrophotometrically measured, according to the method described by *McGrance et al 1998* to calculate the amylose content in starch, obtaining a  $19.8 \pm 0.2$  % amylose content. Therefore amylopectin content was  $80.2 \pm 0.2$  %.

A commercial  $\alpha$ -amylase from *bacillus licheniformis* (Termamyl® 300 L Type DX from Novozymes A/S) was studied to use it in new detergent formulations.

To follow the enzyme reaction we developed an analysis procedure based on the iodometric method for measuring amylase activity described by *Fuwa 1954*. This

method lies on the capacity of amylose to bind iodine giving a blue coloured inclusion complex which absorbance can be measured on a spectrophotometer. A series of tests were assayed to check the complete dissolution of starch. Aliquots from a starch solution were boiled for different periods of time, subsequently stained with iodine and finally a wave length scan of them was done. A time of 3 minutes showed to be long enough to ensure starch complete dissolution and a clear solution was obtained once it was totally dissolved. The next step was the absorbance wave length selection, since the starch-iodine complex absorbs at different wave length depending on the degree of polymerization of the amylose (*John et al. 1983*). According to this fact the starch absorbs at multiple wave lengths due to its not fixed degree of polymerization which varies in a wide range. The optimum wave length selected was the maximum one observed in starch solutions wave lengths scans, corresponding it to the fraction of amylose whose degree of polymerization represents the largest proportion. So the wave length chosen was 575 nm.

The procedure followed for the experiments was defined once the starch analysis had been established. To stop the enzymatic reaction the pH was lowered and the reaction mixture was immediately boiled to deactivate the  $\alpha$ -amylase.

The election of 575 nm as the measured wave length requires checking if the absorbance is representative, along the hydrolysis reaction, not only for the polymer which specifically absorbs at this  $\lambda$  but also for all of the remaining fractions, i.e. the absorbance at that  $\lambda$  is related to the area under the absorbance curve for a fixed wave length interval. To accomplish it, experiments at different conditions of pH, temperature, enzyme concentration and reaction times were assayed, and the absorbance was both measured at 575 nm and scanned. Wave length intervals of different sizes and centered at 575 nm were defined verifying that the absorbance at 575 nm is related to the area under the absorbance curve in these intervals. Therefore it is not necessary to scan the absorbance and estimate the areas to know the starch concentration at different reaction times. It will be sufficient to measure the absorbance at 575 nm. Regarding the conversion of the reaction, it was proved that the average conversion of the starch chains that absorbs in a wave length range would practically be equivalent to the conversion calculated at 575 nm and so, this one

represents not only the conversion of the polymer that specifically absorbs at that  $\lambda$  but also the average conversion of all of the remaining fractions with different degree of polymerization.

Once the suitability of the iodometric method was checked, the next step was to study the influence of the enzyme concentration, pH, temperature and substrate concentration upon the enzymatic hydrolysis reaction of soluble starch with  $\alpha$ -amylase.

In order to analyze the influence of enzyme concentration a series of experiments were made at 37 °C and pH = 6, at reaction times of 0, 10, 20 and 30 minutes, and different initial enzymes concentrations with an initial starch concentration of about 1 g/L. According to the definition of amylase activity, UA, given by Equation (4.6)

$$UA = \frac{(S_i - S)}{e_0 \cdot t_r} \quad \text{Eq. (4.6)}$$

it was observed that there was no systematic change of the activity for each initial enzyme concentration and it remained constant independently of initial enzyme concentration, therefore giving an average value of 1.88 UA for the enzyme assayed. This fact suggested that enzyme deactivation at pH = 6 and 37 °C was negligible. In such case the treatment intensity,  $y$ , is defined as the product of the initial enzyme concentration by reaction time,  $e_0 \cdot t_r$ . When the product conversion by initial starch concentration (i.e. the hydrolyzed starch concentration) was represented versus treatment intensity, all the experimental data reasonably fitted a straight line through the coordinate's origin, until conversion rates of approximately 0.8. The slope of this line determines the value of the last derivative on Equation (6.2)

$$\frac{r}{e_0} = \frac{S_i \cdot dx}{e_0 \cdot dt} = \frac{d(x \cdot S_i)}{dy} = f(x, S_i) \quad \text{Eq. (6.2)}$$

and therefore the quotient  $r/e_0$ , reaction rate divided by initial enzyme concentration, was  $1.90 \text{ g starch} / (\text{g enzyme} \cdot \text{min})$ .

The influence of the pH was studied in the range of 5 to 9. The reaction times were 0, 10, 20 and 30 minutes and the temperature was  $37^\circ\text{C}$ , with an initial starch concentration of about  $1 \text{ g/L}$ . The quotient reaction rate divided by initial enzyme concentration was represented versus pH. The values of  $r/e_0$  showed a maximum of  $18.2 \text{ min}^{-1}$  at pH 7.5, with meaningful reductions at lower pH,  $2.2 \text{ min}^{-1}$  at pH 7, and less intense decreases at higher pH,  $12.3 \text{ min}^{-1}$  at pH 9. Therefore the optimum pH would be 7.5. Furthermore the corresponding amylase activity to each treatment intensity was calculated as well for each pH value, verifying there were no meaningful variations and so an average value was estimated at each pH. The relative enzyme activity ( $\text{Activity}_{\text{average}}/\text{Activity}_{\text{maximum}} \cdot 100$ ) was plotted versus pH obtaining a similar trend to the established by the quotient  $r/e_0$ . From these results it is inferred that it is mandatory to have an efficient control of pH, especially to avoid any decrease in its value that would lead to intense reductions of the reaction rate.

To analyze the influence of the temperature and find out a possible thermal deactivation of the enzyme two series of experiments were made at  $65^\circ$  and  $75^\circ\text{C}$  with an initial starch concentration,  $S_i$ , of about  $1 \text{ g/L}$  at different initial enzyme concentrations and different reaction times. According to *Camacho Rubio et al. 1988*, if the results for each temperature are represented in a graph of  $x$  versus  $e_0 \cdot tr$ , the experimental points may fall along a single line, which would indicate either that deactivation did not occur ( $y = e_0 \cdot tr$ ) or that deactivation was a second-order reaction. On the other hand, different lines for each value of  $e_0$  might emerge, which would indicate a deactivation reaction with an order other than 2. For the two temperatures assayed,  $65^\circ$  and  $75^\circ\text{C}$ , it was seen that all the data fell along one curve and thus there was either no deactivation or it was a second-order reaction. To check whether any deactivation has taken place experiments can be made with pre-reaction waiting times at the reaction temperature, after which the results for one initial enzyme concentration and different pre-reaction times are compared. To this end experiments were carried out at the same pH and starch concentration, temperatures of 60, 65, 70 and  $75^\circ\text{C}$ , at different reaction times for different pre-reaction waiting times. For all

the temperatures assayed it was seen that different tendencies existed depending upon the waiting time, which indicated that deactivation did occur. According to the results of the experiments with no pre-reaction waiting time the order of this deactivation would seem to be around 2. To be able to calculate the deactivation constant,  $k_d$ , and check the order of the deactivation reaction it is necessary to reshape the proposed model from *Camacho Rubio et al. 1988* taking the waiting time into account in the equations. To check whether the deactivation is a second-order reaction and obtain the value of  $k_d$  for each temperature we started with Equation (6.15) and applied the univariant search method to optimize the parameters  $k_d$  and  $n$ ., taking the initial values  $n = 2$  (in fact we use  $n = 1.99999$  to avoid the indetermination which  $n = 2$  involves) and an estimated value of  $k_d$ .

$n \neq 1, n \neq 2$

$$y = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) \cdot k_d} \cdot \left\{ \left[ 1 - (1-n)e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t_p \right]^{\frac{2-n}{1-n}} - \left[ 1 - (1-n)e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot (t_r + t_p) \right]^{\frac{2-n}{1-n}} \right\}$$

**Eq. (6.15)**

It was deduced that  $n$  was practically equal to 2 and the optimization process was repeated but with this value fixed and  $k_d$  being variable, thus calculating treatment intensity with Equation (6.14)

$$n = 2 \quad y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left[ \frac{1 + k_d \cdot e_0 \cdot (t_r + t_p)}{1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_p} \right]$$

**Eq. (6.14)**

finally obtaining the values  $k_d$  at each temperature.

An Arrhenius-type fitting of the thermal-deactivation constant versus temperature was made, obtaining an activation energy of 172 kJ/mol and a pre-exponential factor  $2.01 \cdot 10^{28}$  L/(g·min).

Afterwards the influence of substrate concentration on the reaction rate was analyzed. Numerous studies have been made into the kinetics of starch hydrolysis

with  $\alpha$ -amylases. Most of the authors have fitted their kinetic data to the Michaelis-Menten equation. To calculate the parameters  $K_M$  and  $k$  of the equation it is usual to resort to the initial-reaction-rate method followed by Lineweaver-Burk linearization. This method facilitates the interpretation of the experimental results; nevertheless, the kinetic model obtained in this way is only valid for the initial moments of the reaction and may not be so at later times. To check the validity of the model to experiments over longer periods of time in the present Doctoral Thesis it was applied the integral method to the evaluation of  $K_M$  and  $k$  at different temperatures and fixed pH. Then assuming that kinetics follows Michaelis-Menten equation and the thermal deactivation kinetics of the enzyme being known, the Equation (6.20) sets out the proposed kinetic model for the hydrolysis

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) = \frac{1}{k} \cdot \left[ K_M \cdot \ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right) + S_i \cdot (x-x_0) \right] \quad \text{Eq. (6.20)}$$

which may be rewritten as

$$A = \frac{K_M}{k} \cdot B + \frac{1}{k} \quad \text{Eq. (6.21)}$$

$$A = \frac{1}{k_d \cdot S_i \cdot (x-x_0)} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) \quad \text{Eq. (6.22)}$$

$$B = \frac{\ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right)}{S_i \cdot (x-x_0)} \quad \text{Eq. (6.23)}$$

And thus, if we represent A versus B we should get a straight line, from the ordinate and slope of which we can obtain  $k$  and  $K_M$  respectively.

Experiments were carried out at 37, 55, 65 and 75 °C, at a pH of 7.5, with different initial concentrations of starch (moist weight),  $S_i$ , 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g/L

and different initial enzyme concentrations and reaction times. The resulting values for  $K_M$  and  $k$  at each temperature were fitted to the Arrhenius equation obtaining activation energies of 24.4 and 41.7 kJ/mol and pre-exponential factors of 735 g/L and  $1.74 \cdot 10^8 \text{ min}^{-1}$  for  $K_M$  and  $k$  respectively.

With the values of the activation energies and the pre-exponential factors deriving from the Arrhenius equation for the three kinetic parameters  $K_M$ ,  $k$  and  $k_d$  and using Equation (6.20) it can be seen whether the kinetic model fits the experimental results. To do this the conversion was represented versus the product of the initial enzyme concentration multiplied by reaction time,  $e_0 \cdot t_r$ . The proposed kinetic model verified to fit the experimental results reasonably well at the assayed temperatures, 37, 60, 65 and 75 °C, where conversion rates reached values as high as 0.95. Only in the case of 75°C at initial substrate concentrations of 0.88 g/L (dry weight) was there any significant deviation from the experimental results, when the conversion is higher than 0.3.

The enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants may be influenced by the interaction of the surfactant either with the enzyme or with the substrate of the reaction. Experiments at 37 °C and pH = 7.3 were made to study the influence of surfactants on the activity of the  $\alpha$ -amylase, using the Phadebas® tablets method. The manifest capacity of starch to bind surfactants made the iodometric method unsuitable to follow the enzymatic reaction, due to the surfactant competes with iodine to form complexes with the starch thus interfering on iodine-starch complex constitution (*Kim and Robinson 1979, Moulik and Gupta 1979*). As non-ionic surfactants alkyl polyglycosides, GlucoPON® 215 CS UP, GlucoPON® 600 CS UP y GlucoPON® 650 EC from Henkel-Cognis, fatty alcohol ethoxylates, Findet 10/15 and Findet 1214N/23 from Kao Corporation S.A, and nonyl phenol ethoxylate (with 9.5 moles of ethylene oxide) which commercial name is Findet 9Q/21.5NF (from Kao Corporation S.A), were assayed. In addition an anionic surfactant, LAS (linear alkyl benzene sulphonate) from Kao Corporation S.A, was assayed as well. The relative activity of the enzyme was measured at two different concentrations of surfactant for each them all. The majority of non-ionic surfactants assayed, except Findet 10/15, did not meaningfully decrease the enzymatic activity, according to the fact that there were no

electrostatic interactions which could unfold the enzyme as *Russell and Britton 2002* pointed out; in addition these authors stated that fatty alcohol ethoxylates stabilized proteases in the presence of anionic surfactants such as linear alkyl benzene sulphonates, thus preventing any enzymatic activity lost. Regarding alkyl polyglycosides, *von Rybinski and Hill 1998* affirmed that these surfactants act as stabilizers in liquid detergent formulations and so the experimental data obtained reflecting no activity drop were expected. LAS was known to decreased protease activity, as had been already commented; in addition, according to the experimental results obtained, it exhibited a meaningful lost of enzymatic activity in its presence likely produced by the electrostatic interactions inherent to its anionic nature. Findet 10/15, being a fatty alcohol ethoxylate and thus non ionic, was not expected to reduce the enzymatic activity, but experimental data showed the activity decreased with increasing concentration of the surfactant. Findet 10/15 has the lowest HLB value of all non-ionic surfactants assayed, being inferior to 10, namely the lipophilic groups rule over the hydrophilic ones in its structure, thus its higher hydrophobic character can determine a higher interaction with the enzyme and therefore a lost of enzymatic activity which was more significant as the surfactant concentration increases.

Another factor that may influence the cleaning of hard surfaces stained with starch as well as the enzymatic hydrolysis is the interaction between the surfactant and the starch itself. Surface tension measurements were done on solutions with different concentrations of surfactants in presence and absence of starch to quantify the possible interactions between starch and different non-ionic surfactants, alkyl polyglycosides (Glucopon® 215 CS UP, Glucopon® 600 CS UP y Glucopon® 650), fatty alcohol ethoxylates (Findet 10/15 and Findet 1214N/23) and nonyl phenol ethoxylate (Findet 9Q/21.5NF), and between starch and an anionic surfactant, LAS (linear alkyl benzene sulphonate). Surface tension measurements has been applied to study this kind of interactions between polymers and surfactants (*Jones 1967, Goddard 1986a, Goddard 1986b*). All non-ionic surfactants assayed formed complexes with starch, and therefore at the same surfactant concentration the surface tension increased in presence of starch compared with experiments in its absence. Comparing the three alkyl polyglycosides and bearing in mind that hydrophobic

interaction is the origin of the complex formation (*French and Murphy 1977, Hui and col. 1983, Goddard 1986a*), Glucopn 215, having higher HLB than Glucocon 600 and Glucocon 650 (both of them with very similar HLB), showed a lower capacity to be bound by starch. Regarding the fatty alcohol ethoxylates the results obtained were analogous and Findet 10/15, which HLB is smaller than that one of Findet 1214N/23, showed the biggest capacity to be bound by starch among the fatty alcohol ethoxylates. It is not possible to make comparisons between the different families of non-ionic surfactants based on HLB values because, apart from it, the capacity of starch to bind them depends as well on their structure and chemical composition. The surfactants can be sorted on ascendant order of binding capacity according to the results obtained: Findet 9Q/21.5NF < Glucocon 215 < Findet 1214N/23 < Glucocon 600 < Findet 10/15 < Glucocon 650.

It also has been checked that, for all non-ionic surfactant – starch systems, a straight proportional relationship between total and bound surfactant exists, so that the surfactant-starch complex formation continues until the minimum surface tension is reached without detection of starch saturation previous to surfactant micelles formation.

In the case of LAS, electrostatic interactions with the phosphate groups of potato amylopectin appeared due to its anionic nature and, being electric charges of the same sign, it can impede the complex formation (*Goddard 1986b*).

Glucocon 650 was assayed at two concentrations of starch, one 3-fold higher than the other. It was observed that the maximum quantity of bound surfactant was straight proportional to the amount of starch, which is in agreement with the statements of *Goddard 1986a*.

The change on binding capacity due to the presence of salts (*Goddard 1986a*) was also proved. Experiments with Findet 1214N/23, with and without phosphate buffer, showed that the maximum amount of bound surfactant increased in its presence. From the analysis of the Scatchard plots, according to *McGhee and von Hippel 1974*, that increase can be ascribed either to a raising of the cooperativity

parameter,  $w$ , or to a reduction in the number of glucose units,  $n_m$ , required to bind a molecule of surfactant by amylose.

Apart from complex formation, surface tension measurements also allowed to verify other facts related to the critical micelle concentration, cmc, of the assayed surfactants. The cmc in a homologous surfactant series decreases when the size of the alkyl chain increases. Experimental results were in good agreement with this statement. Findet 1214N/23 has a longer alkyl chain than Findet 10/15 and therefore its cmc was lower. Though, according to *Valea y Gozález 1990*, cmc increases with an increase in the number of moles of ethylene oxide in the surfactant and therefore Findet 10/15 should have shown a smaller cmc than Findet 1214N/23. Thus it was inferred that the size of alkyl chains had a bigger influence on the cmc than the number of moles of ethylene oxide. When the cmc of alkyl polyglycosides was analyzed according to the size of the alkyl chains analogous results were obtained. The cmc of Glucopon 600 was smaller than that one of Glucopon 650 and this one was smaller than the corresponding to Glucopon 215, being this sequence the same from higher to lower alkyl chain size. These results agreed with the statements of *von Rybinski and Hill 1998*. It was checked as well that the cmc of non-ionic surfactants were much smaller compared to that one of the anionic surfactant LAS (*Harris y Brown 1950*, *von Rybinski y Hill 1998*). Furthermore, the surface tension for LAS at higher concentrations than the cmc is bigger than that ones corresponding to Findet or Glucopon. Therefore lower doses of fatty alcohol ethoxylates or alkyl polyglycosides will achieve better wetting properties than higher doses of LAS, thus obtaining a better washing performance with those ones.

Due to the formation of surfactant-starch complexes, when these surfactants are going to be included in detergent formulations, apart from the surface tension that they give in solution it is important to consider two facts:

- Polymers may increase their solubility when they form complexes with surfactants (*Goddard 1986a*).

- For a fixed surfactant concentration, lower than the cmc, there is a reduction in surface activity when complexes are formed.

Therefore it is necessary to bear both facts in mind since an increase in starch solubility will make easier its removal and will hinder redeposition phenomena, although the decrease in surface activity will reduce the deterative yield of the surfactant. Thus it is inferred that a surfactant with good capacity to form complexes with starch will help to remove starchy soils from hard surfaces, though it will require a higher concentration of surfactant to reach the critical micelle concentration. In this way Glucopon 600 or Glucopon 650 could be selected, which in addition do not cause any significant influence on the activity of the  $\alpha$ -amylase, and then would be suitable for technical enzyme based liquid detergent formulations

From binding isotherms and Scatchard plots it was proved that fatty alcohol ethoxylates and alkyl polyglycosides are positive cooperatively bound by amylose and non-cooperatively bound to amylopectin. According to the binding isotherms of Findet 1214N/23 and Glucopon 600 it was inferred that when increasing fatty alcohol ethoxylates or alkyl polyglycosides concentrations in a starch solution, they firstly will be bound by amylose until its saturation and then they will be bound by amylopectin until the critical micelle concentration is reached. In agreement with the results obtained for the non-ionic surfactants assayed and with results published by several authors for other ligands it is inferred that the nonyl phenol ethoxylate will behave as those ones when binding to starch.

## CONCLUSIONS

The investigation developed along the present Doctoral Thesis allows to reach the following conclusions:

1. For starch hydrolysis with a commercial  $\alpha$ -amylase, from bacterial source (*Bacillus licheniformis*), and used in detergents formulations, the conversion, employing the iodometric analysis method, has been proved to be straight proportional to treatment intensity,  $y$ , product of initial enzyme concentration by reaction time, until conversion rates of approximately 0.8, thus enabling to determine the quotient reaction rate divided by initial enzyme concentration,  $r/e_0$ . The values of  $r/e_0$  at 37 °C show a maximum of 18.2 min<sup>-1</sup> at pH equals to 7.5, with meaningful reductions at lower pH, 2.2 min<sup>-1</sup> at a pH of 7, and less intense decreases at higher pH, 12.3 min<sup>-1</sup> at pH equals to 9. Therefore it is mandatory to have an efficient control of pH.
  
2. A new methodology has been developed to study the enzymes thermal deactivation, based on integral experiments, with a reaction time  $t_r$ , but keeping enzyme solutions at reaction temperature for different periods of time previous to the reaction,  $t_p$ , enabling to obtain the deactivation kinetics order,  $n$ , and the deactivation kinetics constant,  $k_d$ , even in the particular case of a second order deactivation.
  
3. The  $\alpha$ -amylase thermal deactivation has been determined to follow a second order kinetics for the assayed temperatures, 60, 65, 70 and 75 °C. Applying the univariant search optimization method, with an initial estimated values for  $n$  and  $k_d$ , their values have been calculated at the assayed temperatures, verifying a second deactivation order,  $n = 2$ , and therefore the treatment intensity is given by

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left[ \frac{1 + k_d \cdot e_0 \cdot (t_r + t_p)}{1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_p} \right]$$

The deactivation constant values,  $k_d$ , versus temperature fit to an Arrhenius-type equation, obtaining an activation energy of 172 kJ/mol and a pre-exponential factor of  $2.01 \cdot 10^{28}$  L/(g·min).

4. The integral method has been used to analyze the influence of starch concentration at the different experimental temperatures assayed. Assuming that kinetics fulfills Michaelis-Menten equation and the thermal deactivation kinetic of the enzyme being known, the proposed kinetic model for the hydrolysis is as follows:

$$y = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_r) = \frac{1}{k} \cdot \left[ K_M \cdot \ln\left(\frac{1-x_0}{1-x}\right) + S_i \cdot (x - x_0) \right]$$

The resulting values for  $K_M$  and  $k$  at each temperature fit to the Arrhenius equation, obtaining activation energies of 24.4 and 41.7 kJ/mol and pre-exponential factors of 735 g/L and  $1.74 \cdot 10^8 \text{ min}^{-1}$  for  $K_M$  and  $k$  respectively.

5. With the values of the activation energies and the pre-exponential factors deriving from the Arrhenius equation for the three kinetic parameters  $K_M$ ,  $k$  and  $k_d$  the proposed kinetic model has been verified to fit the experimental results reasonably well at the assayed temperatures, 37, 60, 65 and 75 °C, where conversion rates reach values as high as 0.95. Only in the case of 75°C at an initial substrate average concentration of 0.88 g/L (dry weight) is there any significant deviation from the experimental results, when the conversion is higher than 0.3.
6. The formation of complexes between surfactants and starch makes the iodometric method unsuitable to follow the enzymatic hydrolysis reaction, having used the Phadebas® tablets method to determine the influence of surfactants on enzymatic activity.

In general, the enzymatic activity is not significantly affected by the non-ionic surfactants assayed: the alkyl polyglycosides GlucoPON® 215,

Glucopon® 600 and Glucopon® 650, the fatty alcohol ethoxylate Findet 1214N/23 and the nonyl phenol ethoxylate Findet 9Q/21.5NF; only the fatty alcohol ethoxylate Findet 10/15, which is the surfactant with higher hydrophobic character, determines a lost of enzymatic activity which is more significant as the surfactant concentration increases.

The linear alkyl benzene sulphonate, LAS, also determines an important lost of enzymatic activity due to the electrostatic interactions caused by its anionic nature

7. All non-ionic surfactants assayed, alkyl polyglycosides, fatty alcohol ethoxylates and nonyl phenol ethoxylate, form complexes with starch, and therefore at the same surfactant concentration the surface tension increases in presence of starch compared with experiments in its absence. The surfactants can be sorted on ascendant order of binding capacity according to the results obtained: Findet 9Q/21.5NF < Glucopon 215 < Glucopon 600 < Findet 1214N/23 < Findet 10/15 < Glucopon 650.

The hydrophobic interaction is the origin of the complex formation, thus for a family of surfactants the capacity to be bound by starch increases as the HLB decreases. In addition through the experiments carried out with the highest binding capacity surfactant, Glucopon 650, the amount of bound surfactant has been checked to be straight proportional to the amount of starch present in the solution.

8. The presence of salts (phosphate buffer) in experiments with Findet 1214N/23 causes a critical micelle concentration decrease, either in presence or absence of starch, increasing the maximum amount of bound surfactant. The increase can be ascribed either to a rising of the cooperativity parameter,  $w$ , or to a reduction in the number of glucose units,  $n_m$ , required to bind a molecule of surfactant by amylose.

In the case of LAS, due to its anionic nature, electrostatic interactions with the phosphate groups of potato amylopectin appear and, being electric charges of the same sign, it can impede the complex formation and even causes a reduction in surface tension for a fixed surfactant concentration in comparison to surface tension values in starch absence, which can be ascribed to a saline effect of the amylopectin phosphate groups.

9. Fatty alcohol ethoxylates and alkyl polyglycosides are positive cooperatively bound by amylose and non-cooperatively bound, Langmuir-type binding, to amylopectin. When fatty alcohol ethoxylates or alkyl polyglycosides concentrations increase in a starch solution, they firstly are bound by amylose until its saturation and thereafter they are bound by amylopectin until the critical micelle concentration is reached.

It also has been checked that, for these systems, a straight proportional relationship between total and bound surfactant exists, so that the surfactant-starch complex formation continues until the minimum surface tension is reached without detection of starch saturation previous to surfactant micelles formation.

10. The cmc has been verified to decrease when in a homologous surfactant series the size of the alkyl chain increases. Both, the critical micelle concentrations and their corresponding surface tensions for the non-ionic surfactants assayed, are much smaller compared to that ones of the anionic surfactant LAS. Therefore lower doses of fatty alcohol ethoxylates or alkyl polyglycosides will achieve better wetting properties than higher doses of LAS and a better washing performance is expected.

Moreover, a surfactant with good capacity to form complexes with starch will help to remove starchy soils from hard surfaces and hinder starch redeposition phenomena, although the decrease in surface activity will reduce the

surfactant deterative efficiency, requiring a higher concentration of surfactant to reach the critical micelle concentration surface tension.

Bearing in mind all the preceding factors and considering the hydrolytic  $\alpha$ -amylase activity not to be significantly influenced, the surfactants Glucocon 600 and Glucocon 650 would be suitable for technical enzyme based liquid detergent formulations