

Ex. 300627



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

ESCUELA DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**APLICACION DE ENZIMAS EN DETERGENTES**

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A  
**ADRIANA GUERRERO BARAJAS**

DIRECTOR DE TESIS :  
M. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Al maestro José Domingo Méndez,  
por haber aceptado dirigir el presente  
trabajo, por su enorme colaboración  
y ayuda, muchísimas Gracias.

# I N D I C E

| CAPITULO   | PAG. |
|--|------|
| INDICE DE TABLAS   |      |
| INDICE DE FIGURAS  |      |
| OBJETIVO   | 1    |
| I . INTRODUCCION   | 2    |
| II . GENERALIDADES   | 5    |
| III. DETERGENTES   | 10   |
| III.1 DEFINICION   | 10   |
| III.2 CLASIFICACION  | 11   |
| III.3 CONSTITUYENTES   | 14   |
| III.4 FORMAS FISICAS   | 25   |
| III.5 MODO DE ACCION   | 27   |
| III.6 APLICACIONES   | 30   |
| III.7 DETERGENTES ENZIMATICOS                                | 44   |
| IV . ENZIMAS CON ACTIVIDAD DETERGENTE                        | 45   |
| IV.1 INTRODUCCION  | 45   |
| IV.2 ENZIMAS DETERGENTES                                     | 49   |
| IV.3 PRODUCCION DE ENZIMAS PROTEOLITICAS<br>PARA DETERGENTES | 80   |
| IV.4 FORMAS FISICAS DE ENZIMAS DETERGENTES                   | 111  |
| IV.5 REGULACION Y FACTORES DE SEGURIDAD                      | 120  |

| <b>CAPITULO</b>   | <b>PAG.</b> |
|---|-------------|
| IV. 6 ESPECIFICACIONES PARA DETERGENTES<br>ENZIMATICOS                      | 123         |
| IV. 7 APLICACIONES DE DETERGENTES ENZIMATICOS                               | 124         |
| IV. 8 METODOS ANALITICOS Y DE PRUEBA PARA EVA-<br>LUAR EFICIENCIA DE LAVADO | 128         |
| V . FORMULACIONES DE DETERGENTES ENZIMATICOS                                | 130         |
| VI . FUTURO DE LOS DETERGENTES ENZIMATICOS                                  | 147         |
| VII. CONCLUSIONES   | 150         |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS  | 153         |

## INDICE DE TABLAS

| NO. | DE TABLA | TITULO  | PAG. |
|-----|----------|---|------|
| 1   |          | VENTAS DE ENZIMAS DISTRIBUIDAS<br>EN LAS DIFERENTES INDUSTRIAS.....   | 2    |
| 2   |          | VENTAS DE ENZIMAS EN ESTADOS<br>UNIDOS .....  | 3    |
| 3   |          | AGENTES TENSOACTIVOS COMERCIALES.....   | 17   |
| 4   |          | COMPARACION DE PROPIEDADES DE<br>SUPERFICIE ACTIVA .....  | 40   |
| 5   |          | PROPIEDADES DE PROTEASAS<br>ALCALINAS Y NEUTRAS .....   | 51   |
| 6   |          | ESTABILIDAD ENZIMATICA EN<br>PRESENCIA DE 0.1% DE PERBORATO<br>DE SODIO .....   | 52   |
| 7   |          | ESTABILIDAD DE ENZIMAS PROTEOLITICAS<br>ALCALINAS EN PRESENCIA DE IONES CALCIO<br>Y TIPOLIFOSFATO DE SODIO (STP)..... | 53   |
| 8   |          | ESTABILIDAD DE ENZIMAS PROTEOLITICAS<br>ALCALINAS EN PRESENCIA DE NTA .....   | 55   |
| 9   |          | TEMPERATURAS DE LAVADO EN EUROPA<br>OCCIDENTAL .....  | 63   |
| 10  |          | TEMPERATURAS DE LAVADO EN ESTADOS<br>UNIDOS .....   | 63   |

| NO. | DE TABLA | TITULO   | PAG. |
|-----|----------|--|------|
| 11  |          | LEGISLACION DE FOSFATOS EN<br>EUROPA OCCIDENTAL .....  | 84   |
| 12  |          | MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCION<br>COMERCIAL DE PROTEASAS .....   | 81   |
| 13  |          | FUENTES DE PROTEINA PARA LA<br>PRODUCCION DE PROTEASAS .....   | 87   |
| 14  |          | COMPARACION DE LAS PROTEASAS<br>PRODUCIDAS POR DIFERENTES CEPAS DE<br><i>Bacillus subtilis</i> .....                                       | 101  |
| 15  |          | RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES<br>CON <i>Bacillus alcalophilus</i> .....   | 109  |
| 16  |          | DISTRIBUCION DE PARAMETROS DE<br>ENCAPSULADOS P, CX Y F .....  | 115  |
| 17  |          | ESTABILIDAD DE ALMACENAJE DE<br>MAXATASA P EN DETERGENTES EN POLVO<br>(37°C ; 6 MESES) .....   | 118  |
| 18  |          | ESTABILIDAD DE ALMACENAJE DE MAXACAL<br>EN UN DETERGENTE LIQUIDO DE SERVICIO<br>PESADO A 50°C. INFLUENCIA DE LA<br>ACTIVIDAD DE AGUA ..... | 119  |
| 19  |          | RESULTADOS DE LA APLICACION DE LA<br>FORMULA DETERGENTE EN DIFERENTES<br>MANCHAS .....   | 134  |

| NO. DE TABLA | TITULO  | PAG. |
|--------------|---|------|
| 20           | COMPOSICION QUIMICA DEL DETERGENTE<br>LIQUIDO DE LAVANDERIA .....     | 139  |
| 21           | TONELAJE DE CONSUMO DE DETERGENTES<br>EN LATINOAMERICA ( 1985 ) ..... | 149  |



## INDICE DE FIGURAS

| NO. DE FIGURA | TITULO  | PAG. |
|---------------|---|------|
| 1             | DESARROLLO DEL MERCADO DE DETERGENTES ENZIMATICOS DE SERVICIO PESADO EN ESTADOS UNIDOS Y EN EUROPA COMO % DEL MERCADO TOTAL ..... | 7    |
| 2             | COMPARACION DE LA HABILIDAD SEQUESTRANTE DE CALCIO DE STP Y NTA ..  | 54   |
| 3             | ACTIVIDAD DE ALCALASA A DIFERENTES TEMPERATURAS .....   | 55   |
| 4             | ACTIVIDAD DE ALCALASA A DIFERENTES VALORES DE pH .....  | 56   |
| 5             | ACTIVIDAD DE ESPEARASA 4M A DIFERENTES TEMPERATURAS .....   | 57   |
| 6             | ACTIVIDAD DE ESPEARASA A DIFERENTES VALORES DE pH .....   | 58   |
| 7             | PERFIL DE pH DE LA PROTEASA ALCALINA MAXATASA .....   | 69   |
| 8             | PERFIL DE pH DE LA PROTEASA ALTAMENTE ALCALINA MAXACAL .....  | 69   |
| 9             | PERFILES DE pH DE MAXATASA Y MAXACAL BAJO CONDICIONES DE LAVADO .....   | 70   |

| NO. | DE FIGURA | TITULO  | PAG. |
|-----|-----------|---|------|
| 10  |           | PERFILES DE TEMPERATURA DE MAXATASA<br>Y MAXACAL .....  | 71   |
| 11  |           | MAXATASA: EFECTO DE LAS CONDICIONES<br>DE LAVADO SOBRE LOS RESULTADOS .....                     | 72   |
| 12  |           | MAXATASA: PRE-REMOJO VS. LAVADO CON<br>AGUA FRIA/CALIENTE EN ESTADOS UNIDOS .                   | 73   |
| 13  |           | MAXATASA: INFLUENCIA DE FOSFATOS<br>SOBRE LOS RESULTADOS DE LAVADO .....                        | 74   |
| 14  |           | EFECTOS DE MAXATASA/MAXACAL SOBRE<br>LOS RESULTADOS DE LAVADO .....                             | 75   |
| 15  |           | RESULTADOS DE LA ADICION DE MAXATASA<br>A UN DETERGENTE LIQUIDO DE SERVICIO<br>PESADO .....     | 76   |
| 16  |           | RESULTADOS DE LA ADICION DE MAXACAL<br>A UN DETERGENTE LIQUIDO. EFECTO DE<br>PRE-MANCHADO ..... | 77   |
| 17  |           | ACTIVIDAD DE TERMAMYL A DIFERENTES<br>TEMPERATURAS Y EN PRESENCIA DE STP ...                    | 78   |
| 18  |           | ACTIVIDAD DE TERMAMYL A DIFERENTES<br>VALORES DE pH Y EN PRESENCIA DE STP ..                    | 78   |
| 19  |           | PROCESO PARA FERMENTACION SUMERGIDA ..  | 84   |
| 20  |           | PRODUCCION DE PROTEASA POR 4 CEPAS<br>DIFERENTES DE <i>Bacillus subtilis</i> .....              | 97   |

| NO. | DE FIGURA | TITULO   | PAG. |
|-----|-----------|--|------|
| 21  |           | ACTIVIDAD DE PROTEASA EN FUNCION<br>DEL pH .....   | 98   |
| 22  |           | PREPARACION DE ENZIMA LIBRE DE<br>POLVO .....  | 113  |
| 23  |           | ESTABILIDAD DE ALMACENAJE DE MAXACAL<br>EN UN DETERGENTE LIQUIDO DE SERVICIO<br>PESADO EN FUNCION DEL CONTENIDO DE<br>CALCIO ..... | 120  |
| 24  |           | EFECTO DE LA ENZIMA EN FORMULACIONES<br>CON CANTIDADES REDUCIDAS DE FOSFATO .  | 127  |
| 25  |           | EQUIPO TIPICO PARA EL MEZCLADO<br>INDUSTRIAL DE DETERGENTES .....  | 131  |
| 26  |           | DETERGENTES ANIONICOS Y NO IONICOS ..  | 137  |
| 27  |           | AGENTE BLANQUEADOR FLUORESCENTE .....  | 138  |

## **O B J E T I V O**

El objetivo de este trabajo es analizar el uso de las enzimas en los detergentes, un aspecto interesante y novedoso de la enzimología, ya que los detergentes se han venido reformando ampliamente en sus formulaciones, a la vez que se han introducido nuevas enzimas para mejorar el lavado en todos sus aspectos, con la consecuente reducción en el tiempo para desmanchar, lo que implica menor trabajo mecánico, menor costo y mayor eficiencia en general.

## I. INTRODUCCIÓN

Muchas de las aplicaciones industriales, médicas y analíticas de las enzimas se conocen desde hace más de diez años, periodo en el que la tecnología enzimática ha avanzado considerablemente.

Este avance ha sido estimulado en parte por la necesidad tecnológica de perfeccionamiento y el descubrimiento de nuevos conocimientos sobre aspectos de seguridad de los productos químicos y sus procesos, dando como resultado mejores preparaciones comerciales y un incremento en su comercialización (1).

En la actualidad se calcula que tan solo en Estados Unidos se producen arriba de 10 millones de libras de enzimas que son utilizadas en polvos de lavado (2).

En la tabla 1 se muestra la distribución de las ventas de enzimas en las aplicaciones industriales más importantes.

TABLA 1. Ventas de enzimas distribuidas en las diferentes industrias.

|                     |     |
|---------------------|-----|
| Detergentes         | 35% |
| Almidón             | 30% |
| Fruta, Vino         | 10% |
| Lechería            | 5%  |
| Destilería          | 5%  |
| Molienda, Panadería | 5%  |
| Cervecería          | 4%  |
| Otras               | 8%  |

(1)

En esta tabla se puede observar que existen dos usos principales de las enzimas, el primero es en la hidrólisis de almidón con isomerización de glucosa y el segundo en la industria de los detergentes.

En la tabla 2 se presenta una estimación global de las ventas de diferentes tipos de enzimas.

TABLA 2. Ventas de enzimas en Estados Unidos.

| Tipos de enzimas     | %  |
|----------------------|----|
| Proteasa de Bacillus | 35 |
| Amiloglucosidasa     | 14 |
| Glucosa isomerasa    | 14 |
| Amilasa de Bacillus  | 10 |
| Pectinasa            | 10 |
| Renina microbiana    | 5  |
| Amilasa fúngica      | 4  |
| Proteasa fúngica     | 4  |
| Otras                | 4  |

(1)

Las proteasas constituyen un tipo de enzimas muy importante desde el punto de vista industrial.

La proteasa de Bacillus está considerada como la más importante. Aunque son fabricadas numerosas clases de proteasas de Bacillus, la Subtilisina Carlsberg es todavía la enzima predominante. Esta es producida por *Bacillus licheniformis*, y es utilizada casi exclusivamente como aditivo en detergentes (1).

A lo largo de la historia, los detergentes han sido utilizados, tanto en la industria, como a nivel doméstico y comercial.

A través del tiempo han surgido nuevas presentaciones de detergentes e innovaciones en sus formulaciones.

Para mejorar su eficiencia en el tratamiento de manchas de origen bioquímico, o con elevado contenido protéico, se han introducido, ya desde hace varios años enzimas en sus formulaciones.

## II. GENERALIDADES

### Detergencia y detergentes.

La detergencia es definida como la capacidad para limpiar, este término comprende, por lo general, limpiar las superficies de un objeto sólido por medio de un baño líquido.

Este efecto de limpieza intensificado por un baño líquido es causado principalmente por un agente especial: el detergente. Este actúa alterando los efectos interfasales en los diversos límites de fase del sistema.

Un sistema típico de detergencia consta de los elementos siguientes: 1) un objeto sólido que hay que limpiar llamado el "sustrato". 2) "suciedad" unida al sustrato, que se ha de eliminar en el lavado. 3) un "baño" líquido que se aplica al sustrato sucio (3).

El término detergente se emplea para designar agentes limpiadores o composiciones limpiadoras que manifiestan su actividad en solución. Un detergente es un producto formulado y a menudo compuesto que contiene además de un surfactante, materiales tales como: agentes controladores de espuma, suspendedores de manchas o agentes de antirredeposición, agentes de anticorrosión, blanqueadores químicos, blanqueadores ópticos o agentes azuladores, suavizantes, agentes antibacterianos, enzimas, perfumes y otros (4).

Un detergente, es la sustancia que deterge, o sea que limpia un objeto sin producir abrasión ni corrosión (3).



### Enzimas detergentes.

La historia de los detergentes enzimáticos data de 1913, cuando el químico alemán Otto Röhm, obtuvo una patente para un producto de pre-remojo, el cual contenía enzimas provenientes de glándulas pancreáticas animales (3).

El producto se llamó "Burnus". Este producto consistía principalmente de carbonato de sodio al que se adicionó un extracto crudo de páncreas (pancreatina). El contenido de enzima era muy bajo y además, la enzima no fue muy activa en valores de pH elevados proporcionados por la sosa presente (5).

Años más tarde, durante la Segunda Guerra Mundial, los agentes de lavado enzimáticos alcanzaron importancia a causa de la severa carestía de grasas y jabón. En Suiza el interés científico durante los años cuarentas fue aumentando gracias a los reportes que aseguraban que las enzimas podrían ser usadas para reducir el consumo de jabón. En los años cuarenta se produjo una gran demanda de glándulas pancreáticas para su uso en productos de lavandería.

La inestabilidad relativa de enzimas pancreáticas en presencia de ingredientes de lavado condujo a los científicos a concluir que una enzima derivada de una fermentación bacteriana podría ofrecer ventajas sobre la tripsina pancreática (6).

Un nuevo desarrollo comenzó en 1939 cuando el primer detergente que contenía un proteínasa bacteriana "Bio-40" fue lanzado por la Swiss Company Gebrüder Schnyder (5).

Esta enzima era una proteasa bacteriana neutra que representó un perfeccionamiento sobre las tripsinas, pero que aún no tenía estabilidad en el rango de pH de 9 a 10 (6).

Sin embargo, el verdadero gran descubrimiento vino algunos años más tarde cuando la proteínasa alcalina, llamada comercialmente Alcalasa, fue desarrollada por Novo Industri en Dinamarca (5).

Esta fue la primera enzima proteolítica alcalina estable proveniente del microorganismo *Bacillus licheniformis*, un microorganismo común del suelo, relacionado morfológicamente con *Bacillus subtilis* (6).

La Alcalasa fue incorporada dentro de "Bio-40" y poco tiempo después dentro de "Bio-Tex" fabricado por la Dutch firm Kortman & Schulte en colaboración con Gebrüder Schnyder (5).

Las enzimas detergentes mejoraron progresivamente en Europa durante todo el final de los años sesentas. Desde un punto de vista tecnológico, las enzimas fueron para los años sesentas lo que fueron los abrillantadores ópticos para los años cincuentas en la industria del lavado en Europa (6).

La siguiente figura representa el mejoramiento progresivo de las enzimas detergentes en Europa durante finales de los sesentas y principios de los setentas.

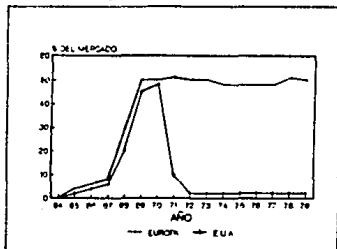


Fig.1 Desarrollo del mercado de Detergentes enzimáticos de servicio pesado en Estados Unidos y en Europa como % del mercado total.

(6)

Una contrariedad temporal ocurrió en los inicios de los setentas cuando se desarrollaron alergias en los trabajadores de la industria de detergentes, pero tales problemas se superaron por la introducción de preparaciones enzimáticas libres de polvo (5).

Después de más de veinte años el original descubrimiento de la Alcalasa y sus homólogos, este producto continúa gozando de una amplia aceptación por todo el mundo y sirve como referencia en la investigación y evaluación de nuevas enzimas detergentes para tratar manchas relacionadas con proteínas (6). Hoy los detergentes enzimáticos tienen gran importancia comercial y alcanzan de 30 a 60% de mercado en países industrializados (5).

Para perfeccionar la eficiencia de lavado han sido aisladas nuevas proteasas provenientes de un especie de *Bacillus alcalofílico*. Esta bacteria es capaz de crecer a pH entre 10 y 12. Las enzimas son superiores en aplicabilidad a la proteasa de *Bacillus licheniformis* en muchas formulaciones de detergentes, especialmente cuando el agente tradicional, tripolifosfato de sodio, es sustituido por otros agentes tales como el citrato (1).

Muchas enzimas para detergentes comerciales son proteasas alcalinas bacterianas del tipo de serina (llamadas así porque contienen un residuo de serina en su sitio activo) y son producidas por la bacteria *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis* (7).

Para la eliminación de manchas consistentes en almidón ha sido ya demostrada la contribución de  $\alpha$ -amilasa bacteriana en la detergencia de los detergentes de lavandería (8).

Actualmente las enzimas amilolíticas están ya en uso en porcentaje relativamente bajo del mercado de detergentes (8).

Las proteasas y la  $\alpha$ -amilasa se mezclan generalmente con la base seca del detergente. Por lo general se agregan al detergente seco en el último paso antes del empaquetado (7).

El uso de lipasas en detergentes tiene grandes posibilidades. Sin embargo, las lipasas más conocidas son demasiado inestables en formulaciones de detergentes y jabonaduras (8).

### III. DETERGENTES

#### III.1 Definición.

El término detergente se emplea para designar agentes limpiadores o composiciones limpiadoras que manifiestan su actividad en solución. Esta definición comprende un campo menos amplio que el comprendido por la definición que dice: "detergente es cualquier cosa que limpia" pero abarca un campo más extenso que el de los jabones y el de las sustancias sintéticas que obran por su actividad de superficie. Estas se llaman agentes de superficie activa, agentes tensoactivos o surfactantes.

El término detergencia comprende, por lo general, limpiar las superficies de un objeto sólido por medio de un baño líquido causado principalmente por el detergente.

El sustrato, que es un objeto sólido que hay que limpiar, puede variar casi sin limitación en lo que respecta a la configuración. Puede ser liso y plano, como un vidrio o un muro, o presentar una superficie muy compleja como un tejido.

El término detergencia es empleado para indicar el poder o efecto limpiador, según se refiera al detergente o al sustrato. Así, con la expresión detergencia del laurilsulfato sódico sobre el algodón se denota el efecto limpiador que tiene la solución del laurilsulfato sódico sobre el algodón sucio (3).

Los detergentes pueden contener como componente principal jabón, sustancias tensoactivas sintéticas y/o preparados enzimáticos (estos degradan químicamente las grasas almidones y proteínas). El jabón que antes era el único detergente empleado, forma con los agentes de dureza del agua, jabón calcáreo insoluble que se deposita sobre las fibras y provoca un consumo innecesario del producto.

Por esta razón, los detergentes de base jabonosa contienen con frecuencia secuestrantes (p.ej. carbonato sódico o fosfatos), blanqueadores químicos (p.ej. perborato sódico) y otros aditivos. Los detergentes sintéticos contienen aparte de sustancias tensoactivas ( que forman aproximadamente del 30 al 50% del total en los detergentes para ropa común), polifosfatos que aumentan la eficacia del lavado ( en los detergentes para lencería fina hasta un 20%, en los detergentes para ropa común de 10 a 40%, ésteres de celulosa (Tylose), que acrecentan el poder de antirredeposición del baño de lavado, silicatos solubles (en los detergentes para ropa común), blanqueadores químicos, blanqueadores ópticos, sulfato sódico que facilita la disolución del detergente, y en caso necesario otros aditivos (4).

### III.2 Clasificación.

Los detergentes pueden clasificarse según:

- su composición química: jabonosos, sintéticos, alcalinos, etc.
- su estado físico: líquido, polvo, barras, pastas y otras formas no líquidas.
- su aplicación.

La forma más práctica y usada de clasificación se basa en el sustrato o en el sistema sustrato-sustrato para cuya limpieza es preparado el detergente. Según este criterio, se distinguen detergentes para limpiar productos textiles y materias fibrosas; detergentes para limpiar superficies duras, como metales, objetos de cerámica, plásticos, etc.; detergentes para la piel y pelo humanos, o sea, detergentes cosméticos; detergentes para el lavado doméstico; detergentes sanitarios.

La inmensa mayoría de los detergentes pertenecen al grupo de las sustancias tensoactivas. de las cuales los jabones son los representantes más antiguos y más conocidos.

Estos agentes, se caracterizan tecnológicamente por la capacidad de sus soluciones para producir humectación, dispersión, penetración, emulsificación y detergencia, y en determinadas condiciones para solubilizar sustancias normalmente insolubles.

Los componentes básicos de los detergentes son compuestos orgánicos con propiedades tensoactivas en solución acuosa (3).

Los compuestos tensoactivos más empleados en la fabricación de detergentes son los sulfonatos de alquilbenceno de sodio (ABS), los sulfonatos de alquiltolueno (ATS) y sus mezclas, cuyas estructuras químicas ramificadas son muy estables y no se degradan o lo hacen muy lentamente (115).

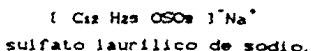
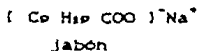
#### Detergentes sintéticos.

Los agentes tensoactivos o detergentes sintéticos que han venido a sustituir con ventaja en muchas aplicaciones al jabón, actúan de la misma forma que éste, ya que el jabón no puede ser empleado en medio ácido, ni en aguas demasiado duras, es decir, muy cargadas de sales de calcio y de magnesio, que, al formar jabones insolubles, no dan espuma hasta que todo el calcio y magnesio han sido precipitados.

Químicamente estos detergentes se pueden dividir en 3 grupos:

Los aniónicos, en los cuales la parte de la molécula cargada negativamente es la detergente, es decir, que ionizan con la propiedad del detergente residente en

los aniones. El jabón, por ejemplo, es un detergente aniónico, como lo son los ésteres sulfúricos y los ácidos alquil aromáticos sulfúricos.



Los catiónicos, en los cuales la parte detergente es la que lleva la carga positiva, es decir, que ionizan con la propiedad del detergente que reside en el catión, como las sales de amina, los compuestos de amonio cuaternario y otras bases nitrogenadas.

Los detergentes catiónicos son más germicidas que los detergentes aniónicos.



cloruro de cetilpiridinio.

Los no iónicos, es decir, que no ionizan. Son los más modernos, como los obtenidos esterificando parcialmente los productos de condensación de la glicerina (118).

La molécula de la mayoría de los agentes tensoactivos es altamente asimétrica en sus propiedades de solubilidad y en su valencia residual o su polaridad. Una porción de molécula consta por lo general de un resto hidrocarbonado relativamente grande, de naturaleza alifática o alquil aromática; esto es lo que se llama generalmente el grupo hidrofobo ( u oleófilo). Otra porción de la molécula es soluble en el agua y posee una polaridad relativamente grande; este es el grupo hidrófilo o



solubilizador. Por lo general tiene una estructura ionogénica, pero en algunos casos puede ser no ionogénica. Son grupos solubilizadores típicos los siguientes:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OSO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NR}_2\text{Y}$ ,  $-(\text{C}_6\text{H}_4\text{O})_n$ .

La estructura más sencilla, y una de las que se encuentran con más frecuencia de un agente tensactivo consiste en una molécula lineal, uno de cuyos extremos es una cadena recta de un hidrocarburo alifático saturado, con unos 16 átomos de carbono, y el otro extremo es un grupo solubilizador. Son ejemplos de estas estructuras el palmitato de sodio y el ácido 1-hexadecanosulfónico (3).

### III.3 Constituyentes de los detergentes.

Los detergentes se formulan para que actúen en las condiciones del lavado y para que llenen las exigencias del sustrato por lavarse. Algunos detergentes, por ejemplo, el jabón de tocador, están formados por un solo componente.

Las numerosas sustancias que se usan en las fórmulas de los detergentes pueden dividirse en los siguientes grupos:

1.- surfactantes, grupo que comprende los jabones y sustancias sintéticas de superficie activa.

2.- sales, ácidos y bases inorgánicas, estos componentes se llaman coadyuvantes si contribuyen significativamente a la obtención de la detergencia de la mezcla. Si no contribuyen, se llaman "diluyentes" o "rellenos".

3.- reforzadores orgánicos, vigorizadores o aditivos que aumentan la detergencia, el poder espumante, el poder emulsivo o el efecto dispersor de la composición sobre las partículas de suciedad.

4.- aditivos para fines especiales, como sustancias de blanqueo, sustancias que dan brillo, bactericidas, emolientes, sustancias que modifican o mejoran la forma física o la estabilidad del detergente, etc.(3).

#### 1. Surfactantes.

Surfactante es la palabra utilizada para describir toda clase de agentes de superficie activa incluyendo agentes de remojo, agentes emulsificantes y detergentes. Estos son los componentes básicos o activos de un detergente formulado y funcionan mediante la disminución de la tensión superficial e interfazal, haciendo así más fácil el remojo.

Han sido también asignadas otras funciones al componente activo, tales como el incremento de los potenciales z negativos de la suciedad y los tejidos, convirtiendo la superficie sucia de carácter hidrofóbico a carácter hidrofílico, y el remover y dispersar la grasa a gotitas estabilizadas y suspendidas para prevenir la redeposición de la suciedad (28,90).

Los agentes tensoactivos o agentes de actividad superficial en solución acuosa diluida mojan fácilmente las superficies, eliminan la suciedad, penetran en los materiales porosos, dispersan las partículas sólidas, emulsifican aceites y grasas y producen espuma al ser agitadas o sacudidas.

Debido a las propiedades de sus soluciones, los agentes tensoactivos se describen también como humectantes, detergentes, penetrantes, dispersantes, emulsivos, etc.

Tales propiedades se hallan relacionadas entre sí, y no se conoce ningún agente tensoactivo que posea una de ellas con exclusión de todas las demás. En casi todos los

agentes tensoactivos predomina una propiedad sobre las otras, y esa propiedad determina la calificación del compuesto y su campo de aplicación.

Sustancias con esas propiedades tensoactivas son: el jabón y los aceites sulfonados. Algunas sustancias naturales tienen acción similar; por ejemplo: las saponinas, de origen vegetal, y la bentonita.

Los tipos de surfactantes más usados como ingredientes limpiadores primarios en las preparaciones de detergentes son: 1) jabones de ácidos grasos, de ácidos de la colofonia y del aceite de pino (aceite de resina); 2) alquilarenosulfonatos; 3) sulfatos alquílicos, entre los que hay surfactantes hidrófobos de cadena recta y también los grupos con sulfato primario y sulfato secundario; 4) sulfatos y sulfonatos que tienen un enlace entre los grupos hidrófobo e hidrófilo como los metilaruros acilados de ácidos grasos y los monoglicéridos grasos sulfatados; 5) ésteres ácidos de cadena larga derivadas del polietilenglicol; 6) éteres de glicoles polietilénicos y alquilfenoles; 7) éteres de glicoles polietilénicos y alcoholes o mercaptanos de cadena larga; 8) dietanolamidas de ácidos grasos; 9) surfactantes del tipo pluronic. Todos estos tipos pertenecen a la serie no iónica o aniónica. Los surfactantes catiónicos se usan frecuentemente en la preparación de detergentes, pero no pueden considerarse como los ingredientes limpiadores principales. Se incorporan en el detergente con fines especiales; por ejemplo para uso sanitario o para suavizar telas (3).

En la tabla 3 se da una lista seleccionada de agentes comerciales de actividad superficial. Debe insistirse en que la última columna de la tabla es selectiva, es decir, un agente dado tiene, frecuentemente, más usos de los que se especifican en la tabla.

TABLA 3. Agentes tensoactivos comerciales

| Nombre comercial    | Nombre químico o fórmula   | Clase | Usos<br>ppales. |
|---------------------|--|-------|-----------------|
| Avitex SF           | Cetilsulfato de sodio  | A     | Abi             |
| Brij 35             | Eter laurílico de polietilenglicol                                   | N     | E, H            |
| BTC 100             | Cloruro de alquilbencil dimetilamonio                                | C     | G               |
| Diglicol, estearato | Monoestearato de dietilenglicol                                      | N     | E               |
| Duponol WA          | Sulfato de laurilo y sodio   | A     | Det, H          |
| Ethofats            | Ésteres polietilénicos de ácidos grasos o ácidos de colofonia.       | N     | E, H            |
| Igepón T            | N- metil-n-oleiltaurato de sodio                                     | A     | Det, H          |
| Intramina           | $RCONH(CH_2)_{10}SO_3Na$<br>( $R$ COOH=ácido láurico comercial).     | A     | H, E            |
| Myrj 45             | Estearato de polietilenglicol  | N     | E               |
| Nacconol NR         | Dodecil bencenosulfonato de sodio                                    | A     | Det, H          |
| Ninol 1281          | Alcanolamidas de ácidos grasos                                       | N     | Det.            |
| Pluronic            | Producto de condensación del óxido de etileno con polipropilenglicol | N     | Det, E, Dis     |
| Span 40             | Monopalmitato de sorbitán  | N     | E               |

TABLA 3. Agentes tensoactivos comerciales

| Nombre comercial | Nombre químico o fórmula   | Clase | Usos<br>ppales. |
|------------------|--|-------|-----------------|
| Sterox CD        | Esteres polietilenglicólicos de los ácidos grasos del aceite de pino | N     | Det             |
| Ultrawet SK      | Alquilbencenosulfonato de sodio                                      | A     | Det             |
| Tween 20         | Monolaurato de tris(polioxi-etileno)sorbitán                         | N     | E, H            |
| Tween 80         | Monooleato de tris(polioxi-etileno)sorbitán                          | N     | E, H            |

Clase:

A, aniónico  
 C, catiónico  
 N, no iónico

Usos principales:

Abl, agente ablandador  
 Det, detergente  
 Dis, agente dispersante  
 E, emulsivo  
 G, germicida  
 H, agente humectante

(3).

## 2. Sales, bases y ácidos inorgánicos.

La cantidad total de sales inorgánicas y álcalis utilizados en la fabricación de detergentes es mucho mayor que la de los surfactantes orgánicos.

Los ingredientes alcalinos son indispensables en muchos de los detergentes que se emplean en el lavado de sustratos fibrosos y de superficie dura. Los ácidos se aplican en ciertas operaciones especiales para limpiar superficies duras; por ejemplo; en el decapado de los metales, en la limpieza de vagones de ferrocarril y para limpiar el equipo de lechería en que se acumulan costras lácteas.

Los componentes inorgánicos más importantes de los detergentes pueden agruparse en seis categorías:

- |              |   |
|--------------|---|
| 1) álcalis   | 4) sales neutras solubles               |
| 2) fosfatos  | 5) ácidos                               |
| 3) silicatos | 6) coadyuvantes inorgánicos insolubles. |

**Álcalis.**- El hidróxido de sodio se usa mucho en el lavado mecánico de las botellas, en el lavado del vidrio y limpieza de metales. El carbonato sódico en su forma anhidra o hidratada, se emplea como coadyuvante o relleno con jabones, surfactantes sintéticos y sustancias inorgánicas en la fabricación de limpiadores para superficies duras y para telas. El bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), el sesquicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y el borato sódico (bórax) sustituyen al carbonato sódico anhidro cuando se desea que la preparación tenga pH bajo.

Las sales de potasio, análogas a la mencionadas, se incluyen algunas veces en fórmulas de alta solubilidad.

Los álcalis no secuestran los iones de metales pesados y su efecto suspensor, si lo tienen, sobre la

mayoría de los sólidos de suciedad es muy escaso. Mantienen elevado el pH y producen buen efecto limpiador en la superficie de la mayoría de los objetos de cerámica y de vidrio.

**fosfatos.-** El pirofosfato tetrasódico ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) es uno de los coadyuvantes y detergentes primarios más importantes para limpiar telas y objetos de superficie dura. Posee gran actividad de secuestración, suspensión y limpieza.

El trifosfato sódico (tripolifosfato sódico,  $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) es el coadyuvante más usado en la preparación de detergentes basados en surfactantes sintéticos y que se destinan a servicio pesado en limpieza de telas. Su actividad de suspensión y secuestramiento es algo mayor que la del pirofosfato tetrasódico y su pH es un poco más bajo. Además, por su excelente acción secuestradora se usa mucho en los detergentes para lavar platos.

Los fosfatos de potasio, particularmente el pirofosfato tetrapotásico, son considerablemente más solubles que los fosfatos análogos del sodio. Se usan como coadyuvantes en los detergentes líquidos.

**silicatos.-** Son de gran utilidad en las preparaciones basadas en detergentes distintos del jabón. En las muchas formas en que se fabrican los silicatos sódicos, la especificación más importante es la relación  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  en el producto. Según el valor de esa relación, los silicatos de sodio, comerciales se llaman orto, meta y sesquisilicatos. El más alcalino es el ortosilicato; su fórmula es  $\text{Na}_2\text{SiO}_4$  cuya relación  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  es de 0.5. El metasilicato,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , cuya relación  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  es igual a la unidad, y el sesquisilicato, cuya relación de óxidos de silicio y de sodio es intermedio entre la del meta y la

del ortosilicato, son menos alcalinos, aunque su pH es considerablemente mayor que el del carbono sódico anhidro.

**sales neutras solubles.** - El sulfato de sodio actúa como excelente diluyente y como compuesto de normalización, reduce la concentración micelar crítica de los surfactantes orgánicos y, en consecuencia, disminuye la concentración necesaria para efectuar un buen lavado. Este efecto es contrarrestado por el aumento del nuevo depósito de la suciedad, de manera que el resultado neto de la adición de sulfato de sodio al surfactante no es siempre favorable. El cloruro de sodio es un coadyuvante, aumenta la detergencia en los detergentes basados en surfactantes no iónicos o aniónicos que se usan para desengrasar la lana.

**ácidos.** - Se agregan ácidos a los detergentes con el fin de disolver o aflojar por acción química la suciedad, que de otra manera sería muy difícil desprender. El ácido fosfórico y el ácido clorhídrico se usan para lavar equipos de lechería. El ácido sulfúrico sirve para el decapado de los metales.

Los ácidos son usados también para controlar el pH de detergentes que deben tener pH notablemente menor de 7. Con este fin se emplean ácidos orgánicos, como el acético y el cítrico.

**Coadyuvantes inorgánicos insolubles.** -

Las arcillas, como el colín y las bentonitas, se usan como ingredientes de preparaciones para lavado y otras que llevan agentes de superficie activa. En condiciones favorables, por ejemplo, con agua blanda, que contiene pocos sólidos disueltos, las suspensiones de arcilla



tienen marcado efecto detergente en las telas ordinarias.

La bentonita es coadyuvante del jabón y de los detergentes sintéticos en composiciones para lavado. Es un excelente emulsificador y suspensor. La bentonita sódica ablanda algo en el agua, porque adsorbe los iones de calcio y se emplea mucho para este fin, en Europa y en el Oriente. Ya que existe gran dificultad para obtener la bentonita completamente libre de arenilla, se han introducido en el mercado silicatos coloidales sintéticos de magnesio y aluminio que no contienen arenilla, que al igual que la bentonita tienen poder emulsionante y de formación de geles. Las arcillas adsorben los detergentes líquidos no iónicos, de manera que pueden emplearse en la fabricación de detergentes en polvo para su uso doméstico.

### 3 y 4. Coadyuvantes orgánicos y aditivos especiales.

Algunos aditivos orgánicos que no poseen actividad de superficie aumentan la detergencia y otras buenas propiedades de las preparaciones limpiadoras. Generalmente, las fórmulas sólo tienen pequeñas cantidades de estos aditivos, que son incorporados para llenar una o más de las siguientes funciones específicas:

1) Disminuir el redeposito de la suciedad sobre el sustrato cuando éste se encuentra en el baño detergente.

2) Secuestrar iones de metales pesados en el detergente concentrado y en el baño limpiador diluido.

3) Aumentar el poder espumante y la estabilidad de la espuma.

4) Aumentar el poder limpiador o el aspecto óptico de limpieza.

5) Aumentar la solubilidad o modificar la forma física del detergente.

6) Inhibir los efectos nocivos que el detergente pueda tener sobre el sustrato.

Se utilizan coloides hidrófilos como carboximetil celulosa, metilcelulosa, derivados del almidón, alcohol polivinílico, la polivinilpirrolidona y proteínas solubles en agua con la propiedad de evitar el redeposición.

Entre los agentes secuestradores de metales pesados, las sustancias más empleadas en las fórmulas de detergentes son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales.

Normalmente los formadores de espuma y los estabilizadores de espuma se encuentran a veces en los surfactantes como subproductos o impurezas, pero frecuentemente se agregan en forma controlada para obtener los efectos deseados. Si en la sulfatación del alcohol laurílico se emplea exceso de sulfatante, el producto da una espuma de muy poca estabilidad y que la adición de alcohol laurílico libre al compuesto restaura el poder espumante. El alcohol laurílico libre aumenta el poder espumante del laurilsulfato, y los productos que se encuentran en el comercio con altos grados de poder espumante contienen alcohol laurílico, habitualmente 10% del laurilsulfato contenido en el producto.

Las monoetanolamidas de ácidos grasos se usan comercialmente como reforzadores de espuma para los alkilsulfatos grasos. En la práctica, se utilizan las monoetanolamidas del ácido láurico de los ácidos del aceite de coco, pues son más potentes que los compuestos elevados de la serie.

Los aditivos solubilizantes empleados en la preparación de detergentes líquidos concentrados caen dentro de varias categorías químicas. En una clase se encuentran los disolventes orgánicos, como los alcoholes inferiores, los glicoles y los éteres glicólicos. La

segunda clase incluye los surfactantes de alta solubilidad. Frecuentemente estas sustancias aumentan la solubilidad de los surfactantes menos solubles y de otros componentes del detergente. La tercera clase comprende la urea y la dicianodiamida.

Frecuentemente es posible aumentar el poder limpiador de los detergentes si se incluyen en la fórmula dos o más surfactantes en vez de uno solo; este efecto se llama sinergismo. Los aditivos orgánicos no surfactantes más usados para aumentar el poder limpiador de los detergentes son varios disolventes comunes, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, disolventes clorados y oxigenados, se han usado en combinación con los surfactantes para elaborar productos que tienen aplicaciones especiales en la limpieza.

En la formulación de los detergentes modernos para lavar ropa, es costumbre incluir en el preparado un agente de blanqueo óptico o abrillantador.

Estas sustancias son colorantes que no absorben o no reflejan normalmente la luz de la región visible del espectro. No obstante, cuando la tela, en la que se ha depositado un colorante de esta clase se expone a la luz solar, fluoresce en la región azul-violeta y da un aspecto de mayor blancura.

Cuando es posible, se agregan al detergente inhibidores de la corrosión y del empañamiento con el fin de proteger los objetos que se lavan y el equipo de lavado. El silicato de sodio es incluido en la mayoría de los detergentes de uso doméstico para evitar la corrosión de las partes de la máquina lavadora (3.68,80).

### III.4 Formas físicas de los detergentes.

Por lo general, los detergentes se aplican al sustrato sucio en la forma física de una solución relativamente diluida. Sin embargo, los detergentes se fabrican y se venden en gran variedad de formas físicas en relación con usos especiales y con problemas específicos de producción y formulación.

En muchos casos, se incluye un ingrediente en la fórmula del detergente con el único fin de modificar o de controlar la forma física. Según la forma, la mayoría de los detergentes pertenecen a uno de los siguientes grupos: polvos, barras o pastillas, pastas y otras formas no líquidas y líquidos o soluciones.

#### polvos.

La cantidad de detergentes en polvo es mayor que la de cualquiera otra forma. Los polvos varían entre las escamas o granos grandes y pesados y las perlas finas y huecas de densidad extremadamente baja. Se fabrican, con algunas excepciones, mediante uno de estos cuatro procedimientos:

- 1) Pulverización de la solución y secado.
- 2) Secado en tambor.
- 3) Trituración del producto sólido.
- 4) Mezcla de un surfactante líquido o disuelto con la sustancia sólida apropiada en proporciones tales que la mezcla final sea sólida o pulverulenta.

La tendencia que tienen los detergentes en polvo a la división extremadamente fina es indeseable y se contrarresta por la adición de un componente antipolvo, que generalmente es un líquido oleoso y céreo o una sustancia higroscópica. La tendencia a formar grumos o al apenazamiento es también indeseable y se contrarresta con sulfato sódico, pero hay otras sustancias antiaglomerantes

que se usan en la preparación de detergentes para fines específicos.

#### barras.

Además de las barras de jabón para lavar, se fabrican detergentes en barras para tocador y usos cosméticos. Los jabones modernos para tocador que están constituidos casi enteramente por jabón puro poseen estabilidad difícil de lograr en los jabones elaborados con surfactantes sintéticos.

#### pastas y otras formas no líquidas.

Los detergentes en pasta son favorecidos tradicionalmente por la industria textil y por usuarios de limpiadores industriales de mantenimiento. Algunos champúes y productos para limpiar las manos también se preparan en pastas.

Uno de los problemas que presenta la fabricación de la pasta es el control de la viscosidad o de la plasticidad. Otro problema es el de la conservación de la homogeneidad física de la pasta.

Los líquidos para limpiar alfombras, los champúes, las cremas para rasurar y otros tipos de detergentes se envasan en bombas de aerosol. Las bombas no liberan el detergente en estado de aerosol, sino como espuma.

#### detergentes líquidos.

Los detergentes y surfactantes que se preparan para fines especiales suelen venderse en solución acuosa.

Para la economía de transporte y almacenamiento, la concentración de las soluciones debe ser razonablemente alta; además, deben conservar su estabilidad en las condiciones que normalmente se presentan. Los problemas que se presentan en la preparación de las soluciones de

detergentes son la estabilización de las sustancias solubles y el aumento de solubilidad de las que son poco solubles. Ambos problemas se resuelven con el uso de aditivos, entre otros aditivos que aumentan la solubilidad están la urea, los xilenosulfonatos y los disolventes orgánicos.

La estabilidad de los detergentes líquidos mejora con la adición de secuestrantes como el EDTA.

El control de la viscosidad es considerablemente importante en muchas soluciones de detergentes. En general, los buenos disolventes tienden a disminuir la viscosidad de la preparación una vez que ésta se ha disuelto completamente. Algunas veces, la viscosidad se eleva, porque al agregar un disolvente éste disuelve partículas que antes estaban en suspensión. La adición de sal suele aumentar la viscosidad de las soluciones detergentes, también se usan para éste fin espesantes coloidales hidrófilos, como los almidones, las gomas y las proteínas (3).

### III.5 Modo de acción de los detergentes.

Las superficies complejas son difíciles de limpiar, porque la suciedad puede ser retenida mecánicamente después de la separación fisicoquímica. En los tejidos, la suciedad puede ser retenida mecánicamente no solo entre los hilos, sino también entre las fibras que forman cada hilo. En los sustratos también es diferente la capacidad de mojarse. Tanto la naturaleza fisicoquímica de la superficie del sustrato como su geometría son factores importantes en el efecto detergente general.

La suciedad es aún más variable que los sustratos y por lo general su naturaleza química y física es menos

conocida. Puede consistir en una sola fase sólida o líquida, pero suele constar de dos o más fases, íntimamente mezcladas unas con otras y dispuestas al azar sobre el sustrato. La suciedad sólida es bastante común: son ejemplos de ella la arcilla seca y el hollín sobre un tejido. Una suciedad más típica es la que contiene tierra y materia grasa.

El baño en un sistema detergente es casi siempre una solución cuyo soluto es el detergente. Puede contener también otros solutos. Si éstos contribuyen al efecto detergente se llaman vigorizadores. Aunque en la mayoría de los casos el baño es acuoso, existen varios ejemplos de sistemas detergentes en los cuales el baño es de naturaleza no acuosa. En esos casos el detergente es soluble en el disolvente no acuoso, que es el principal ingrediente del baño, y actúa por el mismo mecanismo que caracteriza a los detergentes solubles en agua en los sistemas acuosos.

El efecto general detergente en cualquier sistema dado depende en primer lugar de la naturaleza del sistema, esto es, de su composición, y de las relaciones fisicoquímicas y geométricas entre el sustrato, la suciedad y el baño. Sin embargo, la detergencia es un efecto dinámico. Consiste en esencia, en desprender la suciedad del sustrato y separarla por suspensión o emulsión en el baño. Por consiguiente, el efecto detergente depende también de todos los factores que afectan a la interacción fisicoquímica. Los factores más importantes son: la temperatura, el grado de agitación mecánica y la duración del tratamiento.

Para disolver y eliminar la suciedad, el agua tiene que penetrar en aquélla y remojarla, y este trabajo lo realiza mucho mejor con ayuda de un detergente que con

Jabón.

La acción de los detergentes se basa en la deliquesencia, propiedad que tienen algunos cuerpos de absorber la humedad y disolverse en ella. Se puede imaginar una gota de aceite o un trocito de grasa como si fuera un globo lleno de aire. De la misma manera que el globo tiene una delgada capa de goma que aísla su contenido del medio en que se halla, el aceite y la grasa tienen una película invisible que impide la penetración de agua.

Cuando se lava con jabón común es necesario golpear o restregar la ropa o el objeto que se quiere limpiar, a fin de romper esa película aislante.

Gracias a su acción química, el detergente la destruye, y entonces el agua puede disolver el aceite o la grasa.

Los detergentes ofrecen las ventajas de limpiar mejor y más rápidamente que con el jabón y de que la ropa sufre menor deterioro, al no ser tallada como en el lavado con jabón.

El mecanismo de la detergencia varía mucho de un sistema a otro y sólo en los más sencillos se comprende con algún grado de perfección.

En el estudio moderno de la detergencia pronto se reconoció desde el punto de vista químico coloidal, que el poder emulsionador del baño y la acción coloidal protectora del baño sobre las partículas de suciedad suspendidas tenían gran importancia. La acción desfloculante o dispersante y el valor de las películas absorbidas superficiales o interfaciales se reconocieron también como factores importantes en la detergencia.

Spring fue el primero que en 1910 demostró que la detergencia podría considerarse como el efecto de formar compuestos de adsorción entre el jabón y la suciedad y el



jabón y el tejido a expensas del complejo de adsorción existente entre la suciedad y el tejido. (102). Se juzgó como la acción esencial el hacer la superficie de la suciedad más hidrófila por adsorción de una capa de detergente. Rhodes y Brainerd ampliaron esta idea en el que puede considerarse como el primer estudio moderno de la detergencia. (103). Estos investigadores mostraron que la detergencia estriba en equilibrios de adsorción. Lavando juntos artículos sucios y no sucios, vieron que la suciedad se redistribuía entre el baño y los artículos sucios y no sucios. Además, se sabía que existe un máximo de la suciedad que puede eliminarse con un solo baño, y el tiempo necesario para alcanzar ese máximo puede ser bastante largo. Rhodes y Brainerd indicaron además que la suciedad vuelve a depositarse sobre el tejido desde el baño; esto es: que la eliminación y en redépósito de la suciedad alcanzan un equilibrio dinámico. Después se demostró que éste tipo de sistema la rapidez de eliminación de la suciedad es directamente proporcional al contenido residual de la suciedad eliminable en el tejido (104).

Los resultados de este estudio pueden expresarse en forma gráfica transportando el porcentaje de suciedad eliminada en función del tiempo que duran los lavados. Heron ha prolongado los lavados durante varias horas usando diversos detergentes. (105) y los divide en dos categorías: los que eliminan el máximo de suciedad en un tiempo aproximado de diez minutos y los que aproximadamente necesitan cuatro horas en las mismas condiciones.

Adam, (101) estudió la eliminación de la grasa natural de las fibras de lana en un baño detergente. Observó la eliminación de la grasa de fibras aisladas bajo el microscopio y vió que la capa original continua de grasa

se enrollaba para formar glóbulos relativamente grandes, que después se separaban espontáneamente de la fibra. Este último proceso era ayudado por una agitación suave. La función principal del detergente en este sistema es alterar el ángulo de contacto en la superficie de separación fibra-grasa-baño. Cuando el baño es agua pura, éste ángulo de contacto es mayor de  $90^{\circ}$ . Cuando el baño contiene detergente se convierte en  $0^{\circ}$ . Para verificar esta teoría, Adam ideó un aparato para medir los ángulos de contacto de avance y retroceso de una sola fibra de lana en la superficie de separación aire-fibra-baño. Esto lo hizo con fibras limpias y grasientas y llegó a la conclusión de que el ángulo de avance era el factor más importante en la detergencia entre otros factores que Adam consideró de importancia como la dispersión y la emulsión de la grasa una vez que se ha eliminado, el humedecimiento de las fibras y la penetración del baño en los hilos de un tejido. Adam hace observar también que la tensión interfásal entre la suciedad o la grasa y el baño es a veces un factor secundario en la detergencia. El ácido 1-hexadecanosulfónico y el sulfato ácido de hexadecilo (éster cetilsulfúrico) muestran casi las mismas tensiones superficiales e interfásales pero el segundo es un detergente mucho mejor que el primero.

Kling, Langer y Haussner (106,107) han hecho un estudio semejante de la detergencia sobre fibras sueltas aceitadas. Estos investigadores encontraron que los mecanismos detergentes son semejantes para la lana y el rayón. La rapidez de eliminación del aceite depende principalmente de la naturaleza de la suciedad. Los aceites que se eliminan con mayor rapidez son los que contienen ácidos grasos libres, y le siguen los aceites de glicéridos neutros y los aceites minerales.

Aickin estudió la detergencia de una serie de

alkilsulfatos de sodio secundarios sobre lana ensuciada con aceite. La dispersión del aceite eliminado en el baño es afectada de una manera notable por la presencia de electrolitos, como lo es la eliminación real del aceite en las fibras. La adsorción del detergente por las fibras desempeña también un papel en la acción detergente (108). Seck (109), Lindenr (110) y Hall (111) han hecho resaltar la capacidad de los agentes coloidales hidratados superficialmente activos para formar películas protectoras parecidas a un gel sobre las partículas de suciedad y sobre las fibras como un factor importante en la detergencia.

Neunhoefffer ha expuesto algunas consideraciones sobre la naturaleza de la adsorción de los detergentes por las materias de suciedad (112). Dice que en un par o un grupo de iones de jabón asociados las cadenas de parafina están yuxtapuestas mantenidas juntas por la presión de las moléculas de agua. Los extremos iónicos libres de las moléculas de jabón tienden a repelerse y el resultado es una tensión. Al ponerse en contacto con una superficie hidrófoba, los extremos de las cadenas de parafina pueden separarse y la tensión es así disminuida. Esto explica la capacidad humectante de las sales de esa cadena de parafina.

El cambio de base o efecto iónico es, sin duda, muy importante y está estrechamente relacionado con el efecto de los vigorizadores y del pH. El algodón y el rayón contienen carboxilos libres que pueden cambiar cationes. La lana es anfótera y entre límites bastante amplios de pH a uno y otro lado de su punto isoelectrico, puede adsorber firmemente aniones y cationes. Las propiedades de cambio de base de diversas materias de suciedad sólidas son menos conocidas, pero igualmente importantes. Se comprende fácilmente que los iones que son fuertemente adsorbidos

por la suciedad o por el sustrato y que entran en una reacción de cambio de base durante el proceso de lavado pueden ser un factor fundamental en la eliminación de la suciedad.

Sisley fue uno de los pocos investigadores en este campo que consideran la formación de espuma como un factor importante en la detergencia (113), y dice que el detergente está más concentrado en las películas de espuma y que la creación y el rompimiento de la espuma en presencia de los artículos sucios constituye un proceso eficaz.

La enorme importancia del trabajo mecánico para eliminar la suciedad en las condiciones de lavado ordinarias se comprendió mucho antes de que el estudio de la detergencia llegara a ser una rama de la ciencia. Los métodos de lavado primitivos implican golpear los tejidos sucios. Bacon y Smith han estudiado el efecto cualitativo de la acción mecánica y sugieren comparar los detergentes determinando la diferencia en el trabajo mecánico necesario para alcanzar el mismo grado de eliminación de la suciedad. (114).

Los estudios que se acaban de mencionar son solamente una pequeña parte de los que se han publicado, pero ilustran casi todas las variables importantes en la detergencia, salvo la composición del baño.

El análisis que sigue intenta separar los factores que afectan a la detergencia y los mecanismos moleculares eficaces para realizar la limpieza. Para hacer el estudio más sencillo se examinará el tipo más conocido de sistema detergente: un tejido con suciedad líquida y sólida en un baño acuoso que contiene un detergente.

El proceso detergente consiste en tomar un sustrato, tratarlo con un baño detergente por inmersión y una acción mecánica, retirarlo del baño y enjuagarlo para eliminar el

líquido residual del baño. En los procesos detergentes ordinarios en los cuales la cantidad de líquido (razón en peso del baño al tejido) es del orden 10:1 o mayor, el enjuague solo produce efectos de segundo orden. Para demostrar esto podemos considerar el caso de un trozo sucio de tejido que pese un kg y se lave en diez kg de baño detergente. Al retirar el tejido retendrá aproximadamente un kg de baño utilizado; esto es: aproximadamente 10% de la suciedad eliminada suponiendo que la suciedad estuviera uniformemente distribuida en el baño. Los extremos de la acción del enjuague son:

- 1) eliminación completa de todo el líquido y toda la suciedad residual del baño.
- 2) redeposición completa de toda la suciedad contenida en el líquido.

La diferencia entre esos dos extremos corresponde al 10% de diferencia en la eliminación de la suciedad total. En la práctica, el enjuagado rara vez provoca el depósito de suciedad sobre el tejido.

El efecto detergente total depende de:

- I).- La naturaleza del sustrato.
- II).- La naturaleza de la suciedad.
- III).- La composición del baño, que determina sus propiedades de volumen y superficie.
- IV).- Las condiciones físicas y mecánicas de lavado; temperatura, duración del tratamiento y tipo y grado de acción mecánica.
- V).- Las cantidades relativas de sustrato, suciedad y baño presentes en el sistema.

El efecto detergente total puede expresarse sencillamente como la eliminación de la suciedad del sustrato con el baño. Esta acción está condicionada solamente por las cinco variables primarias antes mencionadas. Son las subvariables y las relaciones entre

ellas las que dan un cuadro complicado y difícil.

La estabilidad del complejo sustrato-suciedad, que podemos llamar complejo I-II, puesto que depende de I y II, está condicionado por:

a) las fuerzas de adherencia interfásal pura entre el sustrato y la suciedad; esto es: las fuerzas de atracción de Van der Waals. Estas fuerzas son más importantes cuando la suciedad es de naturaleza líquida, como en el aceite sobre la madera.

b) las fuerzas electrostáticas entre el sustrato y la suciedad. Estas son especialmente importantes en las materias de suciedad sólida y probablemente no tan importantes en las líquidas o aceitosas. Sin embargo, pueden condicionar la adherencia de las partículas de suciedad sólida al revestimiento aceitoso o ceroso de una fibra.

c) la yuxtaposición puramente mecánica de la suciedad y el sustrato. Este es el factor más importante en la suciedad sólida gruesa y podría ilustrarse por el ejemplo de la arena en un traje de baño. Puede ser también el factor sumamente eficaz en el caso de la suciedad finamente dividida, en especial cuando el baño ha reducido al mínimo las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas electrostáticas anteriormente mencionadas.

Los factores de importancia primordial en la composición del baño (III) son:

a) la naturaleza química y la concentración del soluto o los solutos superficialmente activos.

b) la naturaleza química y la concentración de otros solutos que no son superficialmente activos, pero que pueden facilitar la detergencia, ser inertes o estorbarla. Si facilitan la detergencia, se llaman vigorizadores.

c) la naturaleza y la concentración de los no solutos o materia suspendida (distinta de la suciedad procedente del

artículo que se quiere lavar) en el baño. Entre ellos se encuentran la arcilla, la bentonita y otros aditivos y disolventes emulsionados, como el aceite volátil de pino y el keroseno.

d) el pH del baño.

e) la composición del baño cambia invariablemente durante el lavado. Los cambios manifiestos son:

e-1. adición de suciedad sólida suspendida.

e-2. adición de suciedad líquida suspendida o emulsionada.

e-3. adición de suciedad sólida o líquida solubilizada.

La composición del baño puede cambiar también por:

e-4. adsorción de uno o varios componentes por el sustrato.

e-5. adsorción de uno o varios componentes por las partículas de suciedad (líquidas o sólidas).

e-6. disolución de materia soluble del sustrato o la suciedad.

e-7 interacción química de uno o varios componentes del baño con la suciedad, con el sustrato o con productos solubles de los mismos.

Las condiciones físicas de lavado (IV), que son importantes porque influyen en la interacción entre el baño y el complejo suciedad sustrato, son las siguientes:

a) temperatura.

b) duración del tratamiento.

c) grado y tipo de acción mecánica.

Los modos probables de interacción entre el baño, el sustrato y la suciedad pueden indicarse como interacciones entre el sustrato y el baño (I-III), o interacciones entre la suciedad y el baño (II-III). Son como sigue:

I-III A. Humectación del sustrato por el baño, necesaria para establecer el contacto sin el cual es imposible cualquier clase de interacción. La humectación

implica penetración en los hilos del tejido de modo que cada fibra es mojada por el baño en los puntos en los cuales no está cubierta por la suciedad.

II-III A. Humectación de la suciedad por el baño. Aquí son aplicables las mismas consideraciones que en la humectación del sustrato.

I-III B y II-III B. La adsorción de componentes del baño en la superficie del sustrato y en la superficie de la suciedad. Estos adsorbatos pueden ser películas monomoleculares de agentes superficialmente activos, iones inorgánicos o partículas de dimensiones coloidales. La adsorción de iones por la fibra modifica las fuerzas atractivas electrostáticas para la suciedad. La adsorción de iones por la suciedad impide que vuelva a depositarse y aumenta el grado en que la suciedad está suspendida en el baño. La adsorción de coloides por la suciedad y la fibra permite a la primera emigrar fuera del tejido, de la misma manera que un coloide adsorbido permite a una suspensión de negro de humo pasar a través de un papel filtro. La adsorción de agentes superficialmente activos y de un coloide sobre materias de suciedad líquida estimula la formación de una emulsión estable de la suciedad líquida en el baño.

II-III C. La solubilización de la suciedad por el baño. Esto puede ser muy importante en el caso de las suciedades líquidas y de algunas suciedades sólidas.

En resumen: la eliminación de la suciedad puede llevarse a cabo: 1) por los efectos de la energía interfasal entre el baño, la suciedad y el sustrato. 2) por adsorción de un coloide sobre la suciedad y el sustrato. 3) por adsorción de iones sobre la suciedad y el sustrato, que da como resultado una disminución de las fuerzas atractivas electrostáticas. 4) por solubilización de la suciedad en el baño. La separación de la suciedad C



e impedir que vuelva a depositarse) puede conseguirse por cualquiera de esos cuatro factores o por todos ellos, ya que dan como resultado la emulsión de suciedad líquida y sólida por la fibra.

Algunos baños detergentes comerciales no contienen ningún agente tensoactivo. El mejor ejemplo es la mezcla de silicatos y fosfatos alcalinos usada en las máquinas para lavar vajillas. En muchos casos, estas mezclas funcionan, al menos parcialmente, reaccionando con los ácidos grasos libres de la suciedad para formar jabones. Casi todos los baños para lavar tejidos contienen uno o varios agentes de superficie activa.

Pueden contener también otros componentes solubles y, en algunos casos, componentes suspendidos insolubles que no son en sí mismos superficialmente activos. Si estos componentes contribuyen al efecto detergente se llaman vigorizadores; de lo contrario se llaman rellenos o diluyentes. En general, el efecto vigorizador no es muy específico. En otras palabras: una sustancia que es un vigorizador para un tipo de agente superficialmente activo por lo general también "vigorizará" otros tipos semejantes.

Al estudiar los efectos útiles de los agentes de superficie activa uno de los conceptos importantes es el sinergismo, término, que se aplica cuando una mezcla de dos o más sustancias muestra una eficacia mayor que cualquiera de los componentes utilizado aisladamente. En la humectación y la emulsión y también en la detergencia, se encuentran comúnmente ejemplos de sinergismo. Este se distingue de la acción vigorizadora en que cada componente sinérgico en sí mismo es superficialmente activo (3).

### III.6 Aplicaciones de los detergentes.

En los detergentes en general, hay que considerar tres características que determinan sus variadas aplicaciones: el poder humectante, el detergente y el espumante en relación con la propiedad que tienen todos ellos de abatir la tensión superficial del agua ( sistema aire-liquido) o la tensión interfaseal ( sistema liquido-liquido).

#### Lavanderías industriales.

Las fórmulas típicas de polvos detergentes para servicio pesado usadas por esta industria, son principalmente jabón (20 a 80%) y silicatos alcalinos (80 a 20%). A partir de 1953, los suministradores de productos detergentes para servicio pesado empezaron a introducir fórmulas que contenían surfactantes no iónicos. Estos se mezclan a veces con dodecilsulfonato sódico o jabón. Solo de 5 a 12% de un surfactante liquido no iónico puede mezclarse con componentes inorgánicos manteniendo todavía un polvo que corra libremente. Los principales surfactantes no iónicos utilizados son nonilfenoletilenoxilado con 9-10 moles de óxido de etileno y óxido de polipropileno etoxilados con 20-40%, aproximadamente de óxido de etileno. Las lavanderías industriales y de instituciones utilizan agua ablandada y por ello siguen empleando en mayor medida fórmulas con base en jabón.

En la siguiente tabla se expresa una comparación de propiedades de superficie activa de surfactantes aniónicos y no iónicos.

TABLA 4. Comparación de propiedades de superficie activa.

| Aniónicos   | No iónicos  |
|---|---|
| . Forman siempre espuma.  | . Forman espuma más ligera; puede ser controlada.           |
| . Más difíciles de enjuagar; reactivos con los metales                                  | . Se enjuagan mejor; no reaccionan con los metales.         |
| . Mejor mojadura de superficies metálicas.  | . Mojadura menos efectiva de superficies polares.           |
| . Poder dispersivo mucho mayor, menos redeposito, mayor capacidad de eliminar suciedad. | . Necesitan adición de dispersante para cargas muy sucias.  |
| . Requieren agua blanda o secuestrantes   | . Más tolerancia al agua dura.                              |
| . Más tolerantes al pH elevado.   | . Se precipitan fácilmente por sales insolubles en álcalis. |
| . Mejores para suciedad de tipo polar   | . Mejores para suciedad no polar (aceites y grasas).        |

(3)

Industria de productos alimenticios.

El lavado de botellas de bebidas no alcohólicas, leche y cerveza, y su esterilización simultánea, se hace con maquinaria automática por inmersión en hidróxido de sodio de 3 a 5% y aproximadamente a 60°C. Se practica comúnmente agregar de 0.5 a 3% de un surfactante no

iónico. A la concentración de 0.5%, el surfactante no iónico actúa como agente despolvador de la mezcla seca; a 3% actúa como humectante y dispersante en la solución de lavado de botellas.

La industria de la leche y en menor extensión la de envasado de alimentos higienizan su equipo diariamente. Se utilizan yodóforos para éste fin. Un yodóforo es una solución de yodo en un surfactante no iónico que da un complejo no iónico y además conserva las propiedades germicidas del yodo. Las fórmulas que se venden tienen generalmente 1% de yodo, 10% de surfactante no iónico y 5% de ácido fosfórico. Frecuentemente se formulan cloruros de amonio cuaternario con un surfactante no iónico como detergentes sanitarios.

Detergentes para uso casero y de instituciones y productos químicos para mantenimiento.

Todo producto formulado con el fin de que sea usado por una ama de casa, ha de ser ante todo inocuo y no irritante.

Los detergentes para el lavado de ropa representan la mayor de las aplicaciones de surfactantes no iónicos. El dodecilbencenosulfonato sódico es el principal surfactante usado; pero con la llegada de la extensa campaña en pro de los detergentes de poca espuma para uso casero, en 1958, invadieron el mercado los productos que usan surfactantes no iónicos.

Estos productos de poca espuma o de espuma controlada contienen un surfactante no iónico simple o una cantidad importante de éste mezclada con jabón o con dodecilbenceno sulfonato sódico.

Detergentes para el tratamiento de textiles en proceso.

En la industria textil las operaciones de limpieza comúnmente como "desengrasado" pueden efectuarse

sobre la fibra bruta (antes de hilarla como preparación para el tejido); sobre la hilaza o la tela (antes del tejido, del estampado o del acabado); sobre los artículos estampados o tejidos con colores fijos (antes del acabado), o sobre los artículos acabados con resinas.

La lana bruta y otras fibras animales se desengrasan en un proceso semicontinuo. La lana pasa sucesivamente por una serie de cuatro o cinco tinajas por las cuales fluye la solución limpiadora en sentido contrario al movimiento de la lana. La primera tina contiene agua sola o con un poco de detergente. La última tina es para enjuagar, y las intermedias contienen el detergente. Este puede ser jabón (0.1-0.5%) y carbonato sódico anhidro (0.5-2%); un sulfato o sulfonato aniónico sintético y carbonato sódico anhidro; un polioxietileno no iónico y el mismo carbonato o una alcoholamida grasa y el carbonato. Este puede reemplazarse en los baños total o parcialmente por un fosfato condensado como el pirofosfato o el tripolifosfato. El cloruro sódico se usa también como coadyuvante en los sistemas que llevan un surfactante no iónico o un surfactante aniónico muy soluble.

La elección de detergentes para quitar el apresto y los lubricantes de la hilaza de los artículos tejidos depende en gran parte de la clase de fibra. Los artículos de algodón se hierven en grandes calderas con sosa cáustica débil o sosa cáustica y silicato como componente principal del detergente.

#### Detergentes para el lavado doméstico.

En el lavado de ropas y telas en el hogar se distinguen el lavado fino o servicio ligero y el lavado fuerte. El primero se hace a mano, y se aplica a medias, ropa interior, suéteres de lana, etc. La temperatura del agua generalmente no es mayor de 45°C y algunas veces es más baja hasta de 30°C. Los detergentes para servicio

Ligero se preparan especialmente para el lavado fino.

El lavado pesado o fuerte de trajes y artículos de algodón o de lino se efectúa en máquinas lavadoras. También pueden incluirse aquí algunos artículos de rayón lavable y de fibras sintéticas.

Las modernas preparaciones de productos sintéticos con coadyuvantes para trabajo fuerte en el lavado doméstico están formados esencialmente por un detergente orgánico no jabonoso, un fosfato condensado, una sustancia que evite el redepósito (usualmente carboximetilcelulosa), cantidades menores de aditivos especiales, como sustancias anticorrosivas, estabilizadores de espuma, blanqueadores ópticos, etc., y el resto es humedad y sulfato sódico o sales inorgánicas similares de poco efecto en el lavado de los artículos de algodón. El contenido de detergente orgánico varía de 15 a 40%. La relación de fosfato condensado (comúnmente trifosfato, pero a veces pirofosfato o una mezcla de los dos) con el detergente orgánico varía desde 1:1, o menos, hasta 3:1. La proporción de carboximetilcelulosa varía entre 0.5 y 2%. Estos productos se disuelven fácilmente en agua fría y son tan eficaces como los productos sintéticos para lavado ligero y en este aspecto son mejores que la mayoría de las preparaciones de jabón. Así, las preparaciones sintéticas reforzadas son detergentes para todo uso, y su versatilidad les da una ventaja considerable sobre los otros tipos de preparados para lavado doméstico.

Los detergentes líquidos se utilizan para el lavado de vajillas y para el lavado fino.

Detergentes para superficies duras.

En las aplicaciones de estos detergentes se distinguen, según el sustrato: 1) la limpieza del vidrio y de la loza; 2) limpieza de metales; 3) limpieza de

superficies pintadas, de plásticos y de productos de naturaleza orgánica; 4) mantenimiento de la limpieza de superficies compuestas; 5) limpieza de materiales sensibles que pueden dañarse, por ejemplo, alimentos (3).

### III.7 Detergentes enzimáticos.

Probablemente la aplicación industrial más conocida de las enzimas es en detergentes y preablandadores. Aunque en la literatura apareció información sobre detergentes enzimáticos desde 1915, no fue sino hasta 1903 que en Holanda se vendió con éxito el primer detergente enzimático.

Alrededor de 1907 los fabricantes europeos de detergentes introdujeron detergentes de perborato de sodio conteniendo enzimas. El "Tide XK", el primer detergente enzimático vendido en Estados Unidos estuvo disponible en las áreas de prueba del mercado por primera vez en 1966.

Antes de 1900 los productos de lavandería que contenían enzimas estaban basados en proteasas animales, las cuales no eran convenientes para su uso bajo determinadas condiciones de lavado. La disponibilidad de cantidades comerciales de proteasas bacterianas estables fue una gran alternativa, la cual llevó al mercado a los detergentes enzimáticos.

Los microorganismos conocidos como *Bacillus subtilis* son utilizados para producir enzimas para lavandería por medio de procedimientos de fermentación.

Los detergentes enzimáticos son verdaderamente más efectivos que los detergentes puros o regulares en la eliminación de manchas difíciles, tales como sangre, pasto y manchas de origen bioquímico (7).

## IV. ENZIMAS CON ACTIVIDAD DETERGENTE

### IV.1 Introducción.

La gran mayoría de las reacciones químicas efectuadas en el interior de las células, se realizan gracias a la participación de las enzimas, las cuales favorecen la transformación de sustratos en productos.

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteínica y algunas de ellas requieren para su función de la presencia de un grupo prostético o de una coenzima.

El término "enzima" procede del griego zimé, que quiere decir levadura, fue sugerido por Kühne desde 1878. Sin embargo, desde el tiempo de Berzelius, en 1875, se tenía conocimiento de que las células vivas producían sustancias con acción parecida a los catalizadores inorgánicos.

En 1897 Büchner demostró que el fenómeno de la fermentación era llevado a cabo por un extracto libre de células, obtenido a partir de levadura.

Las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, o sea, que aceleran las reacciones químicas que se realizan en los seres vivos y son verdaderos catalizadores, ya que poseen las características siguientes:

a) funcionan en cantidades sumamente pequeñas.

b) permanecen inalteradas después de actuar en la reacción.

c) no afectan las concentraciones finales en equilibrio sino que únicamente disminuyen la energía de activación requerida, de tal modo que se aumenta la velocidad de la reacción (44).

El factor determinante de la interacción de la enzima con el sustrato es una determinada ordenación de aminoácidos localizados en cierto lugar de la enzima.



también denominado sitio activo.

De acuerdo a su localización las enzimas pueden ser de dos tipos:

1) **Exoenzimas.** Estas enzimas son excretadas por las células productoras, una vez excretadas penetran y rompen materia orgánica tal como, proteínas, almidones y grasas que pueden ser absorbidos o transportados a través de la membrana celular.

2) **Endoenzimas.** Son aquellas enzimas que permanecen dentro de la célula, son transformadas y/o hidrolizadas por la acción de coenzimas para producir energía y los componentes de la célula necesarios para vivir (98).

Las enzimas detergentes que se describirán son exoenzimas, caracterizadas por su actividad hidrolítica bajo condiciones alcalinas (99, 100).

De acuerdo con la Comisión Internacional las enzimas se clasifican en seis grandes clases:

1. **Oxidoreductasas.** Estas enzimas catalizan reacciones de óxido-reducción. Pueden actuar sobre compuestos que tengan: un radical alcohol, un grupo aldehído, un grupo ceto, y grupos amino.

2. **Transferasas.** Transfieren grupos funcionales

- grupos de un carbono
- grupos aldehídicos o cetónicos
- grupos acilo
- grupos glicosilo
- grupos fosfato
- grupos que contienen azufre.

3. **Hidrolasas.** Catalizan reacciones de hidrólisis

- ésteres
- enlaces glicosílicos
- enlaces peptídicos
- otros enlaces C-N

#### Carbónidos ácidos

4. Liasas. Actúan en adiciones a enlaces dobles. Son enzimas que rompen ligaduras entre C-C, C-O, C-N, y otros enlaces por medios diferentes a la hidrólisis y a la oxidación.

5. Isomerasas. Catalizan reacciones de isomerización racemasas.

6. Ligasas. Catalizan la formación de enlaces con intervención de ATP, enlaces como C-O, C-S, C-N, C-C (44).

#### Amlasas

Las amilasas son enzimas extracelulares las cuales hidrolizan moléculas de almidón a productos como dextrinas y productos progresivamente más pequeños compuestos de unidades de glucosa.

Las  $\alpha$ -amilasas comerciales de diferentes bacterias y hongos varían con respecto a su temperatura y pH óptimos, estabilidad y extensión a la cual degradan almidón.

La  $\alpha$ -amilasa bacteriana de cepas termofílicas de *Bacillus subtilis* puede ser utilizada para la licuefacción de almidón en conversiones en las cuales es agregada a una suspensión de gránulos no gelatinizados de almidón (preferentemente de papa), el cual es alimentado a un reactor de gelatinización debido a su elevada estabilidad térmica.

Mediante el empleo de una combinación adecuada de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, amiloglucosidasa, isoamilasa o maltasa, es posible obtener una variedad casi ilimitada de productos de la hidrólisis de almidón y por lo tanto jarabes con las propiedades deseadas, por ejemplo con un contenido de maltosa tan elevado como 80% (57-82).

## Proteasas

La segunda clase de enzimas hidrolíticas de mayor importancia industrial está formada por las proteasas.

Las proteasas ácidas son principalmente de origen fúngico (*Aspergillus*, *Rhizopus*), son más activas en el rango de pH de 2 a 5, son insensibles a sulfhidrilo, agentes metálicos, quelantes y metales pesados y catalizan la hidrólisis de un amplio rango de enlaces peptídicos.

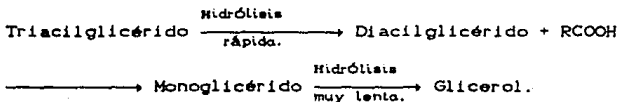
Las proteasas neutras son metaloenzimas que contienen zinc y por ésta razón son desactivadas por agentes quelantes. Ellas exhiben un óptimo de actividad a pH de 7 a 8 y a temperatura de 45 a 50°C y rompen enlaces peptídicos del tipo: His-Leu, Ala-Leu, Tyr-Leu, Gly-Phe y Phe-Phe.

Las proteasas alcalinas son las más importantes por su extenso uso en detergentes para remover manchas de naturaleza proteínica.

Las proteasas alcalinas tienen un perfil de actividad a rangos de pH tolerantes de 8 a 11, la actividad máxima generalmente es a pH de 9.5 a 10.5, exhiben fuerte actividad esterolítica y rompen enlaces peptídicos de varios tipos (57,62).

## Lipasas

Las lipasas son enzimas pertenecientes a las esterasas carboxílicas, tienen cierta especificidad por triacilglicéridos o ésteres del glicerol.



Existen algunas lipasas ácidas con actividad óptima a pH de 5 a 6, pero las lipasas más utilizadas industrialmente que provienen de microorganismos son alcalinas y tienen máxima actividad a pH de 8 a 9. Su mayor aplicación es en detergentes.

Su mecanismo es heterogéneo, es decir la lipasa es soluble en agua pero no su sustrato (83).

#### IV.2 Enzimas detergentes.

Actualmente más del 50% de los detergentes de lavandería de servicio pesado en Europa contienen enzimas. La tendencia reciente hacia la utilización de bajas temperaturas de lavado junto con los avances en la tecnología de encapsulación de los productores de enzimas detergentes ha contribuido a renovar el interés en enzimas alcalinas activas.

Las enzimas proteolíticas de serina alcalinas constituyen más del 95% de todas las enzimas vendidas en el mundo para detergentes de lavandería. La utilización de enzimas detergentes de fuentes bacterianas está basada principalmente en el desarrollo de proteasas alcalinas activas y estables.

Propiedades que las enzimas deben cumplir para ser adecuadas a detergentes de lavandería:

a) con la excepción de detergentes líquidos de servicio pesado, no compuestos, el pH de los detergentes de lavandería está generalmente en el rango entre 9 y 10.5.

b) otra propiedad importante para las enzimas proteolíticas detergentes es la estabilidad térmica, o más propiamente dicho versatilidad térmica. La lavandería europea utiliza temperaturas desde la ambiente hasta 100°C, así la estabilidad al calor de la enzima debe ser

la mejor.

Aunque los requerimientos térmicos en los Estados Unidos son más bajos, el agua caliente de lavado está considerada en el rango de 50 a 55°C.

c) un tercer factor en la adecuación de la enzima detergente es la naturaleza de los sitios activos de la enzima.

Aunque la papaina (una proteasa vegetal de *Carica papaya*) tienen varias características químicas que podrían ser adecuadas para el medio de lavado detergente tales como la estabilidad térmica y su amplia inespecificidad de sustrato, contiene cisteína e histidina en sus sitios activos. Con el fin de que ésta enzima sea activa el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína en los sitios activos, debería estar en la forma tiol normal. Bajo condiciones de lavado europeas, en donde el perborato de sodio es incluido en las formulaciones detergentes, la enzima es inactivada vía oxidación del grupo tiol.

En el caso de la tripsina que contiene seis puentes disulfuro, ocurre una oxidación en presencia de perborato para producir un cambio en la estructura terciaria de la proteína. A temperaturas por arriba de 60°C esta inactivación es bastante rápida.

En Estados Unidos generalmente no es incorporado perborato de sodio en las formulaciones de detergentes. Sin embargo, además de las consideraciones de costo y disponibilidad, un detergente de lavandería que contenga papaina o tripsina debería ser considerado incompatible con blanqueadores, bases de polvo de perborato de sodio y otras formulaciones que incluyan perborato de sodio (98).

Como se observa en las tablas 5 y 6 la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* es mucho más adecuada que papaina o tripsina pancreática para su utilización en

ergentes.

TABLA 5 Propiedades de proteasas alcalinas y neutras.

| Característica o prueba             | Proteasa alcalina             | Proteasa neutra.                            |
|-------------------------------------|-------------------------------|---|
| Propiedades físicas, pH óptimo.     |                               |   |
| Actividad.                          | pH 8-14                       | pH 5.5-8                                    |
| Estabilidad.                        | pH 5-10                       | pH 5-8                                      |
| Naturaleza del sitio catalítico.    | Serina                        | Metal del grupo II.                         |
| Estabilización por Ca <sup>++</sup> | 0                             | +   |
| Inhibición por:                     |                               |   |
| DFP y PMSF*                         | +                             | 0   |
| EDTA y fosfato*                     | 0                             | +   |
| Extracto de cebada                  | +                             | 0   |
| Perfiles de sustrato:               |                               |   |
| ésteres de a.a y amidas             | +                             | 0   |
| Cadena B de insulina oxidada        | 18 enlaces hidrolizados       | 5 enlaces hidrolizados                      |
| Especificidad enzimática:           |                               |   |
| residuo de a.a. de preferencia.     | Leu CO-<br>Cys CO-<br>Glu CO- | -NH <sub>2</sub> Leu<br>NH <sub>2</sub> Phe |

(98).

\*DFP = diisopropilfluorofosfato.

PMSF = fenilmetilsulfonilfluoruro.

EDTA = ácido etilendiaminotetracético.

TABLA 8. Estabilidad enzimática en presencia de 0.1% perborato de sodio.

| Enzima   | % Actividad residual* |
|--|-----------------------|
| Papaina  | 0                     |
| Tripsina pancreática de páncreas porcino y bovino. | 48                    |
| Proteasa alcalina de <i>Bacillus licheniformis</i> | 90                    |

\* Después de 30 min. a 50°C. y pH 9.5. (98).

d) en adición a la estabilidad a temperaturas y valores de pH relativamente elevados, la enzima debe ser compatible con los otros ingredientes de los detergentes, tales como surfactantes, agentes quelantes (fosfatos, EDTA, ácido nitrilotriacético NTA, etc.), abrillantadores ópticos, perfumes, etc.

Este es el caso de las enzimas proteolíticas de serina alcalinas (117).

Las enzimas producidas por cepas alcalofílicas de *Bacillus* son apropiadas para su uso en detergentes de lavandería de servicio pesado y en formulaciones de productos líquidos de lavandería (117-119).

Las proteasas alcalinas y neutras difieren básicamente en la naturaleza de sus centros catalíticos y además pueden ser caracterizadas por:

- 1) rango de pH de actividad y estabilidad.
- 2) efectos de activación-inhibición.
- 3) concentración de sustrato.

La tabla 5 compara las propiedades de proteasas alcalina y neutra de *Bacillus subtilis* (98).

Entre las enzimas detergentes más comerciales (proteasas bacterianas alcalinas del tipo de serina) derivadas de *B. subtilis* o *B. licheniformis* están la Alcalasa y la Espearasa.

Como ya se mencionó anteriormente, para que una enzima funcione en detergentes de lavandería, ésta deberá ser estable en presencia de agentes secuestrantes como tripolifosfato de sodio, ya que las enzimas requieren de un número mínimo de iones calcio o magnesio para ser activas.

En la tabla 7 se muestra la estabilidad de enzimas proteolíticas alcalinas frente a tripolifosfato de sodio comparada con la estabilidad en presencia de iones calcio (6).

TABLA 7. Estabilidad de enzimas proteolíticas alcalinas en presencia de iones calcio y tripolifosfato de sodio (STP).

| Enzimas               | Actividad residual en %<br>después de 30 min. a 122°F<br>(50°C) y pH = 9. |          |
|-----------------------|---|----------|
|                       | CaCl <sub>2</sub> 0.01M   | 0.1% STP |
| Tripsina pancreática  | 94  | 11       |
| Proteasas bacterianas |   |          |
| Alcalasa              | 98  | 44       |
| Espearasa             | 97  | 89       |

(d).

Como se observa es mayor la actividad de las enzimas en presencia de iones calcio ya que el STP es un agente quelante que disminuye la concentración de iones para la actividad enzimática.



La figura 2 proporciona una comparación de la habilidad ligante de calcio de tripolifosfato de sodio y del ácido nitrilotriacético NTA cubriendo el rango de pH de 6 a 12.

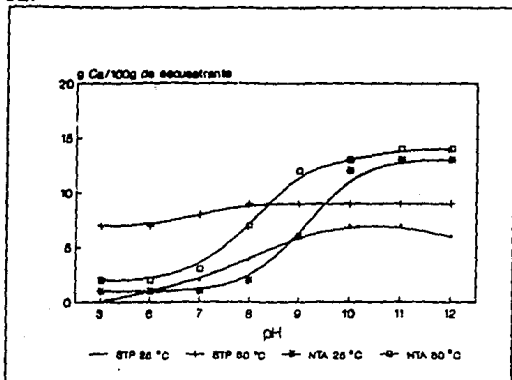


FIG.2 Comparación de la habilidad secuestrante de calcio de STP y NTA  $\text{Na}_3\text{H}_2\text{O}$  (6).

En la tabla 8 se muestra el efecto de un agente secuestrante sobre la estabilidad de enzimas proteolíticas alcalinas en concentraciones diferentes.

TABLA 8. Estabilidad de enzimas proteolíticas alcalinas en presencia de NTA.

% Actividad residual después de 30 min. a 130°F (54.4°C) y pH = 9.5

| Enzima               | 0.03% de NTA | 0.1% de NTA |
|----------------------|--------------|-------------|
| Tripsina pancreática | 28           | 32          |
| Alcalasa             | 71           | 50          |
| Espearasa            | 73           | 70          |

(6).

### Alcalasa y Espearasa

Las figuras 3 y 4 muestran los perfiles de temperatura y pH de la Alcalasa.

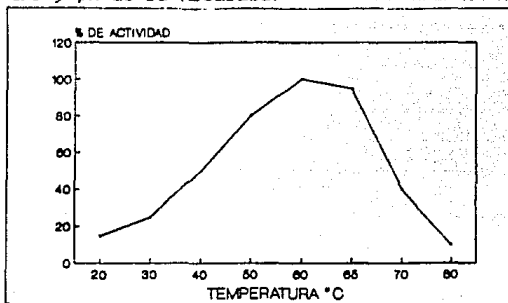


FIG. 3 Actividad de alcalasa a diferentes temperaturas.

Concentración de enzima: 0.05-0.5 unidades Anson/l.  
 Sustrato: hemoglobina desnaturalizada.  
 pH 9.5. Tiempo de reacción 10 min. (5,6).

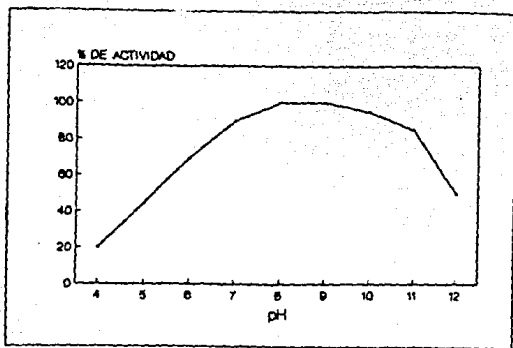


FIG. 4 Actividad de Alcalasa a diferentes valores de pH.

Concentración de enzima: 0.02-0.2 unidades  
 Anso/l. Temperatura: 25<sup>o</sup> C. Sustrato:  
 hemoglobina desnaturalizada. Tiempo de reacción  
 10 min. (5,6).

Se puede observar que, aunque la actividad se incrementa con el aumento de la temperatura, por arriba de 60<sup>o</sup>C., la pendiente de la curva no es muy pronunciada. Esto significa que la enzima trabaja bien aún a bajas temperaturas encontradas durante el remojo y las etapas iniciales del ciclo de lavado en las máquinas lavadoras.

La curva de pH/actividad muestra un óptimo en condiciones moderadamente alcalinas (pH de 8.5 a 9), pero el rango usual de pH es bastante amplio y se extiende arriba de aproximadamente pH 10. En consecuencia, la Alcalasa puede ser utilizada en muchas formulaciones de detergentes domésticos ordinarios (5).

Para formulaciones de detergentes de servicio pesado y detergentes líquidos son preferibles enzimas con una mayor tolerancia alcalina. Tales enzimas, derivadas de especies alcalofílicas de *Bacillus* son disponibles comercialmente.

Las figuras 5 y 6 muestran los perfiles de temperatura y pH de una proteinasa altamente alcalina: Espearasa.

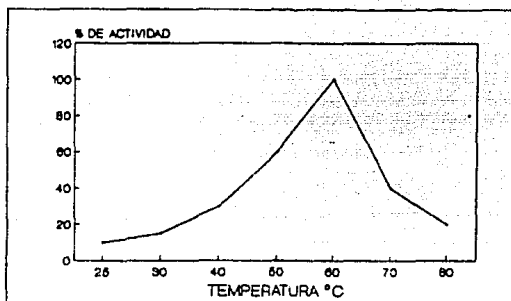


FIG. 5 Actividad de Espearasa 4 M. a diferentes temperaturas.

Concentración de enzima: 150 mg/l.      Sustrato:  
hemoglobina desnaturalizada.      pH 10.1.      Tiempo  
de reacción 10 min. (5).

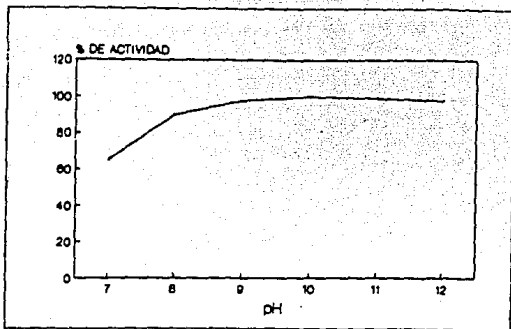


FIG. 6 Actividad de Espearasa 4 M. a diferentes valores de pH.

Concentración de enzima: 150mg/l  
 temperatura: 25°C, sustrato: hemoglobina  
 desnaturalizada, tiempo de reacción: 15 min.  
 (5,6).

La característica más sorprendente de la Espearasa es su curva tan constante, la cual muestra que la enzima trabaja bien aún a pH = 12.

La Espearasa fue introducida dentro de productos de lavandería en los años setentas.

Ambas, Alcalasa y Espearasa, demuestran compatibilidad en el funcionamiento con el pH que producen los constituyentes de detergentes como tripolifosfato de sodio, ácido nitrilo triacético y carbonato de sodio (5,6).

En el funcionamiento de las enzimas se debe considerar, el tiempo de reacción y la concentración enzimática, además de la temperatura y el pH.

Las temperaturas de lavado determinan los objetivos de funcionamiento y por lo tanto, el nivel de enzima

formulado dentro del producto.

Existe una diferencia considerable en las temperaturas del agua de lavado entre los diferentes países. Las temperaturas del agua de lavado son considerablemente más bajas fuera de Europa, en donde es común utilizar agua a 200°F ( 94°C ).

En Estados Unidos la temperatura del agua más empleada, puede estar en el rango de 65°F ( 19°C ) a 125°F ( 52°C ). En Japón es común una temperatura del agua de 68°F ( 20°C ) (8).

Desde luego, el tiempo del ciclo de lavado, el diseño de la maquinaria y las tendencias en diferentes tejidos afectan el funcionamiento en el lavado de los detergentes.

Desde hace 20 años, los países en donde se utilizan temperaturas altas de lavado han constituido el mayor mercado para enzimas detergentes.

En Estados Unidos existe gran variedad de productos de lavandería además de detergentes de servicio pesado.

En la formulación de enzimas dentro de productos de lavandería se consideran dos criterios: compatibilidad reactiva de la enzima con otros constituyentes detergentes y la estabilidad o vida de anaquel del producto.

Actualmente se encuentran en el mercado detergentes líquidos de servicio pesado en una gran variedad de productos. Estos incluyen : líquidos no compuestos\* ( generalmente tienen un sistema altamente no iónico y alcalinidad mediana relativamente); líquidos compuestos\* ( tienen alcalinidad más elevada y pueden ser divididos además en categorías, de acuerdo a su contenido de fosfato) o detergentes líquidos que contienen ablandadores de tejidos (8).

° Producto compuesto: Este término será aplicado a productos de lavandería líquidos o en polvo que contengan dentro de su formulación polifosfato de sodio, compuesto que al ser agregado, incrementa la acción limpiadora o ablandadora .

Producto no compuesto: Término referido a productos de lavandería líquidos o en polvo que no contienen en su formulación polifosfato de sodio.

Las enzimas pueden ser formuladas dentro de productos no compuestos con un contenido de agua entre 40 y 60%.

Los líquidos que contienen polifosfatos generalmente no son una matriz estable para las enzimas, debido principalmente al secuestro de los cationes divalentes necesarios para la estabilidad de las moléculas de enzima en solución.

Un segundo factor que afecta a la baja estabilidad de las enzimas en los detergentes líquidos compuestos, es la elevada alcalinidad de la formulación.

Este último factor , no es tan crítico para la estabilidad enzimática, ya que es posible moderar el grado de alcalinidad y seleccionar a la enzima detergente alcalina apropiada.

Las enzimas no son estables en líquidos que contienen ablandadores de tejidos orgánicos, debido a la reacción del ablandador catiónico con la enzima cuando se exponen en solución por períodos extendidos de tiempo (8).

Los productos líquidos ( acuosos ) pre-lavadores, pueden aprovechar las propiedades de disolución de manchas de las enzimas detergentes, con la condición de que el contenido total de agua sea menor al 60% , debido a los requerimientos de las enzimas para su estabilidad cuando están en solución por períodos largos de tiempo.

Las enzimas no deben aplicarse en productos en aerosol debido a la posibilidad de inhalación de éstas. Las enzimas no son compatibles con compuestos de cloro, tales como hipocloritos y cianuratos. La acción de la Alcalasa en una solución de hipoclorito muestra inactivación rápida de la proteasa después de 5 minutos a 100°F ( 38°C ) con aproximadamente 2 ppm de cloro disponible.

En el caso de compuestos de peróxido, las enzimas detergentes exhiben compatibilidad cuando se incorporan en granulados. Sin embargo, en productos líquidos la enzima se deteriora y pierde actividad cuando se almacena por periodos largos (8).

#### Maxatasa y Maxacal

Durante los años setentas tuvieron lugar severos cambios en la formulación de detergentes de lavandería de servicio pesado, la reducción en el contenido de tripolifosfato de sodio (STP) es un ejemplo notable. El reemplazo de STP por diferentes constituyentes dio como resultado jabonaduras con valores incrementados de pH (por arriba de 10 y aún mayores). Otro gran cambio fue el desarrollo de detergentes líquidos de lavandería compuestos y no compuestos, inicialmente en Estados Unidos y posteriormente en Europa en los inicios de los años ochentas. Además, la tendencia hacia temperaturas más bajas de lavado, inicialmente causada por la popularidad de los tejidos sintéticos y después por el ahorro en el consumo doméstico de energía, fue otro cambio importante a considerar en la selección de enzimas para detergentes de lavandería.



La reacción de los fabricantes de enzimas detergentes a los cambios anteriormente mencionados, fue el desarrollo de una proteasa alcalina de serina llamada comercialmente Maxatasa y de una enzima proteolítica altamente alcalina llamada comercialmente Maxacal, disponibles para su aplicación en detergentes líquidos como preparaciones líquidas estables (8).

Ambas, Maxatasa y Maxacal, han servido para perfeccionar significativamente el funcionamiento de los detergentes de Estados Unidos aún a temperaturas tan bajas como 70°F ( 21°C ) (17).

#### Cambios en condiciones de lavado.

Dos grandes tendencias en el mercado de productos de lavandería han llamado la atención de los productores de enzimas:

1. Una tendencia hacia temperaturas más bajas de lavado.
2. Un cambio en la composición de detergentes de lavandería.

#### Temperatura más baja de lavado:

Este cambio hacia temperaturas más bajas de lavado es por un lado, el resultado del creciente uso de fibras sintéticas y tejidos tejidos y por otro lado, de la conservación de energía.

En 1984, en Europa Occidental se esperaba que decreciera el promedio de la temperatura de lavado durante los 5 años próximos como se observa en la tabla 9 (9).

TABLA 9. Temperaturas de lavado en Europa Occidental

| Temperatura<br>aproximada | N de cargas de lavado |             |
|---------------------------|-----------------------|-------------|
|                           | 1980                  | 1985/1990 * |
| 90°C (195°F)              | 40-50                 | 20-25       |
| 60°C (140°F)              | 30-35                 | +/-50       |
| < 40°C (105°F)            | 15-20                 | 25-30       |

\* estimado. (17).

En Estados Unidos los diez años anteriores a 1985 fueron testigos de un cambio en la temperatura del agua de lavado de caliente a tibia.

Entre 1985 y 1990 se esperaba que el lavado a ebullición se redujera a la mitad. Se esperaba también que alrededor de 25 a 30% de los lavados serían llevados a cabo a temperaturas arriba de 40°C (17).

La tabla 10 muestra que para 1985 se estimaba que el porcentaje de cargas de lavado utilizando agua caliente se reduciría a la mitad, mientras que el porcentaje de cargas utilizando agua fría se incrementaría proporcionalmente (9).

TABLA 10. Temperaturas de lavado en Estados Unidos

| Temperatura del<br>agua      | N de cargas de lavado |        |
|------------------------------|-----------------------|--------|
|                              | 1980                  | 1985 * |
| Caliente (50-55°C/120-130°F) | 20                    | 10     |
| Tibia (30-40°C/ 85-105°F)    | 60                    | 60     |
| Fría (15-30°C/ 60-85 °F)     | 20                    | 30     |

\* estimado (8,9,17).

Cambios en la composición de las formulaciones detergentes:

Los mayores cambios en la composición de los detergentes de lavandería están relacionados con: a) La sustitución de fosfatos y b) El desarrollo de detergentes líquidos.

a) Sustitución de fosfatos.

Las consideraciones ambientales llevaron al reemplazo parcial o completo de fosfatos por otros agentes secuestrantes. Un sistema comúnmente empleado en detergentes sin fosfatos es una mezcla de carbonato y silicato. Las zeolitas ahora juegan un papel importante en las formulaciones detergentes. En Europa Occidental la situación con la consideración de usar fosfatos difiere de un país a otro como se muestra en la tabla 11 (10).

TABLA 11. Legislación de fosfatos en Europa Occidental

| País         | Concentración de fosfatos aceptada   |
|--------------|--|
| Alemania     | contenido de fosfatos max. 28% (STP) 1981<br>contenido de fosfatos max. 22% (STP) 1984 |
| Países Bajos | reducción de niveles de fosfato a 20% (STP) (no pre-escrito legalmente) 1983.          |
| Suecia       | reemplazamiento voluntario de fosfato a NTA.   |
| Noruega      | nivel de fosfato max. 5% (STP).  |
| Suiza        | contenido de fosfatos max. 28% (STP).  |
| Austria      | sigue el ejemplo de Alemania.  |

(9).

Aproximadamente en 40% del mercado de detergentes de lavandería en Europa Occidental, está tomando lugar una reducción en el nivel de fosfatos, voluntario o exigido

por la legislación. La situación no difiere mucho de la de Estados Unidos donde aproximadamente en 40% del mercado de detergentes se venden productos sin fosfatos. Esto se debe a que en 22% del mercado la legislación prohíbe el uso de fosfatos (8).

Como consecuencia del cambio en la composición de los detergentes , el pH de las soluciones de lavado y las jabonaduras, mostraron un marcado incremento de 0.3 a 0.5 unidades de valores de pH arriba de 10 (11).

#### b) Desarrollo de los detergentes líquidos.

Los cambios más dramáticos en la composición de los detergentes de lavandería se encuentran en el desarrollo de los detergentes líquidos. Especialmente en Europa Occidental los primeros detergentes líquidos datan de 1981. En Estados Unidos los detergentes líquidos habían sido introducidos unos diez años antes.

La composición de un detergente líquido difiere completamente de la de un detergente en polvo. En los líquidos, la cantidad total de sustancias activas de lavado (agentes no iónicos , aniónicos y jabón ) es mucho mayor , pero las cantidades de polifosfatos, secuestrantes y agentes blanqueadores son menores que en detergentes en polvo (8).

Efectos de los cambios en las condiciones de lavado sobre el funcionamiento de Maxatasa y Maxacal (PB-02) (8,17).

#### Materiales y métodos:

##### Enzimas.

Las enzimas que se emplearon para medir el efecto de los cambios en las condiciones de lavado fueron, la

Maxatasa , proteasa bacteriana alcalina de Gist-Brocades y Maxacal, proteasa bacteriana altamente alcalina , especialmente seleccionada de Gist-Brocades, previamente llamada PB-92. Las enzimas son comercialmente disponibles como encapsulados libres de polvo y en forma líquida.

#### Determinación de la actividad proteolítica.

La actividad proteolítica de Maxatasa y Maxacal se ha determinado por el método Delft a pH 8.5 y 10 respectivamente, utilizando caseína como sustrato en presencia de tripolifosfato a 40°C por 40 minutos, después de los cuales la actividad enzimática se detiene añadiendo ácido tricloroacético. Se lee la densidad óptica después de filtración a 275 nm.

La actividad enzimática ensayada a pH 8.5 se expresa como unidades Delft (U.D.), o en el caso de incubación a pH 10, como unidades alcalinas Delft (U.A.D.). Estas son unidades arbitrarias que se han definido como sigue:

Si 1 ml de una solución al 2% de una preparación de enzima, da una diferencia en densidad óptica de 0.400 entre la muestra y el blanco bajo las condiciones de prueba mencionadas, la preparación enzimática tiene una actividad proteolítica de 1000 U.D. ó U.A.D. por gramo.

#### Detergentes.

Se han utilizado detergentes de lavandería comercialmente disponibles en Estados Unidos y en Europa, con o sin fosfatos y como polvos o líquidos incluyendo un producto de pre-remojo fabricado en Estados Unidos.

Los detergentes son disueltos en agua de la llave a 15 grados, (dureza alemana) antes de ser utilizados.

#### Ropa de prueba.

Como material de prueba se ha utilizado algodón EMPA 116 manchado homogéneamente con sangre (hemoglobina).

leño (caseína) y carbón negro (indicador de reflexión).

Generalmente se ha aceptado, que los efectos observados sobre esta ropa de prueba, se correlacionan bien con los resultados obtenidos en la práctica.

Pruebas de lavado.

Pruebas de lavado en Estados Unidos:

Las pruebas de lavado de Estados Unidos han sido llevadas a cabo en un Terg-o-Tometer simulando una máquina lavadora doméstica del tipo de agitador. El Terg-o-Tometer contiene cuatro recipientes de boca ancha de un litro colocados en un baño de agua termocontrolado. Durante el lavado se alcanza una agitación vigorosa dada por cuatro dispositivos de agitación (uno por vaso), a 100rpm. Cada recipiente contiene dos piezas de ropa de prueba EMPA 116 de 10 por 12 cm. cada una.

Pruebas de lavado en Europa Occidental:

Estas se llevaron a cabo en un Launder-ometer. Esta máquina de lavado de laboratorio consiste en un baño de agua termocontrolado, en el cual se coloca un rotor (42rpm) que contiene ocho recipientes de 500 ml. cada uno, simulando así, una máquina lavadora doméstica del tipo de tambor. Cada recipiente se llena con 375 ml. de jabonadura, conteniendo cada uno una pieza de ropa de prueba EMPA 116 de 5 por 7.5 cm. cada una.

Prueba de lavado de Gist-Brocades:

Estas pruebas de lavado se llevan a cabo en frascos cónicos conteniendo 250 ml. de jabonadura y mantenidos en un baño de agua a 45°C. por 60 min. bajo agitación ocasional. En cada frasco se coloca una pieza de ropa de prueba EMPA 116 de 5 por 5 cm. cada una. Este tipo de prueba de lavado simula un pre-remojo.

### Medición de reflexión.

Después de la prueba de lavado, las piezas de ropa de prueba se enjuagan con agua aproximadamente 15 min. y se secan entre papel filtro. La blancura de ambos lados de las muestras se mide por medio de un refractómetro para sólidos.

En las pruebas de lavado que se llevan a cabo en el Terg-o-Tometer la blancura se mide en las cuatro esquinas de ambos lados de las muestras.

El valor promedio de las mediciones se expresa como un porcentaje de la reflexión de la ropa de prueba lavada.

El valor de reflexión de esta pieza de ropa especialmente tratada (70%, cuando se mide contra óxido de magnesio) se fija arbitrariamente a 100%. Las gráficas se obtienen generalmente trazando la cantidad de enzima expresada en U.D. ó U.A.D. por gramo de detergente contra un porcentaje de reflexión (B.17).

### Propiedades relevantes de las enzimas.

Las propiedades de las enzimas detergentes que determinan su funcionamiento en productos de lavandería son: dependencia del pH, de la temperatura, una relativa independencia de iones Ca y Mg y, finalmente compatibilidad con surfactantes y constituyentes secuestrantes.

La Maxatasa y Maxacal de Gist-Brocades son proteasas de serina del tipo de endopeptidasas, lo cual significa que forman principalmente péptidos y no aminoácidos de las proteínas hidrolizadas. Esta es la propiedad que hace a estas enzimas adecuadas para remover manchas de origen proteínico (8).

### Perfil de pH.

La Maxatasa y Maxacal tienen diferentes perfiles de

pH. como se muestra en las figuras 7 y 8 en las cuales se ha trazado el porcentaje de actividad máxima contra el pH para Maxatasa y Maxacal respectivamente. Los valores fueron obtenidos de acuerdo con el método Delft utilizando caseína como sustrato e incubando mínimo 40 min. a 40°C (12, 13).

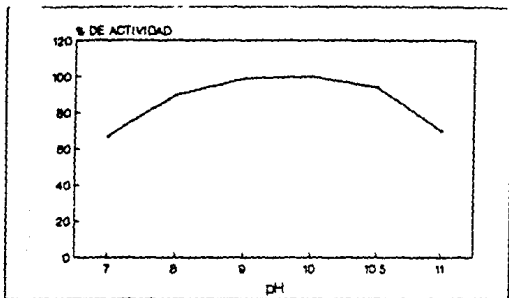


FIG. 7 Perfil de pH de la proteasa alcalina Maxatasa. (Método Delft: 40°C, 40 min.; caseína) (8).

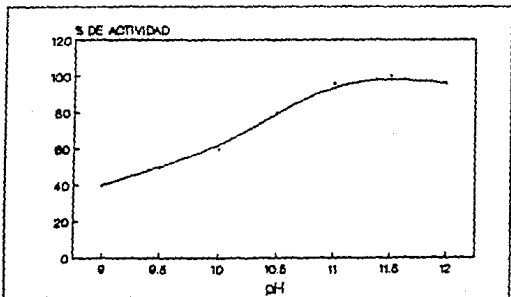


FIG. 8 Perfil de pH de la proteasa altamente alcalina Maxacal. (Método Delft: 40°C, 40 min.; caseína) (8).



Los rangos de pH óptimo para Maxatasa están entre 9.5 y 10.5, mientras que Maxacal tiene pH óptimo de casi 11. Sin embargo, ha sido encontrado que bajo condiciones de lavado, Maxacal da buenos resultados a un rango de pH de 8 a 11, mientras Maxatasa funciona bastante bien a valores de pH arriba de 10.5 (17). Esto se ilustra en la figura 9.

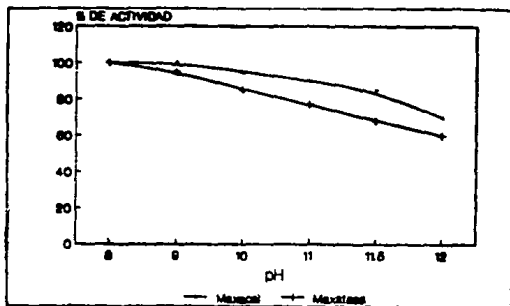


FIG. 9 Perfiles de pH de Maxatasa y Maxacal bajo condiciones de lavado. (prueba de lavado, de Gist-Brocades: 45°C; 60 min.; ENPA 150; 4 g/l de detergente de servicio pesado europeo; 2000 U. A. D. por gramo de detergente) (8).

La prueba de lavado se llevó a cabo a 45°C por mínimo una hora. Sobre el eje vertical es trazado el porcentaje de reflexión contra el pH en el eje horizontal.

Lo anterior indica que Maxacal comparada con Maxatasa es más adecuada para su uso en formulaciones de detergentes altamente alcalinas.

Puede notarse que Gist-Brocades seleccionó a esta enzima proteolítica alcalina para detergentes con los cuales se producen jabonaduras con valores de pH más alcalinos debido a la sustitución del tripolifosfato o

parte de éste por otros secuestrantes.

#### Perfil de Temperatura.

Como se ha mencionado anteriormente, el promedio en la temperatura de lavado está decreciendo. En la figura 10 se presentan los perfiles de temperatura de Maxatasa y Maxacal a pH 8.5 utilizando el método Delft para la determinación de la actividad enzimática.

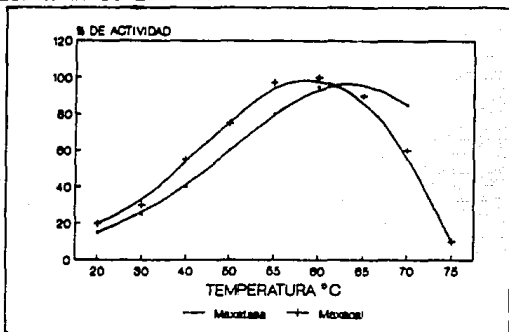


FIG.10 Perfiles de temperatura de Maxatasa y Maxacal. (Método Delft: 40 min; pH 8.5; caseína) (8).

La hidrólisis enzimática de la proteína se activa por el incremento en la temperatura, hasta que se alcanza la actividad óptima. Más allá de esta temperatura la actividad enzimática decrece rápidamente debido a la inactivación por calor de la enzima.

Como se muestra en la figura 10 la temperatura óptima de Maxacal está en el rango entre 55 y 60°C. Este parece ser un poco más bajo que el de Maxatasa.

A temperaturas menores Maxacal exhibe en forma

relativa) ligeramente más actividad que Maxatasa (8).

#### Funcionamiento enzimático durante el lavado.

En los laboratorios de fabricantes de enzimas se determina el efecto de la adición de enzimas proteolíticas a detergentes en pruebas de lavado utilizando prendas de prueba manchadas artificialmente, como EMPA 116. Los resultados de estas pruebas varían de acuerdo con el método de lavado, de los cuales se han presentado tres anteriormente. En estas pruebas de lavado, la presencia de iones Ca y Mg es estimada mediante la disolución de detergentes en agua de la llave (sintética de 15°GH). Estos tipos de pruebas de lavado producen una percepción de la contribución de las enzimas en la detergencia bajo circunstancias prácticas.

La figura 11 ilustra los efectos de diferentes temperaturas y tiempos de lavado sobre el funcionamiento de Maxatasa en combinación con un detergente de servicio pesado sin fosfatos de fabricación americana en pruebas llevadas a cabo en Terg-o-Tometer.

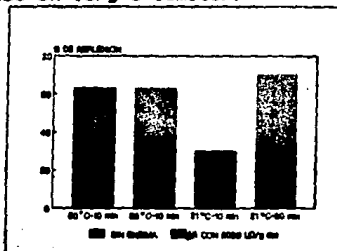


FIG.11 Maxatasa: efecto de las condiciones de lavado sobre los resultados. (EMPA 116; 2g/l de detergente) (8).

El lavado en frío utilizando agua a 21°C por 10 min. da resultados insatisfactorios como se presenta en la tercera columna de ésta gráfica. Sin embargo, los resultados mejoran prolongando el ciclo de lavado a 30 min. como se muestra en la cuarta columna de ésta gráfica.

Por otro lado, es evidente que el resultado de la columna cuatro de lavado con agua fría por 30 min. es superior a los mostrados con diferentes condiciones.

Una prueba similar con Maxacal en lugar de Maxatasa dio resultados comparables, la única excepción fue que a 21°C por 10 min. la contribución al lavado de Maxacal a la detergencia fue 25%, un valor considerablemente mayor que el obtenido con Maxatasa bajo las mismas condiciones. Este resultado indica que Maxacal es conveniente para perfeccionar la detergencia a bajas y moderadas temperaturas.

En la figura 12 (segunda columna) se presenta la contribución de Maxatasa a la detergencia en 18 horas de pre-remojo a temperatura ambiente en comparación con agua de lavado fría y caliente.

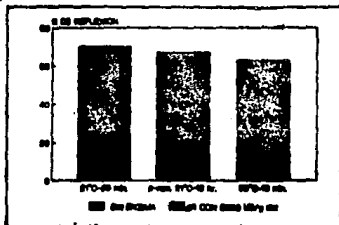


FIG.12 Maxatasa: pre-remojo vs. lavado con agua fría/caliente en Estados Unidos (CEMPA 116; 2 g/l de detergente de servicio pesado sin fosfato) (8).

El resultado de lavado haciendo un pre-remojo con un detergente enzimático está entre los resultados de lavado con agua fría durante 30 min., (la columna de la izquierda), y los resultados de lavado con agua caliente durante 10 min. (la columna de la derecha). De estos experimentos se concluyó que el pre-remojo con un detergente que contiene Maxatasa ofrece una alternativa para obtener buenos resultados de lavado a bajas temperaturas.

En la figura 13 se muestra la influencia de la eliminación de fosfatos en un detergente de servicio pesado de Estados Unidos, en la cual se presenta la ejecución de lavado bajo diferentes condiciones.

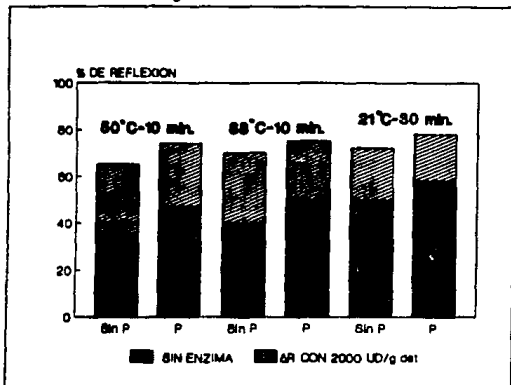


FIG.13 Maxatasa: Influencia de fosfatos sobre los resultados de lavado. (Terg-o-Tometer, EMPA 110, 2 g/l de detergente) (8).

Como se puede observar la reducción en la ejecución del lavado en un detergente sin fosfatos comparada con la de un detergente que contiene fosfatos puede ser compensada con la adición de Maxatasa. Con la utilización de Maxacal se obtuvieron resultados similares (8).

En la figura 14 se presenta la diferencia entre las contribuciones de Maxatasa y Maxacal a la detergencia de un detergente de servicio pesado altamente alcalino y sin fosfatos en una prueba de lavado en Terg-o-Tometer a 38°C por 10 min.

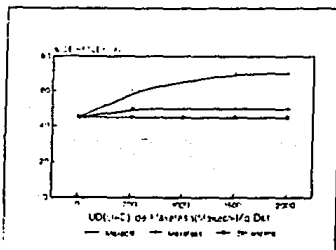


FIG.14 Efectos de Maxatasa/Maxacal sobre los resultados de lavado (2 g/l de detergente, pH 10.2, EMPA 116) (8).

En este experimento el pH de las jabonaduras fue casi 10.2, mientras que en las pruebas de lavado discutidas anteriormente el valor de pH fue alrededor de 9.6-9.7. Como ha sido mostrado, la contribución de Maxacal a la ejecución de lavado es mucho mayor que la de Maxatasa. Esto también se confirma en la figura 9 (8,17).

En las siguientes dos ilustraciones se presenta la compatibilidad de Maxatasa y Maxacal con detergentes

líquidos de lavandería durante una prueba de lavado.

La figura 15 muestra los resultados de pruebas de lavado de Launder-ometer (una hora, 45°C.) en las cuales se agregó Maxatasa a un detergente de lavandería líquido de Europa Occidental.

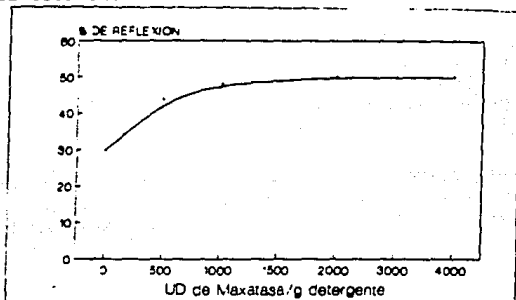


FIG.15 Resultados de la adición de Maxatasa a un detergente líquido de servicio pesado. (3.5 g/l de detergente, EMPA 116, 45°C., 60 min.) (8).

Se comprobó que es suficiente la adición de 3000 a 4000 U.D./g de detergente para alcanzar el valor máximo de reflexión, el cual es 70% mayor que aquel obtenido sin la adición de la enzima (8).

La figura 16 proporciona una de las ventajas de los detergentes líquidos sobre los detergentes en polvo llamada "pre-manchado". En este caso las prendas de prueba son pre-manchadas con detergente y después lavadas utilizando el mismo detergente en menor cantidad, obteniendo así excelentes resultados en las pruebas en Terg-o-Tometer con un detergente líquido conteniendo 3000 U.A.D. de Maxacal por gramo (8).

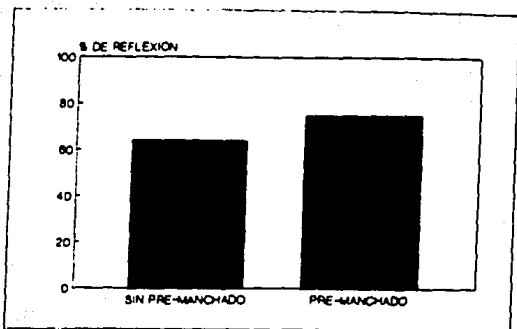


FIG.18 Resultados de la adición de Maxacal a un detergente líquido. Efecto de pre-manchado. (En ambos casos la cantidad total de detergente fue 3.5 g/l. EMPA 118, 38°C., 10 min., 3000 U.A.D. Maxacal/g detergente.) (8).

#### $\alpha$ - Amilasa

En detergentes enzimáticos a base de  $\alpha$ -amilasa que se emplean para máquinas lavadoras de vajillas, es necesario que ésta enzima sea resistente a medios alcalinos y tenga moderada resistencia al calor (arriba de 80°C aproximadamente). La enzima también debe ser capaz de resistir la presencia del agente blanqueador (generalmente un compuesto que contiene cloro) que se encuentra en muchos detergentes lava vajillas. Desafortunadamente la enzima ideal no es aún disponible, la más cercana a estas características es la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Termamyl, de Novo Industri).

Los perfiles de temperatura y pH de ésta enzima se muestran en las figuras 17 y 18 (5).



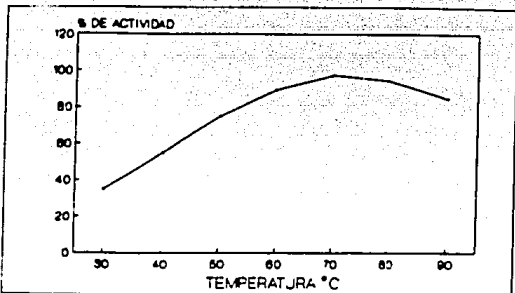


FIG. 17 Actividad de Termamyl a diferentes temperaturas y en presencia de STP. (Método de análisis: Novo. pH=9.1. Concentración de STP= 2g/l, agua destilada) (5).

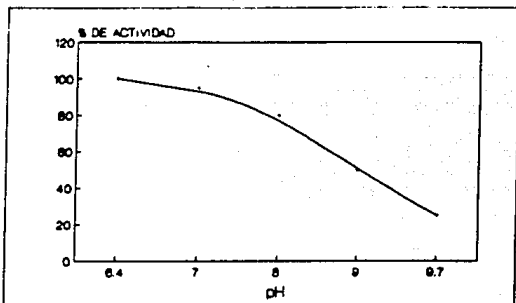


FIG. 18 Actividad de Termamyl a diferentes valores de pH y en presencia de STP. (Método de análisis: Novo. Temperatura=60°C. Concentración de STP=2g/l, agua destilada) (5).

Se puede observar que, mientras la enzima tolera muy bien el calor, su resistencia a la alcalinidad es sólo moderada. Se puede agregar que el cloro activo podría destruir la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa casi instantáneamente (5).

Actualmente en un porcentaje relativamente pequeño del mercado de detergentes las enzimas amilolíticas están ya en uso. Algunos de los polvos detergentes contienen mezclas de Maxatasa y una  $\alpha$ -amilasa bacteriana (Amilasa THC), mientras que Maxamyl WL puede utilizarse en detergentes líquidos dando como resultado un mejoramiento en la detergencia (8).

### Lipasas

Comparados con los detergentes líquidos, los polvos que contienen lipasas muestran un pobre funcionamiento sobre la eliminación de manchas de tipo grasoso. Esto se debe principalmente al tipo y a la cantidad de surfactantes utilizados.

Sin embargo, los detergentes líquidos también muestran un funcionamiento sub óptimo sobre sebos y aceites alimenticios. Desafortunadamente estos problemas se convierten en más serios cuando las temperaturas de lavado descienden.

No obstante, el uso de lipasas en detergentes tiene grandes posibilidades (8,10). Sin embargo, las lipasas conocidas comúnmente son bastante inestables en formulaciones detergentes y jabonaduras (8).

Se ha demostrado que las enzimas lipolíticas son capaces de remover uno, dos y aún los tres ácidos grasos de las moléculas de triglicéridos de grasas y aceites vegetales y animales.

Un ejemplo reciente relacionado con la transformación enzimática de lípidos, es una enzima aislada por Novo Industri del páncreas de animales: fosfolipasa A-2. Esta enzima selectiva remueve el segundo éster de ácido graso de la estructura del triglicérido en el fosfolípido

lecitina. Se encontró que el producto de reacción perfecciona las propiedades surfactantes (6).

La tecnología de transformación enzimática de lípidos ofrece un potencial real de estudio actualmente.

### IV.3 Producción de enzimas proteolíticas para detergentes.

La producción industrial de enzimas proteolíticas purificadas y estandarizadas comenzó en 1874, cuando Chr. Hansen vendió en Copenhague su famosa preparación de renina, la cual desde entonces ha tenido una posición dominante en el mercado de renina. La utilización de proteasas industriales desarrolladas uniformemente hasta casi un siglo después, alrededor de 1960, ha tenido un gran éxito en la introducción de proteasas microbianas dentro de los detergentes (45).

Las proteasas industriales son preparadas a partir de fuentes animales, vegetales y microbianas. Aunque el desarrollo en los últimos años ha sido principalmente dentro de las proteasas microbianas, las proteasas animales y vegetales son aún muy importantes.

#### Producción de proteasas microbianas

Los microorganismos son la fuente ideal para la producción de enzimas industriales. Ellos pueden producirse en cantidades ilimitadas, los métodos de producción son relativamente simples y bien desarrollados y pueden ser producidas proteasas microbianas con propiedades ampliamente diferentes.

El interés que la industria ha tenido en el desarrollo de proteasas microbianas se refleja en el hecho

de que la producción de proteasas por casi un ciento de especies diferentes está cubierta por una o más patentes. La comercialización ha sido concentrada a unos cuantos géneros : *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Mucor* y algunos géneros del macrofungi.

Los microorganismos más importantes se ilustran en la tabla 12.

TABLA 12. Microorganismos para la producción comercial de proteasas

| Género               | Especies  |
|----------------------|---|
| <i>Bacillus</i>      | <i>subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i> ,<br><i>amyloliquefaciens</i> , <i>licheniformis</i> ,<br><i>subtilis</i> var. <i>thermoproteolyticus</i><br>, especies alcalofílicas. |
| <i>Streptococcus</i> | <i>haemolytic</i> sp.   |
| <i>Streptomyces</i>  | <i>fradiae</i> , <i>griseus</i> , <i>rectus</i> .   |
| <i>Aspergillus</i>   | <i>flavus-oryzae</i> , <i>niger</i> .   |
| <i>Mucor</i>         | <i>pusillus</i> , <i>miehei</i> .   |
| <i>Endothia</i>      | <i>parasitica</i> .   |
| <i>Trametes</i>      | <i>sanguinea</i>  |

(45).

#### Proteasas de especies de *Bacillus*.

Muchas especies del género *Bacillus* producen proteasas extracelulares durante el crecimiento.

Las especies proteolíticas de *Bacillus* forman dos tipos de proteasas, una proteasa neutra, la cual requiere un ion metálico para ser activa y es inhibida por EDTA y una proteasa alcalina, que contiene serina en su sitio

activo y es inhibida por diisopropilfluorofosfato (DFP) pero no por EDTA .

Desafortunadamente en muchos de los trabajos hechos sobre las proteasas de *Bacillus*, no se incluye una clasificación propia del microorganismo utilizado. Esto ha causado mucha confusión, especialmente con lo concerniente a las proteasas producidas por *B. subtilis* y microorganismos relacionados. Una de las razones ha sido la antigua definición poco clara de las especies.

Con base en la clasificación hecha por Smith, Gordon y Clark (1952) y Welker, Campbell (1967) el grupo *B. subtilis* comprende ahora: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* .

Dos de las más importantes proteasas alcalinas, Subtilisina Novo y Subtilisina BPN son producidas por *B. amyloliquefaciens*. La Subtilisina Carlsberg, la cual es el componente activo de la preparación enzimática comercial Alcalasa, es producida por *B. licheniformis* .

La proteasa alcalina de *B. pumilus* está íntimamente relacionada con Subtilisina Carlsberg y la proteasa alcalina producida por *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* tiene propiedades íntimamente relacionadas con Subtilisina Novo (48,49).

#### 1. Selección de la cepa.

Las cepas de *Bacillus* productoras de proteasa pueden aislarse fácilmente. Una muestra de suelo pasteurizada se rocía sobre un medio de agar conteniendo una dispersión de una proteína insoluble y se recogen las colonias que muestran zonas claras alrededor por la hidrólisis de la proteína. El método no puede utilizarse para encontrar cepas altamente productoras porque no existe siempre una correlación entre el diámetro de la zona y la habilidad para producir enzima en un cultivo sumergido.

Las cepas de *B. licheniformis*, por ejemplo, producen zonas muy angostas de hidrólisis de caseína aunque ellas pueden ser extremadamente buenas productoras de enzima cuando crecen bajo condiciones sumergidas (46).

El método de aislamiento puede perfeccionarse mediante la utilización de condiciones especiales en el medio de aislamiento. Si por ejemplo, es utilizado un medio con un valor de pH arriba de 9 serán obtenidas especies alcalofílicas de *Bacillus* (89).

Estas bacterias son comunes en el suelo, pero ellas no podrían crecer sobre un medio normal con un pH abajo de 7. Estas producen proteasas particularmente útiles a elevados valores de pH.

## 2. Aprovechamiento de la cepa.

La finalidad de la microbiología industrial es obtener cepas con productividad lo más elevada posible.

Las cepas silvestres (no cultivadas), generalmente producen muy poca cantidad de enzima como para ser utilizadas en procesos comerciales. Sin embargo, en muchos casos es posible obtener un incremento substancial en la producción por una simple selección en donde el cultivo se rocía sobre un medio adecuado, y las colonias se recuperan individualmente y se prueban en matraces con medio. El método puede mejorarse utilizando mutágenos y técnicas especiales para detectar a los mutantes útiles.

Una forma valiosa de aprovechar una cepa es por el aislamiento de mutantes esporulados. Tales mutantes pueden carecer completamente de proteasa alcalina, la cual es incluida en la secuencia de esporulación. Esto se ha utilizado en el desarrollo de un mutante de *B. subtilis* el cual produce proteasa neutra solamente (50).

Los mutantes esporulados para la producción de proteasa alcalina pueden tener producciones de enzima

mayores que las de la cepa patrón. Se han reportado en este caso aprovechamientos de arriba del 500% (35).

### 3. Fermentación.

La fermentación requiere inicialmente del aislamiento de una cepa propia de bacteria, después de la selección del medio de cultivo más eficiente y sus condiciones. El cultivo se inicia en frascos de laboratorio o fermentadores seguido por la transferencia a fermentadores en planta piloto (89,120).

El medio debe contener una fuente de proteínas, carbohidratos y minerales convenientes para este fin.

Un medio típico para la producción de enzima es el siguiente: Almidón de papa 3% , harina de soya 2.5% , grano de cebada 8% ,  $\text{CaCO}_3$  0.4% , aceite de soya 0.4% , y agua de la llave 85.7% (98).

La bacteria se cultiva en condiciones estrictamente asepticas en un equipo convencional para fermentación sumergida. En la figura 19 se presenta un diagrama de flujo del proceso de fermentación.

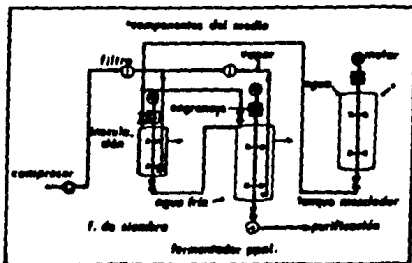


FIG.19 Proceso para fermentación sumergida (45,98).

Los requerimientos del equipo incluyen un tanque mezclador del medio de cultivo de acero inoxidable, un fermentador de siembra o inicial y un fermentador principal.

Los tanques de fermentación son totalmente cerrados y equipados con líneas de aire, agitadores y cubrimientos o serpentines para mantener la temperatura constante. Generalmente también se hace un acondicionamiento para el control automático del pH y de la espuma.

Ya que el éxito de la fermentación depende de la ausencia de microorganismos extraños, es importante que el aire introducido se esterilice pasándolo a través de cojines o filtros.

El proceso de fermentación puede describirse como sigue:

Todos los ingredientes del medio se combinan con agua de la llave en el tanque de mezclado, se transfieren al recipiente de fermentación y se calientan al menos a  $115^{\circ}\text{C}$  por 1 o 2 horas por inyección de vapor. Después el medio se enfría a  $30^{\circ}\text{C}$  aproximadamente (98).

La cepa productora pura, la cual ha sido almacenada en forma de liofilizado, se inocula dentro del medio nutriente en forma líquida o sólida. Después de 1 o 2 días de incubación a temperatura adecuada, el crecimiento se transfiere por la puerta de inoculación al fermentador inicial o de siembra, el cual contiene un medio esterilizado de aproximadamente la misma composición de aquel del fermentador principal.

El medio se aerea por un flujo de aire filtrado a través de rociadoras en el fondo del fermentador a una velocidad de aproximadamente un volumen de aire por volumen de medio por minuto. La distribución del aire se mejora además por agitación vigorosa del contenido del



fermentador.

La temperatura se controla exactamente a 37°C. El número de microorganismos al tiempo de la inoculación es generalmente 10<sup>6</sup> por ml. Después de casi 10 generaciones el contenido del fermentador inicial se transfiere al fermentador principal. En éste continua el crecimiento bajo aereación y agitación hasta que la producción de enzima se detenga, generalmente después de 48 a 96 horas (45).

Durante la fermentación se toman muestras y se determina su contenido de enzima (5).

La formación de espuma se controla por la adición de pequeñas cantidades de agentes antiespumantes como poliglicol.

Podría utilizarse un control de pH pero generalmente no es necesario si la capacidad reguladora del medio es razonablemente elevada.

La composición del medio es importante para el rendimiento. Muchas especies de *Bacillus* utilizadas para la producción de proteasas pueden crecer sobre medio sintético, pero la producción de la enzima sería baja en tal medio. Por lo tanto se utilizan siempre en los medios comerciales fuentes de proteína que se seleccionan de acuerdo a su precio principalmente. Los iones de amonio y los aminoácidos libres reducen la producción de proteasa y por lo tanto se evita su inclusión. En la tabla 13 se enlistan algunas fuentes de proteína.

TABLA 13. Fuentes de proteína para la producción de proteasas. (Con un contenido de proteína aproximado en % )

| <u>Proteínas vegetales</u>   | %     |
|------------------------------|-------|
| Harina de semilla de algodón | 50    |
| Harina de cacahuete          | 60    |
| Harina de soya               | 50    |
| Maiz                         | 10    |
| Gluten de maiz               | 50    |
| Maiz remojado                | 25    |
| Salvado de trigo             | 15    |
| Salvado de arroz             | 15    |
| <u>Proteínas animales</u>    |       |
| Caseína                      | 90    |
| Suero de leche               | 35    |
| Lactoalbúmina                | 80    |
| Hidrolizado de carne         | 50-80 |
| Harina de pescado            | 70-80 |
| Albúmina sanguínea           | 80    |
| <u>Proteínas microbianas</u> |       |
| Extracto de levadura         | 50    |
| Destilados secos solubles    | 30-40 |
| Levadura de forraje          | 50-60 |
| "Levadura de petróleo"       | 50-60 |

(51).

Como fuente de energía se utilizan carbohidratos , tales como almidón, hidrolizado de almidón, dextrosa o sacarosa. La utilización de un ácido orgánico como fuente principal de energía ha sido reportada por Niwa (51).

El medio puede contener además sales tales como fosfato, se ha comprobado que la adición de boratos reduce la formación de baba y mejora los rendimientos (52).

El balance correcto entre carbohidrato y proteína es importante para la producción y la economía del proceso, aunque la proteína puede estar presente en elevada concentración, el carbohidrato no debe estar en exceso. Una forma conveniente de lograr el equilibrio entre los nutrientes es añadir carbohidrato durante la fermentación de modo que sólo esté presente en el medio en todo tiempo de la fermentación una baja concentración de éste. Esta técnica fue utilizada por Guntelberg en su trabajo inicial sobre Subtilisina Carlsberg, y se describió recientemente para un proceso industrial en donde se mantiene la concentración de carbohidrato en el medio entre 0.4% y 1.0% y se reporta un mejoramiento en la producción de más de 100% (53).

La producción continua de proteasa a nivel laboratorio se ha descrito por Jensen, quien utilizó un mutante asporogénico en una fermentación de dos etapas. No se han dado reportes todavía de la producción continua de proteasa a nivel comercial (54).

#### 4. Purificación.

Cuando la actividad enzimática en el medio de fermentación alcanza su máximo se detiene la aereación y la agitación y el caldo se enfría rápidamente hasta casi 4°C para prevenir la contaminación microbiana. En la primera parte del proceso de purificación todas las partículas se separan del caldo por centrifugación y filtración ( en ésta fase las bacterias y la masa insoluble de los componentes del sustrato son removidos ). Este proceso puede ser promovido por precipitación de sales de calcio y fosfatos en el caldo, por la utilización de floculantes tales como compuestos de iminas de polietileno .

Posteriormente se eliminan del caldo los pigmentos y

compuestos que imparten olor. Esto se hace mediante un tratamiento con carbón activado o por la adsorción de la proteasa sobre resinas intercambiadoras de iones seguida por elución (54).

Posteriormente el caldo puro se pasa a través de un filtro para bacterias y se concentra a baja temperatura, ya sea por ósmosis inversa o por evaporación al vacío.

Finalmente la proteasa se recupera utilizando precipitación por sales como sulfato de amonio o sulfato de sodio, o disolventes tales como acetona, etanol o isopropanol. El precipitado se recupera por filtración y secado a baja temperatura (45).

El contenido de enzima del precipitado se puede aislar además por un equipo de filtrado adicional y secar por secadores rotatorios al vacío o por secado por rociado en donde el polvo de enzima se muele y estandariza con sustancias tales como cloruro de sodio o sulfato de sodio, con el fin de prevenir el crecimiento de bacterias durante el proceso de recuperación. El precipitado enzimático se mantiene a la menor temperatura posible, frecuentemente menor a 5°C. Durante todo el proceso de recuperación se sigue una rutina de muestreo de actividad enzimática y cuenta bacteriana (98).

##### 5. Presentación final de la enzima.

Previo a su comercialización el producto enzimático se estandariza con un material inerte, como sal, por ejemplo. Sin embargo, una preparación como ésta es inadecuada para su manejo, ya que se facilita la formación de polvo de enzima que puede provocar alergias o intoxicaciones. Por lo que se prefiere tener preparaciones libres de polvo, en donde los gránulos de enzima son encapsulados en un surfactante no iónico-iónico (45).

Los principales métodos para obtener las preparaciones enzimáticas libres de polvo se describirán más adelante.

#### Proteasas de *Bacillus firmus*.

Aunstrup y Andresen (120) encontraron que el microorganismo *Bacillus firmus*, cepa NRS 783, cuando se cultiva bajo condiciones convenientes puede formar una enzima proteolítica cuya composición es particularmente buena para su utilización en detergentes, en donde muestra resultados sorprendentes de alto valor de limpieza a muy baja concentración.

Con el fin de producir la enzima proteolítica, *Bacillus firmus* NRS 783 se cultiva bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo que contiene carbono asimilable y nitrógeno, junto con otros nutrientes esenciales.

Las fuentes disponibles de carbono son carbohidratos tales como sacarosa, glucosa y almidón o carbohidratos contenidos en materiales como granos de cereal, malta, arroz y sorgo. La concentración de carbohidratos que se incorpora en el medio puede variar ampliamente, puede ir desde arriba de 25% hasta 1 a 5%, pero generalmente se recomienda que contenga de 8 a 10%. Los porcentajes se calculan como dextrosa (D-glucosa).

La fuente de nitrógeno en el medio puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Las fuentes adecuadas de nitrógeno inorgánico son nitratos y sales de amonio.

Entre las fuentes orgánicas de nitrógeno utilizadas regularmente en los procesos de fermentación incluyendo el cultivo de la bacteria, están la harina de soya, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, caseína, licor

remojado de maíz, extracto de levadura, urea y albúmina. Además el medio de cultivo puede contener elementos traza.

La temperatura a la cual se lleva a cabo el cultivo, generalmente está dentro del rango que se emplea para el cultivo de especies del género *Bacillus* ( 30 a 40°C ).

Ya que el cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas , es necesario hacer uso de la aereación artificial en los tanques de fermentación durante el crecimiento de la bacteria. La cantidad de aire utilizado es similar al que se utiliza en los procesos convencionales de cultivo.

Durante la ejecución del cultivo se prefieren generalmente los valores alcalinos de pH. Esto se obtiene por la adición de reguladores adecuados tales como carbonato de sodio o una mezcla de carbonato y bicarbonato de sodio después de la esterilización del medio.

Después de la fermentación , las preparaciones de enzima líquidas se producen por la remoción del material grueso del caldo o, si se desea por concentración del caldo por evaporación a baja temperatura o por ósmosis inversa. Finalmente se pueden añadir al caldo preservativos.

Las preparaciones sólidas de enzima se preparan de la purificación y/o concentración del caldo por precipitación con sales, tales como sulfato de sodio o con agua o disolventes miscibles tales como etanol o acetona; puede ser empleada también la eliminación del agua en el caldo por métodos de secado adecuados como el rociado en seco.

En el siguiente ejemplo se ilustra el método descrito:

Se cultiva a 30°C y agitación rotatoria (220 r.p.m.) una cepa de *Bacillus firmus* NRS 783 en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. conteniendo 100ml. de medio con la

siguiente composición:

| Composición del medio | g/l   |
|-----------------------|-------|
| Almidón de papa       | 40    |
| Cebada                | 100   |
| Harina de soya        | 30    |
| Cacao                 | 5     |
| Acete de soya         | 0.5   |
|                       | (120) |

Después de 8 días de incubación se determina la actividad proteolítica del cultivo, utilizando el método de hemoglobina de Anson, en donde el pH del sustrato se ajusta a un valor apropiado con hidróxido de sodio.

El almidón del medio se hidroliza con  $\alpha$ -amilasa y se esteriliza por calor a 120°C por 45 minutos. Después de la esterilización el pH del medio se ajusta a 9.7 por adición de 10% de solución 1 M de bicarbonato de sodio. Después del cultivo, la actividad enzimática del caldo se determina a pH 7.5 y se espera obtener alrededor de 50 UA/l (Unidades Anson por litro).

Villadsen y Vestberg (20) encontraron que un microorganismo del género *Bacillus* que se aisló de una muestra de agua de mar del Océano Pacífico, es capaz de producir una enzima proteolítica o mezcla de enzimas que son fuertemente activas no solo en alcalinidad elevada, sino también en presencia de perboratos y polifosfatos generalmente presentes en las composiciones detergentes.

Comparado con los géneros de la familia Bacillaceae descritos en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (21), este microorganismo es más como

*Bacillus firmus* que como ningún otro de las especies descritas, pero varía de aquel en lo que respecta a la utilización del citrato y a la hidrólisis de caseína.

Este ha sido nombrado por lo tanto, *Bacillus firmus* var. *Arosia* y se ha depositado un cultivo en la colección nacional de bacterias industriales en Aberdeen bajo el número 10557. De este modo, este proceso se caracteriza porque la cepa de *B. firmus* var. *Arosia* se fermenta bajo condiciones aeróbicas en un medio adecuado, el resultado son enzimas proteolíticas que se recuperan de la solución de fermentación.

La incubación del microorganismo puede tomar lugar en un medio de agar de soya, preferiblemente a pH 10, aunque un valor mayor o menor de pH se puede utilizar también. El periodo adecuado de incubación es de 24 horas a 37°C. La propagación posterior tiene lugar en un recipiente largo de la manera común de una fermentación aerobia sumergida, en un medio que contenga carbohidratos como lactosa, sacarosa, dextrina y almidón de papa y cebada; compuestos nitrogenados como nitratos, sales de amonio, urea, proteína de soya y caseína y fosfatos como fosfato de sodio, potasio y polifosfatos, junto con sustancias reguladoras, trazas de compuestos de metales pesados y otros compuestos comunes. El siguiente ejemplo es ilustrativo de una fermentación acuosa, medio y condiciones para propósitos de propagación.

Ejemplo 1:



| Composición del medio                | %       |
|--------------------------------------|---------|
| Centrina                             | 3.0     |
| Harina desgrasada de soya            | 5.5     |
| Sacarosa                             | 3.0     |
| Carbonato de sodio                   | 0.0     |
| Bicarbonato de sodio                 | 0.3     |
| Polifosfato de trisodio              | 0.3     |
| <b>Condiciones de fermentación</b>   |         |
| Temperatura                          | 30-40°C |
| Tiempo                               | 50-70h. |
| Aeración, vol. aire/vol. líquido/min | 1/2 .   |

La fermentación principal se puede llevar a cabo en un medio acuoso de fermentación conteniendo los mismos ingredientes del medio de propagación con la posible adición de un agente antiespumante. En el ejemplo siguiente se ilustran los ingredientes del medio y condiciones de la fermentación principal.

Ejemplo 2:

Medio acuoso de fermentación contenido en 100m<sup>3</sup> (100,000 l).

|                         | Kg.  |
|-------------------------|------|
| Maíz                    | 2500 |
| Harina de soya          | 5500 |
| Sacarosa                | 3000 |
| Carbonato de sodio      | 900  |
| Bicarbonato de sodio    | 300  |
| Polifosfato de trisodio | 185  |

Las sales reguladoras se esterilizan por separado y se añaden bajo condiciones estériles después de la

esterilización de la porción principal. Las condiciones de fermentación son:

Temperatura 37°C, tiempo 65 h., pH aproximado 7.5-10, Aereación (Vol. aire/vol. líquido/min.) 0.5.

De la fermentación resulta una producción de enzima con alrededor de 250 UA/l de actividad, medida a 55°C y pH 9.

Crecimiento de *Bacillus subtilis* en presencia de detergente.

El proceso de Fukumoto, et. al. (10) relata la producción de una proteasa alcalina resistente a detergentes mediante el cultivo particular de cepas selectas de *Bacillus subtilis* obtenidas del suelo o de varios productos comestibles procesados.

Se ha encontrado que la proteasa alcalina producida por algunas cepas específicas de *B. subtilis* muestran una fuerte resistencia a la desactivación por todos los tipos de agentes de superficie activa.

Las cepas de *B. subtilis* pueden clasificarse dentro de cuatro tipos con base en su producción de proteasa.

#### Tipo 1:

El primer tipo lo constituyen las cepas de *B. subtilis* productoras de amilasa. Estas cepas tienen una pronunciada habilidad para producir proteasas neutras, además de que pueden secretar proteasa alcalina sólo en la última etapa del cultivo, y la proteasa neutra desaparece gradualmente conforme se produce la proteasa alcalina. (Figuras 20.1 y 21.1). Bajo estas circunstancias la cantidad de proteasa alcalina acumulada es relativamente baja.

Tipo 2:

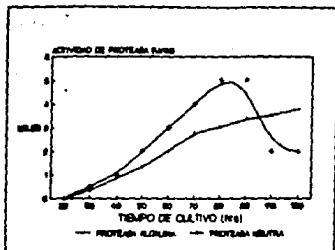
El segundo tipo puede producir ambas, la proteasa alcalina y la neutra al mismo tiempo y, en este caso, el decremento en la actividad enzimática ocurre en un tiempo comparativamente corto debido al efecto que cada proteasa ejerce sobre la síntesis de la otra. (Figuras 20.2 y 21.2).

Tipo 3:

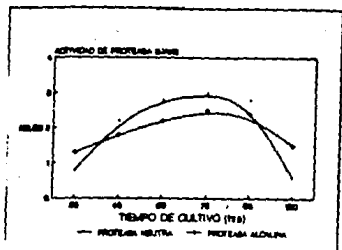
El tercer tipo de *B. subtilis* puede producir solo proteasa alcalina y, en este caso se acumula una notable cantidad de proteasa alcalina a causa de la carencia de la interacción entre dos proteasas. Este tipo incluye a las cepas de *B. subtilis* aisladas y empleadas en el proceso de Fukumoto. (Figuras 20.3 y 21.3).

Tipo 4:

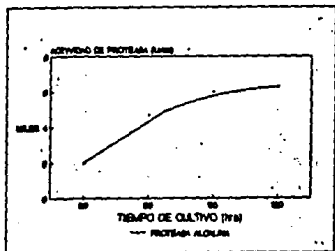
Las cepas del cuarto tipo de *B. subtilis* producen solo proteasa neutra. (Figuras 20.4 y 21.4).



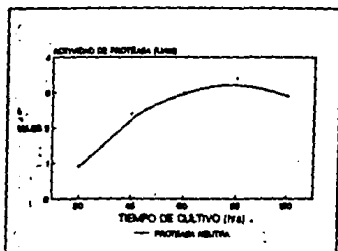
1



2

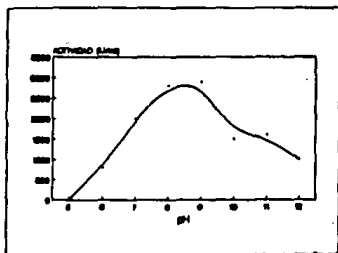


3

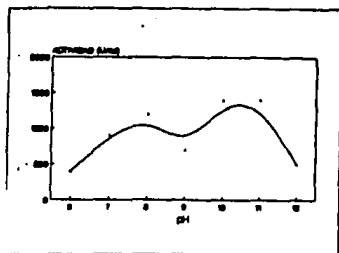


4

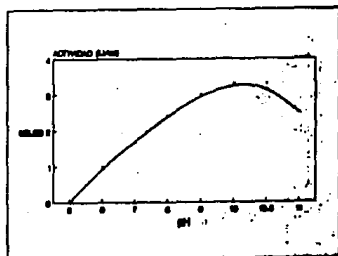
FIG. 20 Producción de proteasa por 4 cepas diferentes de *Bacillus subtilis* (19).



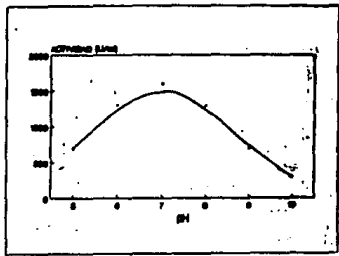
1



2



3



4

FIG. 21 Actividad de proteasa en función del pH (19).

La actividad de la proteasa descrita en el procedimiento de Fukumoto fue determinada por el siguiente procedimiento:

A 5 ml de caseína al 0.6% se le agrega 1 ml de solución de enzima a 30°C. Después de 10 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de 5 ml de una mezcla de ácido tricloroacético conteniendo 36 ml de ácido tricloroacético al 50% (p/v), 220 ml de acetato de sodio 1 M., 330 ml de ácido acético 1 M. en un volumen total de un litro.

La caseína no hidrolizada se precipita y el precipitado resultante se filtra utilizando papel filtro No. 6. Se mide la densidad óptica del filtrado a 275 nm. contra un blanco de sustrato.

El blanco se prepara añadiendo 5 ml de mezcla de ácido tricloroacético a 1 ml de solución de enzima y luego se añade la caseína y se incuba a 30°C por 10 minutos.

Una unidad de actividad de enzima se define como la cantidad de enzima que libera materiales solubles de ácido tricloroacético equivalente a 10  $\mu$ g de tirosina por 10 minutos.

Las curvas respectivas de pH ( figura 21 ) se obtuvieron por el procedimiento mencionado anteriormente, con la excepción de que el pH apropiado se obtuvo utilizando un amortiguador.

La actividad enzimática se determina como el resultado del efecto que tiene la enzima sobre la caseína. Cuando la caseína es hidrolizada por la enzima se libera una cantidad de tirosina, además de otros aminoácidos. Por lo que la cantidad de tirosina liberada puede utilizarse como una medida de la actividad de la enzima.

Esto se puede relacionar fácilmente a la cantidad específica de tirosina pura por el uso de absorción

ultravioleta. Por ejemplo, la tirosina tiene una absorción específica a 275 nm. La diferencia entre la absorción del material de prueba y el blanco comparada con una cantidad conocida de tirosina (ejemplo 10  $\mu$ g), en esa longitud de onda nos permite conocer la actividad de la enzima.

Los microorganismos utilizados en este proceso son cepas de *Bacillus subtilis* que tienen la propiedad de poder crecer en presencia de lauril sulfato de sodio.

Las fuentes normales y procedimientos para la obtención del *B. subtilis* descritos en la literatura son utilizables para el aislamiento de cepas operables en este proceso con la condición de que las cepas aisladas deben poseer como una propiedad la capacidad de crecer en presencia de lauril sulfato de sodio. Esto, sin embargo, no quiere decir que el medio utilizado para la producción de la proteasa alcalina deba contener lauril sulfato de sodio.

En la tabla 14 se comparan 5 muestras de proteasa de *Bacillus subtilis* pura en lo que respecta a pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad de pH y resistencia a varios inhibidores (10).

TABLA 14. Comparación de las proteasas producidas por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*.

|   | Proteasa neutra |      | Proteasa alcalina |          | III |
|---|-----------------|------|-------------------|----------|-----|
|   | I               | II   | I                 | II       |     |
| pH óptimo   | 6.8-7.3         | 7    | 10.3-10.7         | 10.5-11  |     |
| Rango estable de pH   | 6.0-9.5         | 6-10 | 5.5-10.           | 5.5-11.2 |     |
| Temp. óptima  |                 |      |                   |          |     |
| (15 min. reacción) <sup>o</sup> C   | 55              | 52   | 55                | 55       | 55  |
| Resistencia al calor (bajo presencia de Ca) <sup>o</sup> C  | 50              | 50   | 50                | 50       | 50  |
| Influencia de inhibidor (actividad residual relativa* después de 1h. de incubación a pH 7.5 y 90 <sup>o</sup> C). |                 |      |                   |          |     |
| EDTA (5x10 <sup>-4</sup> M)   | 0               | 0    | 98                | 98       | 98  |
| DFP (2.5x10 <sup>-4</sup> M)  | 100             | 100  | 40                | 55       | 2   |
| PPI (0.05%)   | 100             | 100  | 14                | 18       | 1   |
| CuSO <sub>4</sub> (5x10 <sup>-3</sup> M)  | 5               | 15   | 75                | 98       | 90  |
| HgCl <sub>2</sub> (5x10 <sup>-3</sup> M)  | 3               | 8    | 12                | 17       | 40  |
| Tween 20 (0.5%)   | 85              | 90   | 100               | 100      | 100 |
| Triton X-100 (0.05%)  | 92              | 94   | 98                | 98       | 98  |
| SLS (0.2%)  | 0               | 0    | 59                | 0        | 93  |
| BKCL (0.2%)   | 0               | 0    | 42                | 38       | 87  |
| ABS (5x10 <sup>-3</sup> M)  | 0               | 0    | 40                | 30       | 70  |

\* Actividad relativa: cada solución original de enzima fue diluida a una concentración de 100µg/ml con agua fría, mantenida a 90<sup>o</sup>C por una hora como un control. Estos controles fueron asignados a una actividad de 100 con el propósito de comparar la actividad permanente después de varios inhibidores (19).



NOTA: EDTA = ácido etilén diamino tetra acético; DPP = Dicitopropil (fosforofato); SPS = unidades de proteasa de papa; SLS = lauril sulfato de sodio; BKCL = cloruro de benzalconio; ABS = Alkilbencensulfonato; Tween 20 = Monolaurato de polioxetileno de sorbitán; Tritón X-100 = Alcohol polietoxi de isoocitifenilo (SP).

Proteasa neutra I y proteasa alcalina I: separadas y purificadas individualmente de un cultivo de medio líquido de *B. subtilis* var. *amylolyquefaciens*; Proteasa neutra II y proteasa alcalina II: separadas y purificadas individualmente de un medio de cultivo líquido de *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* (SP).

Como se muestra en la tabla 14 la proteasa alcalina III producida por las cepas de *B. subtilis* pertenecientes al tercer tipo descrito anteriormente y aislada de acuerdo a éste proceso exhibe una notable resistencia contra la inhibición por agentes de superficie activa iónicos o no iónicos. Esta resistencia no se encuentra en las proteasas alcalinas o neutras producidas por cepas de *B. subtilis* del primero, segundo y cuarto tipos (proteasa neutra I y II, proteasa alcalina I y II). Las propiedades de resistencia a la inhibición por agentes de superficie activa y elevada estabilidad y actividad bajo condiciones alcalinas, son altamente deseables para las enzimas utilizadas en lavandería y productos detergentes.

Además, las cepas de *Bacillus subtilis* pertenecientes al tercer tipo se diferencian de otras cepas en que crecen muy bien en un medio con una concentración de 0.15% de lauril sulfato de sodio y pueden producir la misma cantidad de proteasa agregando al medio lauril sulfato de sodio o no.

Por consiguiente, mediante la utilización de las

propiedades reveladas en la tabla 14, la proteasa alcalina producida por cepas de *B. subtilis* que tienen resistencia no solo contra SLS, sino también contra otros muchos detergentes, puede ser secretada y aislada sin dificultad.

En este proceso se llevó a cabo un cultivo con *B. subtilis* del tercer tipo, en un medio líquido o sólido. Generalmente se prefiere un medio líquido y en este caso el cultivo se lleva a cabo con aereación y agitación (18.19).

#### Ejemplo 1:

Se hace un cultivo inicial de *Bacillus subtilis* NSI (ATCC No. 21415) en medio líquido de extracto alcalino de soya (conteniendo 5% de extracto de soya, 3% de dextrina, 1% de fosfato de amonio, 0.03% de KCl y 0.02% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) a 35°C por 2 días con pre-propagación (cultivo con agitación). El cultivo principal se lleva a cabo utilizando el cultivo inicial obtenido en el mismo medio que el empleado anteriormente con agitación a 37°C. La agitación que se recomienda es de 120 a 180 r.p.m. y la cantidad de medio es 50 ml por 500 ml en frascos "Sakaguchi".

Después de aproximadamente 20 horas la proteasa alcalina se empieza a producir y alcanza un valor máximo (13000 unidades/ml) después de 50 horas. Durante el cultivo el pH se mantiene entre 7 y 8. También se produce una pequeña cantidad de amilasa (0.5 a 1.0 unidades/ml) y una muy pequeña cantidad de hemicelulasa. Sin embargo, no se encuentra proteasa neutra o celulasa.

Al final del cultivo, se ajustan 10 litros de medio para dar una concentración final de 0.05 M. de dal de calcio por adición de sal de calcio soluble en agua y ajustando el pH a 8 con hidróxido de sodio 1 N. y el precipitado resultante se elimina por centrifugación.

Cuando se encuentra en el filtrado una pequeña cantidad de material mucoso se agrega cloruro de benzalconio, para dar una concentración final de 0.2%. Después de dos horas de reposo se filtra el precipitado resultante.

La proteasa alcalina se precipita por adición de sulfato de amonio al filtrado a una concentración final de 70% de saturación. Después de sedimentarse toda la noche en frío, el precipitado se recolecta por filtración y se seca.

Después de una purificación parcial por salado se recuperan aproximadamente 500 g de preparación enzimática con una actividad de 200,000 unidades por ml (19).

#### Ejemplo 2:

Mediante el uso de la cepa de *Bacillus subtilis* A (ATCC No. 21416) se obtiene un cultivo inicial por el mismo método del ejemplo 1. se inocula en matraces de 500 ml conteniendo 50 ml del medio de fermentación que se indica más adelante, en una proporción del 10% (de volumen), y la fermentación se lleva a cabo por 40 horas como en el ejemplo 1. En estas condiciones la actividad de la proteasa alcalina alcanza 10,000 unidades/ml.

#### Composición del medio de fermentación

|                       | %    |
|-----------------------|------|
| Glucosa               | 1    |
| Almidón soluble       | 5    |
| Harina de soya        | 1    |
| Fosfato de amonio     | 0.5  |
| Sulfato de magnesio   |      |
| heptahidratado (pH 7) | 0.05 |

Se añade cloruro de calcio al caldo de cultivo hasta una concentración final de 0.05 M. y se ajusta el pH a 8 con la adición de hidróxido de sodio 1 N. Después de esto el precipitado resultante se elimina por centrifugación, se enfría el filtrado a 4°C y se agregan dos volúmenes de acetona fría al filtrado dejando reposar 4 horas.

El precipitado se recolecta por centrifugación, se lava dos veces con acetona fría y se seca al vacío. Así se recupera un polvo seco café amarillento. La recuperación es de 88%, y la actividad específica (unidad de proteasa por mg de proteína) alcanza un valor aproximado de 3 veces (19).

#### Ejemplo 3:

Este ejemplo se lleva a cabo siguiendo el procedimiento del ejemplo 2, excepto que la cepa de *Bacillus subtilis* utilizada es *B. subtilis* M (ATCC No. 21417). La actividad que alcanza la proteasa alcalina es de 8000 unidades por ml en 40 horas (19).

#### Ejemplo 4:

Este ejemplo se puede llevar a cabo siguiendo el procedimiento del ejemplo 2, excepto que se utiliza la cepa de *Bacillus subtilis* N (ATCC No. 21418). La actividad de proteasa alcalina que se alcanza es de 7000 unidades por ml en 40 horas (19).

Se puede afirmar que un proceso para la producción de proteasa alcalina tiene un rango óptimo de pH de 10.5 a 11.0, un rango de pH estable de 5.5 a 11.2 y una temperatura óptima de 55°C, teniendo una resistencia a la inhibición por agentes de superficie activa comprendido dentro del cultivo de cepas seleccionadas de *Bacillus*

subtilis : ATCC 21415, ATCC 21416, ATCC 21417, y ATCC 21418 en un medio nutritivo adecuado (19).

#### Proteasas de *Bacillus alcalophilus*.

Una cepa de *Bacillus alcalophilus* NCTC 4553 (NCIB 8772) puede cultivarse a pH relativamente alto, de preferencia entre 7 y 11 y tiene crecimiento óptimo a pH entre 7.8 y 9.0. La producción de la enzima proteolítica por *Bacillus alcalophilus* es baja y es insuficiente para su explotación comercial, por ejemplo en composiciones de lavado como aditivo biológico. Vroemen (25) desarrolló un proceso para la producción de la enzima proteolítica con altos rendimientos utilizando *B. alcalophilus* y baja concentración de iones sulfato en el medio de cultivo.

El punto clave del proceso reside en el hecho de que la producción de la enzima por *B. alcalophilus* está grandemente influenciada por el contenido de ion sulfato en el medio. Una elevada concentración de éste provoca bajos rendimientos de producción. Por lo tanto, la producción de la enzima se incrementa considerablemente por la reducción de la concentración de ion sulfato del medio de cultivo.

El agua de la llave generalmente contiene una concentración de ion sulfato mayor de 35 mg/l, pudiendo alcanzar valores hasta de 70 mg/l. El agua con estas características no puede ser utilizada como disolvente del medio de cultivo del proceso para obtener elevados rendimientos en la producción de la enzima.

Para preparar el medio de cultivo se utiliza preferentemente agua destilada o desionizada y a ésta se agregan las fuentes necesarias de nitrógeno, carbono asimilable y otros compuestos comunes teniendo cuidado de

que el contenido del ion sulfato sea rigurosamente controlado y sujeto a un mínimo casi por debajo de 35 mg/l.

Durante el cultivo de *B. alcalophilus* el pH del medio deberá sujetarse a valores de 7 a 11, preferentemente de 7.8 a 10.0 y esto se realiza utilizando soluciones reguladoras como carbonato, hidróxido de sodio o ácido clorídrico.

Además del carbono asimilable y nitrógeno orgánico el medio de cultivo debe contener también otros compuestos en pequeñas cantidades, tales como Ca, Mg, Mn, Fe, K, Co, Cu, Zn, B, Mo, Br y I. Pueden estar presentes otros elementos traza pero no son esenciales. Para mantener la concentración de sulfato tan baja como sea posible los compuestos no se agregan en sulfatos sino en cloruros y nitratos.

Generalmente la máxima producción de enzima se obtiene en un periodo de fermentación de 1 a 5 días. La enzima producida se aísla y purifica si es necesario por métodos ya conocidos. Esta se puede emplear como un componente biológicamente activo en preparaciones de lavado en combinación con agentes de superficie activa y otros aditivos convencionales (25).

Ejemplo:

El cultivo de *Bacillus alcalophilus* NCIB 8772 se lleva a cabo en frascos de fermentación conteniendo 100 ml de medio basado en agua destilada y el resultado se puede comparar con el de otro medio preparado con agua de la llave.

Se prepara una solución por medio de la disolución de 9.4 g de caseína, 2g de extracto de levadura y 10 g de  $K_2HPO_4$  aforando con agua a 700 ml y ajustando su pH a 9.5. La solución se esteriliza a 120°C por 20 minutos.

Se prepara una segunda solución por disolución de 0.16 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  , 0.58 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  , 0.010 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  , 0.005 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  , 25 g de sacarosa y 1.4 g de ácido cítrico en agua llevada a 200 ml. Se le ajusta su pH a 6 con solución acuosa de NaOH y la solución se esteriliza a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos . Se prepara otra solución conteniendo 10.8 g de carbonato de sodio llevada con agua a 100 ml, se esteriliza a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

Las tres soluciones preparadas se mezclan para formar un litro de solución base.

La inoculación del cultivo se hace con *B. alcalophilus* en caldo Trypton de soya conteniendo 0.1 mol/l de carbonato de sodio , y el cultivo se fermenta con agitación a  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas. Las fermentaciones se llevan a cabo a casi  $35^\circ\text{C}$  con el medio base preparado con agua de la llave (la cual contiene aprox. 89mg de  $\text{SO}_4^{=}$  /l) y con el medio preparado con agua destilada , en cada caso con y sin adición de 50 mg de sulfato de sodio anhidro por litro.

Durante las fermentaciones no se agregan soluciones alcalinas o ácidas y el pH final es 9.8 y 7.8 respectivamente.

Los frascos se incuban con agitación . Los resultados obtenidos por la realización de éste ejemplo se muestran en la tabla 15 (25).

TABLA 15. Resultados de las fermentaciones con *Bacillus alcalophilus*.

| Medio          | mg de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> agregados. | mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /l | Producción max. de enzima (UD/ml)* | Horas de fermentación. |
|----------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Agua de llave  | -  | 69                                  | 1,100                              | 28                     |
|                | 50   | 104                                 | 950                                | 32                     |
| Agua destilada | -  | 0                                   | 3,300                              | 28                     |
|                | 50   | 35                                  | 1,200                              | 28                     |

\* UD: Unidades Delft.

(25).

#### Proteasas del grupo de Eomicetos termofílicos.

Craveri et. al., (26) desarrollaron un proceso para la manufactura de proteasas de elevada actividad proteolítica en un rango de pH de 7 a 11 y temperatura de 45 a 65°C y que exhiben estabilidad de mínimo 1 hora a 40°C a pH de 5 a 10. Esta proteasa se obtiene cultivando el microorganismo designado como ATCC No. 20350 perteneciente al grupo de los Eomicetos termofílicos en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una sal mineral en presencia de una cantidad de aire de 0.2 a 1.0 µl/l/min. con agitación por 30 a 70 horas a una temperatura de 38 a 45°C y a un rango de pH de 6.5 a 8. Esta cepa fue aislada de una muestra de suelo tomada de la provincia de Pravia en Italia y sembrada sobre agar de malta o extracto de agar papa glucosa y levadura.



### Ejemplo:

Se prepara una suspensión de la cepa 1 PV F-434 (ATCC No. 20350) a partir de dos inoculaciones de 2 a 3 días, sobre agar de malta o agar papa glucosa y levadura, lavadas con 5 a 10 ml de solución salina fisiológica por inoculación dentro de un recipiente de 750 ml conteniendo 100 ml de un medio de cultivo con la siguiente composición: 15 g de harina de maíz, 10 g de suero de leche en polvo, 1 g de fosfato ácido de potasio, 5 mg de sulfato de zinc heptahidratado y agua para diluir a 1 litro.

El pH del medio de cultivo se ajusta a 7 y se esteriliza a 121°C por una hora y media, después se enfría a 40-45°C y se inocula. Se mantiene de 36 a 48 horas con agitación constante a temperatura controlada de 43 a 45°C.

El caldo de cultivo de 3 a 5 recipientes se utiliza como inóculo para un fermentador de 10 litros que contiene 5 litros del mismo medio descrito anteriormente. Después de aproximadamente 30 horas a 45°C con agitación y aereación, el caldo de cultivo obtenido se utiliza como inóculo en una proporción de 10% para fermentadores de 20 litros de capacidad conteniendo 12 litros del medio de cultivo. Las condiciones de fermentación para la producción de la enzima son: temperatura de 43 a 45°C, agitación de 500 r.p.m. y aereación de 0.4 a 0.8  $\mu\text{l/l}/\text{min}$ . Como agente antiespumante se añade una emulsión de silicona.

Después de 48 horas cuando el pH alcanza un valor aproximado a 7.8 y se alcanza una concentración de 10 a 12 unidades proteolíticas por ml, se interrumpe la fermentación. Con el fin de separar el micelio, se someten a centrifugación 100 litros de caldo. Se ajusta el pH del líquido a un valor de 5.5 con ácido clorhídrico y después se añade una solución de 250g de tanino en

1500ml de agua , el liquido se mantiene con agitación suave por 40 minutos.

Del caldo se obtiene un precipitado escamoso al que se le permite sedimentarse por 3 horas a temperatura ambiente. Del fondo del recipiente se extraen aproximadamente 20 litros del liquido que contiene el precipitado ácido y se someten a centrifugación a 600 r.p.m..

El precipitado separado se lava 3 veces con un total de 5 litros de acetona y se tritura, posteriormente se seca al vacío a temperatura ambiente. Con este método se obtienen aproximadamente 200 g de polvo de enzima color café, de apariencia amorfa con una actividad equivalente a 3,500 unidades proteolíticas por gramo. Su actividad proteolítica se desarrolla preferentemente a pH de 9 a 11 y a temperatura de 45 a 65°C y exhibe suficiente estabilidad para aplicaciones prácticas , tales como aquellas relacionadas con productos detergentes (26).

#### IV.4 Formas físicas de enzimas detergentes.

Debido a su naturaleza proteínica, las enzimas pueden provocar síntomas alérgicos en personas susceptibles. Aunque las enzimas son sólo alérgenos débiles, se deben tomar algunas precauciones en su manipulación. Las proteasas son irritantes débiles, por lo tanto, necesitan ser reducidas a un mínimo absoluto las concentraciones de enzima a las cuales están expuestos los trabajadores de plantas de detergentes (5,8).

Cuando se inició el uso de las enzimas detergentes, existía cierta desconfianza por los peligros que implicaba la inhalación de altas concentraciones de polvo que contenía una mezcla de enzima y detergente. La confianza

en las enzimas se recuperó después de una profunda investigación realizada por la Academia Nacional de Ciencias en los Estados Unidos que concluyó que no había ningún riesgo para el consumidor (1, 121).

A partir de entonces, los fabricantes de detergentes y los productores de enzimas tuvieron que realizar pruebas exhaustivas para demostrar su eficiencia e inocuidad antes de ser lanzados al mercado (1).

Desde 1971 los productos enzimáticos detergentes fueron esencialmente enzimas molidas y estandarizadas. Con el fin de eliminar el polvo y las dificultades de la inhalación resultante en las plantas de detergentes, se desarrollaron procesos para encapsular a las enzimas en materiales tales como surfactantes no iónicos o policloruro de sodio (etilén glicol) como matriz. De esta manera la propiedad de formación de polvo de las enzimas se elimina, y se resalta la estabilidad de la enzima en presencia del polvo detergente.

Se han reportado varios métodos de producción estable, esencialmente de granulados enzimáticos libres de polvo (120).

A través de los años, éstas formulaciones se han perfeccionado gradualmente, se han desarrollado nuevos tipos de procesos y los productos encapsulados están disponibles en varios tipos diferentes (8).

Algunas formas de hacer las preparaciones enzimáticas libres de polvo son:

1. Se hace una preparación de la enzima con rellenos y agentes ligantes dentro de pequeños gránulos a menudo rodeados por una capa de material inerte, tal como cera o un derivado soluble de celulosa (5).

2. Se preparan los gránulos en los cuales la enzima es encajada uniformemente en cera soluble en agua. Esto se obtiene por un simple rociado en frío de una mezcla de

enzima, sal y cera, de tal forma que sean formadas partículas suficientemente grandes (1).

3. El mejor método es el que se describe en la figura 22. La enzima se mezcla con aditivos, se granula en un granulador, se seca en una plancha secadora de fluidos y se reviste con cera en una segunda operación (36).

De esta manera pueden prepararse partículas de cualquier tamaño, las partículas se cubren con una capa más o menos gruesa de cera por lo que la formación de polvo es mínima.

Las especificaciones para un producto como este normalmente estipulan que el polvo de enzima formado durante el proceso deberá ser menor que el correspondiente a 0.5  $\mu\text{g}$  de enzima pura por Kg de producto enzimático (1).

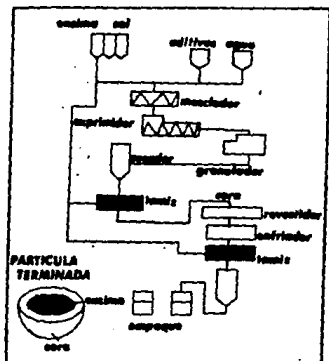


FIG. 22 Preparación de enzima libre de polvo.

También es importante que el tamaño de partícula del gránulo enzimático sea similar a aquel del detergente para asegurar una mezcla homogénea y prevenir la segregación de partículas de enzima durante el transporte y manipulación del detergente (5).

#### Encapsulados.

En la compañía Gist-Brocades el encapsulado P se produce por el rociado en frío de una mezcla de un fundido no iónico y la enzima, por ejemplo la Maxatasa. El encapsulado es relativamente pequeño y de forma esférica.

Un tipo de producto encapsulado desarrollado recientemente es el CX, éste nuevo tipo se basa en el rociado en frío de un agente no iónico y la enzima. En un proceso especial de revestimiento el polvo enzimático es reducido a niveles extremadamente bajos.

Finalmente el encapsulado tipo F se caracteriza por un nivel bajo de polvo de enzima y muy elevada flexibilidad.

En general la calidad de los productos encapsulados enzimáticos se analiza por las siguientes características:

1. Funcionamiento durante el ciclo de lavado.
2. Distribución en el detergente.
3. Nivel de polvo de enzima.
4. Estabilidad en el detergente.

El primer párrafo ha sido descrito anteriormente. La distribución del encapsulado enzimático en el detergente depende de la gravedad específica del detergente y de las partículas del encapsulado y de ambos tamaños de partícula. Además puede ser de importancia también, la superficie del encapsulado enzimático.

La tabla 10 sintetiza algunos parámetros físicos de los tipos de encapsulados P, CX, y F, incluyendo aquellos de un detergente de rociado en seco.

TABLA 16. Distribución de parámetros de encapsulados P, CX y F.

|   |             |
|---|-------------|
| Encapsulados P y CX (Maxatasa)  |             |
| Promedio de tamaño de partícula ( $\mu$ )                                 | 500-950     |
| Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )                                       | 0.85-0.9    |
| Partículas por gramo  | 11000-13000 |
| Encapsulados F (Maxacal F 400,000)  |             |
| Promedio de tamaño de partícula ( $\mu$ )                                 | 550-700     |
| Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )                                       | 0.75-0.9    |
| Partículas por gramo  | 5500-6500   |
| Promedio de detergente rociado en seco (1 $\frac{1}{4}$ taza de producto) |             |
| Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )                                       | 0.35-0.4    |
| Detergente concentrado (1/4 taza de producto)                             |             |
| Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )                                       | 0.75        |
| (8).  |             |

En el tercer punto, se consideran de importancia los niveles de polvo y la resistencia a la formación del mismo en la manipulación de los preparados encapsulados. Todos los tipos de encapsulados mencionados anteriormente tienen niveles de polvo extremadamente bajos. En especial, el encapsulado tipo F muestra gran flexibilidad a la presión y como consecuencia no se forma polvo debido a la raspadura, desgaste o rozadura.

Se puede concluir, con respecto a este punto que los encapsulados enzimáticos son tan seguros como muchos otros materiales base de detergentes, como lo indica el hecho de que aproximadamente 75% de todos los detergentes de Europa Occidental contienen enzimas hoy en día sin reportar ningún tipo de problemas (8).

Considerando el cuarto punto, relacionado con la estabilidad en el detergente, es importante saber que algunos componentes de los detergentes tienen efectos

adversos sobre la estabilidad de la enzima, lo que debe tomarse en cuenta para detergentes líquidos y en polvo.

Los agentes de blanqueo, como perborato y bicarbonato pueden tener una influencia sobre la estabilidad de la enzima en algunos tipos de encapsulados ya que causan su deterioro.

En la tabla 17 se presentan los valores normales de estabilidad por seis meses de un encapsulado de enzima de proteasa de alta calidad.

TABLA 17. Estabilidad de almacenaje de Maxatasa P en detergentes en polvo (37°C; 6 meses).

|   | Actividad residual (%) |
|---|------------------------|
| En detergente sin blanqueador               | >95                    |
| En detergente que contiene 20% de perborato | 65-75                  |

(14).

La estabilidad de la enzima en el encapsulado tipo CX en detergentes es aproximadamente la misma que la expuesta en la tabla 17 para el encapsulado tipo P. El encapsulado tipo F tiende a ser aún más estable (14).

Existe un descubrimiento reciente en tecnología de granulación de enzimas. La granulación "T" de los laboratorios Novo emplea lo último en tecnología avanzada de encapsulados.

El diseño del equipo se realizó en la misma compañía incorporando los últimos conceptos en tecnología computarizada, automatización y control de flujo con ayuda de la gravedad.

El granulado T detergente representa un perfeccionamiento sobre los granulados existentes, lo que se llama "friabilidad", esto es, la propiedad de

elasticidad del gránulo, de doblarse o ceder a una fuerza mecánica.

Estas características elásticas contribuyen a una reducción en el polvo resultante cuando las partículas de granulado son rotas por abrasión mecánica (6).

#### Líquidos.

Para la aplicación de enzimas en formulaciones de detergentes líquidos, los productores de enzimas han desarrollado preparaciones enzimáticas líquidas, en este tipo de detergentes los problemas de formación de polvo no existen (8).

Es mucho más simple hacer preparaciones enzimáticas líquidas que preparaciones sólidas, por lo tanto han empezado a ser más populares.

Las enzimas proteolíticas se venden actualmente en forma líquida y ellas parecen tener muy buena estabilidad de almacenaje aún a temperatura ambiente (1).

Las preparaciones líquidas pueden ser suspensiones, en las cuales el polvo de enzima se suspende en un surfactante no iónico y líquidos uniformes (5).

El funcionamiento de enzimas líquidas es idéntico al de los encapsulados. De aquí, que la atención debería ponerse sólo en la estabilidad de la enzima durante el almacenaje en detergentes líquidos.

En general, las enzimas proteolíticas pierden gradualmente su actividad cuando están en solución acuosa. La velocidad de esta desactivación depende de la temperatura, pH y otros componentes de la solución, tales como agentes de superficie activa, agentes secuestrantes y blanqueadores. Es menor la estabilidad de la enzima a mayor temperatura y pH alcalino. Generalmente los agentes aniónicos son más perjudiciales para la enzima que los agentes no iónicos.



También tienen influencia negativa para la estabilidad de la enzima los secuestrantes fuertes en elevadas concentraciones. La razón es que éstas enzimas requieren un nivel mínimo de iones calcio como elemento esencial para su estructura activa.

Aunque anteriormente se ha mencionado que las preparaciones enzimáticas líquidas tienen buena estabilidad, la vida de anaquel de la proteasa en detergentes líquidos no es tan grande como en detergentes en polvo. Esta afirmación está fundada en que la vida media de actividad de la enzima, es alrededor de 2 a 4 semanas de almacenaje a 37°C en un detergente líquido. Los detergentes líquidos de Estados Unidos en general, producen mejores resultados que los detergentes de Europa Occidental. Esto se debe probablemente al hecho de que los detergentes líquidos americanos contienen relativamente más agentes no iónicos que agentes aniónicos. En Europa los detergentes líquidos contienen más agentes aniónicos que agentes no iónicos.

Considerando el perfeccionamiento en la estabilidad de almacenaje de enzimas proteolíticas en formulaciones de detergentes de lavandería líquidos se ha puesto la atención en el contenido y actividad de agua y en las concentraciones de iones calcio presentes en los líquidos.

Además debe de tomarse en cuenta que los resultados óptimos que se han obtenido en estabilidad de las enzimas han sido utilizando detergentes líquidos con valores de pH entre 7 y 8 (14).

En la tabla 18 se muestra la influencia de la cantidad de agua en detergentes líquidos sobre la estabilidad en el almacenaje de enzimas proteolíticas.

TABLA 18. Estabilidad de almacenaje de Maxacal en un detergente liquido de servicio pesado a 50°C.  
Influencia de la actividad de agua.

|             | Actividad residual (%)              |  |
|-------------|-------------------------------------|--|
|             | Detergente liquido con 40% de agua. | Detergente liquido con 20% de agua y 20% de glicerina. |
| Una semana  | 13                                  | 85   |
| Dos semanas | 2                                   | 73   |

(15).

La tabla 18 nos muestra la actividad residual de Maxacal en un detergente liquido como tal y en otro en el cual la mitad de agua fue reemplazada por glicerina. Por medio de la reducci3n de la cantidad de agua se incrementa de manera importante la estabilidad de almacenaje de una enzima (15).

Se ha concluido que existe mejor estabilidad de las enzimas en el almacenaje mientras menor sea la actividad de agua.

En la figura 23 se muestra la influencia de varias cantidades de iones calcio sobre un detergente liquido de servicio pesado europeo, en la cual se grafica la actividad residual de Maxacal contra el tiempo de almacenamiento a 37°C en funci3n de la cantidad de iones calcio.

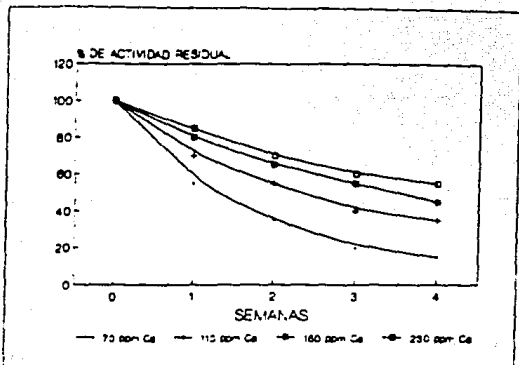


FIG. 23 Estabilidad de almacenaje de Maxacal en un detergente líquido de servicio pesado en función del contenido de calcio. (37°C, pH=7.5, 4,000 UAD/g de detergente) (8).

Se han obtenido enormes ventajas sobre la estabilidad de almacenaje utilizando niveles de iones de calcio por arriba de 150 ppm (15).

#### IV.5 Regulación y factores de seguridad.

Un producto enzimático utilizado en el procesamiento de alimentos debe ser aprobado por leyes que controlan los aditivos para alimentos o procesos. Hasta ahora una aprobación similar no ha sido requerida para el uso de enzimas en otras industrias. Sin embargo, las leyes recientemente aprobadas en Estados Unidos de Norteamérica y Europa Occidental requieren que las nuevas industrias químicas y de otros materiales, incluyendo enzimas industriales cumplan con ciertos estándares. Esto significa que los fabricantes de detergentes tendrán que

notificar a las autoridades en su país, de su intento de utilizar enzimas (5).

El uso de enzimas en productos de lavandería pronto gozó de completa seguridad, y demostró ser una operación altamente efectiva. En 1969, los datos de algunos reportes al respecto, contradijeron a los resultados de las pruebas iniciales. Se observaron efectos adversos sobre la piel y los pulmones de los trabajadores de la industria de detergentes como resultado de la manipulación e inhalación del polvo que contenía a la enzima.

Debido a que este descubrimiento comenzó a ser difundido ampliamente, la popularidad del uso de enzimas en productos de lavandería declinó, y muchos productos fueron retirados del mercado o reformulados sin enzimas (7).

Antes de que una enzima sea formulada dentro de un producto de lavandería, es necesario considerar sus propiedades toxicológicas al detalle. Deben efectuarse extensos estudios de selección para asegurar la conveniencia de un producto enzimático en particular (8).

Algunas propiedades toxicológicas de las enzimas detergentes que deben ser consideradas son:

1. A semejanza de otros materiales proteínicos, la inhalación del polvo de enzima está relacionada con un alto riesgo de alergias respiratorias, tales como fiebre del heno y asma, en personas susceptibles.

2. Las enzimas detergentes son proteinasas y pueden irritar la piel húmeda, los ojos, membranas y mucosas (98).

Lo concerniente a la seguridad no termina con la fabricación del producto enzimático. Es importante que el productor del detergente especifique las recomendaciones de vigilancia y control del producto.

Desde los años setentas, las enzimas detergentes han

sido fabricadas en forma granulada para suprimir la emisión de polvo dentro del área de trabajo (6).

El problema de la alergia ha sido eliminado por la encapsulación de las enzimas y por la introducción de métodos adecuados de manipulación y transporte de los encapsulados en áreas de trabajo bien ventiladas. Finalmente se logró bajar los niveles de polvo a cero por largos periodos de tiempo. El problema de la irritación ha sido eliminado evitando el contacto directo con las enzimas. El equipo de trabajo es cerrado y los trabajadores usan guantes protectores y anteojos de seguridad (98).

Los elementos clave en el uso conveniente de enzimas detergentes a nivel fábrica son:

Monitoreo de rutina del polvo suspendido en el aire en la fábrica, un programa bien definido de instrucción para la seguridad y manejo conveniente de éste material y un monitoreo periódico de exámenes médicos de los empleados.

Las compañías que no sean capaces de seguir este protocolo de seguridad, no deberían de considerar el uso de enzimas detergentes dentro de sus formulaciones (6).

Los fabricantes de los detergentes enzimáticos efectúan una serie de estudios en animales y humanos para asegurarse de que los productos sean inofensivos en el uso. Los más importantes de tales estudios son aquellos destinados a juzgar la patogenicidad del microorganismo productor, la toxicidad aguda, la toxicidad de inhalación, el potencial de sensibilización y el efecto irritante (122, 123).

Los estudios en ésta área son muy abundantes y muchas patentes nuevas los están tomando en consideración para perfeccionar las formulaciones de los detergentes enzimáticos (7).

En los Estados Unidos han sido recomendadas rigurosas normas para la baja emisión de polvo como consideración a los trabajadores de fábricas de detergentes (124).

#### IV.6 Especificaciones para detergentes enzimáticos.

Las preparaciones enzimáticas técnicas contienen sólo un pequeño porcentaje de enzima activa (comúnmente de 1 a 10%). Por lo tanto, se debe especificar en las descripciones del producto el método analítico utilizado. Aunque internacionalmente existen métodos analíticos recomendados muchos fabricantes utilizan sus propios métodos de análisis. Un punto en común de éstos métodos es que la enzima se incuba con una proteína (hemoglobina o caseína) por un cierto periodo de tiempo bajo condiciones estándar. Se determina la cantidad de productos de hidrólisis espectrofotométricamente, ya sea directamente utilizando luz ultravioleta o después de unirse con un reactivo de color como el reactivo de Folin Ciocalteu o ácido trinitrobenceno sulfónico.

Algunas veces, la adición de componentes típicos de detergente, tales como tripolifosfato de sodio a la mezcla, se especifica con el fin de alcanzar un análisis llamado funcional. Sin embargo, ésta práctica es de limitado valor a causa de las grandes variaciones en las formulaciones de detergentes.

Generalmente el fabricante garantizará una cierta estabilidad de almacenaje bajo condiciones específicas, por ejemplo, una pérdida de actividad de menos del 10% durante el primer año de almacenamiento. También debe establecer los datos de estabilidad de la enzima en sus formulaciones con el fin de asegurar una satisfactoria vida de anaquel del producto terminado (5).

También las enzimas deben cubrir ciertas especificaciones en consideración a la seguridad y facilidad de manejo, incluyendo ausencia de materiales tóxicos y bacterias patógenas, así como un adecuado tamaño de partícula y densidad (5).

Las enzimas detergentes deben cumplir con estrictas especificaciones de producto que garanticen su baja contaminación bacteriana similares a los requerimientos para los aditivos alimenticios (125).

#### IV.7 Aplicaciones de detergentes enzimáticos.

Los primeros detergentes enzimáticos fueron destinados inicialmente al lavado de ropas de trabajo excesivamente manchadas, tales como aquellas provenientes de la industria del pescado, mataderos, panaderías y hospitales. Las manchas sobre este tipo de ropa contienen un elevado porcentaje de proteína, por eso es lógico el uso de enzimas proteicas para removerlas. Sin embargo, las manchas que contienen proteínas también se presentan frecuentemente en el lavado de ropa doméstico. Esto se debe a que aún en baja concentración, una proteína puede actuar como ligando o fijador de otros componentes haciendo difícil la completa eliminación de la mancha.

La naturaleza catalítica de las reacciones enzimáticas (dependientes del tiempo) permite sugerir que las enzimas podrían ser más efectivas en procesos de remojo, en donde se contaría con amplio tiempo para la actuación de la enzima. Sin embargo, la experiencia ha demostrado, que en muchos casos la digestión leve de la proteína es suficiente para solubilizar a la mancha y las enzimas detergentes disponibles son capaces de producir este efecto dentro del tiempo disponible en un ciclo de

lavado normal de una maquina. Es por lo tanto, racional utilizar enzimas en detergentes domésticos ordinarios, así como en agentes de remojo.

Existe una técnica reciente, la cual ha demostrado resultados prometedores llamada pre-manchado. Antes del lavado las secciones particularmente sucias de las prendas, tales como cuellos y puños de camisas se humedecen con un agente de lavado que es un líquido enzimático no diluido. La elevada concentración local de la enzima y del agente de lavado que se alcanza, ejerce un fuerte efecto sobre las manchas que pueden ser eliminadas por procedimientos de lavado ordinario (5).

#### Lavado de vajillas.

Un problema común en máquinas lava vajillas es causado por residuos de alimentos conteniendo almidón, por ejemplo de puré de papa, harina de avena o spaghetti.

Este problema puede superarse por la utilización de un detergente conteniendo una amilasa estable al calor y alcalina. Sin embargo, es generalmente necesaria una reformulación del detergente, ya que las enzimas comúnmente disponibles son destruidas por el cloro activo, un componente normal de polvos para máquinas lava vajillas. Además la alcalinidad del detergente tendría que ser un poco reducida (5).

#### Detergentes de lavandería de servicio pesado.

Como regla general no existen requerimientos especiales de formulación cuando se incluyen enzimas en los detergentes de servicio pesado. Con base en la actividad enzimática de 1.5 Unidades Anson/g la concentración de enzima de los detergentes de lavandería europeos está normalmente en el rango de 0.7 a 1.2 %. Durante el periodo entre 1968 y 1971, los productos



detergentes de Estados Unidos incluyeron enzimas en niveles bajos, comúnmente entre 0.25 y 0.5 %. Recientemente existe una tendencia hacia cantidades mayores que puede deberse a dos factores: temperaturas bajas de lavado y niveles reducidos de tripolifosfato de sodio en los detergentes. La actividad enzimática se reduce 50% por aproximadamente cada 10°C de descenso en la temperatura de lavado.

Las condiciones europeas de lavado son especialmente adecuadas para la acción de una enzima detergente, debido a que la relación tiempo-temperatura es tal, que la temperatura del agua de lavado se incrementa de 25 a 90°C en 35 minutos, la enzima puede permitirse un tiempo amplio de reacción sobre la mancha antes de que se alcancen los 60°C. De aquí en adelante, la enzima es inactivada por el calor gradualmente y por el peróxido de hidrógeno del perborato de sodio, el cual comienza a ser activo cada vez más.

En Estados Unidos las condiciones de agua de lavado son de 11 a 15 minutos a 45-55°C. Sin embargo, las temperaturas de lavado varían considerablemente de una región del país a otra, así como de una carga de lavado a otra dentro del mismo lavado doméstico.

En la figura 24 se muestra el efecto de una enzima proteolítica altamente alcalina derivada de *Bacillus* en presencia de mezclas de tripolifosfato de sodio, carbonato de sodio y citrato de sodio. El efecto fue medido utilizando el método de prueba de lavado de la Cosmetic Speciality Manufacturers Association (CSMA) sobre EMPA 116 (sangre, leche y tinta sobre algodón 100%) (126, 127).

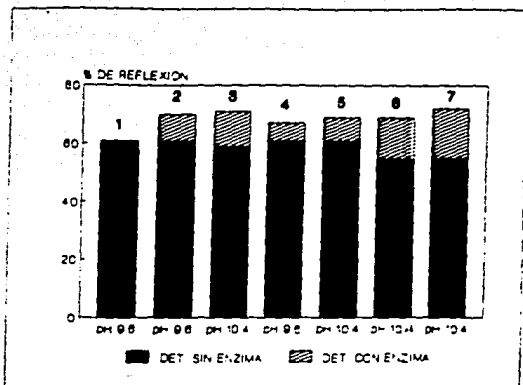


FIG. 24 Efecto de la enzima en formulaciones con cantidades reducidas de fosfato. Método de prueba CSMA, ropa de prueba EMPA 110, detergente estándar con contenido mínimo de fosfato de 40%, concentración  $Zg/l$ . 1 40NSTP. 2 y 3 20NSTP.  $20\% Na_2CO_3 + 0.3\%$  de proteasa. 4 y 5 20NSTP 20nitrato de sodio + 0.3% de proteasa. 6 12NSTP 28%  $Na_2CO_3 + 0.3\%$  de proteasa 7 12NSTP 28%  $Na_2CO_3 + 0.4\%$  de proteasa (PB).

La acción de la enzima sobre las manchas de proteína puede ser utilizada en detergentes enzimáticos bajo condiciones de lavado de agua fría a condición de que haya un ciclo previo de remojo al ciclo de lavado.

#### Productos especiales.

En los años recientes ha habido un crecimiento en productos de lavandería de pre-tratamiento. Entre éstos están los productos mejoradores del lavado.

Generalmente estos productos tienen la finalidad de realizar la alcalinidad, el ablandamiento de agua y la acción blanqueadora y removedora de manchas.

En Estados Unidos los productos de pre-remojo son productos enzimáticos (120, 128).

Otra área de interés en el campo de las especialidades son los llamados agentes pre-sacan manchas. Estos pueden dividirse además en los de base acuosa y en los sistemas con base en disolventes no acuosos. Los primeros están designados generalmente para proteínas y un grupo de manchas compuestas de pigmentos vegetales; y los segundos están dirigidos a manchas con base en grasas y aceites.

En estos productos especiales se utilizan enzimas proteolíticas y amilolíticas, con excepción de los pre-lavadores líquidos con base en disolventes no acuosos, ya que las enzimas son proteínas solubles en agua.

También se ha reportado la aplicación de un sistema dual de enzimas para la remoción de la placa dental de dentaduras. Este sistema requiere el uso de una proteasa bacteriana en combinación con una enzima fúngica (mutanasa) bajo condiciones de pH medianamente ácidas (129, 130, 131).

#### IV. 8 Métodos analíticos y de prueba para evaluar la eficiencia de lavado.

Generalmente la evaluación de la eficiencia de lavado de los detergentes se lleva a cabo en 3 pasos:

1. Selección de pruebas de laboratorio.
2. Pruebas de empaque en laboratorio y campo.
3. Pruebas prácticas de campo.

Las pruebas seleccionadas para el laboratorio, se llevan a cabo en aparatos como el Terg-O-Tometer y Launder-Ometer (132). Estos modelos simulan a los

procesos de lavado en máquinas lavadoras domésticas del tipo de agitador y tambor respectivamente. La ventaja de utilizar modelos de lavado es que se tiene mucho mayor capacidad de prueba comparada con la lavadora doméstica. De este modo el Ter-O-Tometer puede sostener 4 subsistemas a un mismo tiempo y el Launder-Ometer 2 (133).

En estas pruebas preliminares de laboratorio se lleva a cabo una evaluación de diferentes parámetros, tales como tipo de enzima y concentración, dureza del agua, temperatura, tipo de mancha, etc.

Después en el desarrollo del proceso, se podrán confirmar estas evaluaciones mediante las pruebas prácticas y de empaque. Estas pruebas se ejercen con controles adecuados en máquinas lavadoras domésticas con prendas y otros artículos manchados bajo condiciones actuales de uso.

Para las evaluaciones de laboratorio se utilizan diferentes tipos de manchas de prueba (121). La composición de la mancha depende del tipo de enzima bajo el cual se realizará la evaluación. Para enzimas proteolíticas se usan manchas de sangre más leche, cocoa, huevo, pasto, etc. Estas sustancias se aplican a varios textiles como algodón, algodón-poliéster y poliacrílicos. Algunos de estos materiales de prueba están disponibles comercialmente, como el conocido material de prueba EMPA 116 (manchado con sangre, leche y tinta india), mientras que otros se desarrollan y producen en el laboratorio (126).

## V . FORMULACIONES DE DETERGENTES ENZIMATICOS

### Mezclado de enzimas en polvos detergentes.

En la fabricación de detergentes enzimáticos en polvo se deben considerar algunos aspectos tales como : la sensibilidad de las enzimas al calor y a la humedad, así como aspectos de seguridad. Generalmente el granulado enzimático se agrega al detergente terminado por separado junto con otros componentes termolábiles como perborato de sodio y perfume por ejemplo, inmediatamente antes del empaquetado.

Los productos más concentrados ( aquellos que se utilizan en un nivel menor al 1% en peso del detergente ) deben mezclarse dentro del detergente mediante un procedimiento por pasos, a menos que esté disponible un sistema de microdosificación.

En el primer paso se hace una pre-mezcla por ejemplo, de enzima y tripolifosfato de sodio, en una proporción de aproximadamente 1:10 en un mezclador de doble cono como el mezclador Lódige y otro equipo mezclador adecuado.

El segundo paso del proceso de mezclado (la adición de la pre-mezcla al polvo detergente) puede llevarse a cabo por medio de un sistema similar al que se muestra en la figura 25.

La pre-mezcla se alimenta por medio de una tolva vibratoria a una banda transportadora corta. La velocidad de alimentación se ajusta por medio de una balanza automática continua que controla a la puerta corrediza de la tolva. Desde la banda la pre-mezcla se transfiere a un transportador que lleva al polvo detergente. En éste punto los dos componentes necesitan sólo un breve mezclado final (por ejemplo en un mezclador

continuo del tipo de tornillos) antes de transferirlos a las máquinas de empaquetado.

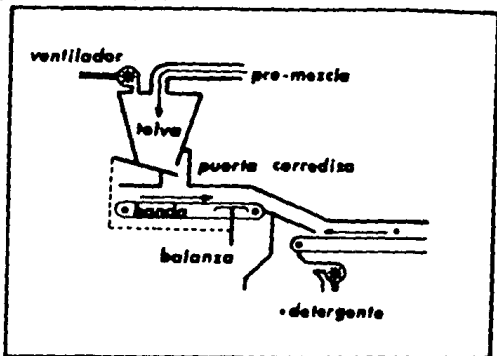


FIG. 25. Equipo típico para el mezclado industrial de detergentes (5).

Alternativamente, el mezclado podría tener lugar en un mezclador continuo directamente antes de que el transportador lleve al detergente a las máquinas de empaque.

Es esencial que todo el equipo sea a prueba de polvo y que sea provista una ventilación efectiva en la fábrica del detergente (5).

#### Composiciones acuosas enzima-detergente.

Las combinaciones enzima-detergente se han vendido como sólidos o en forma de soluciones que no son estables durante el almacenamiento, ya que la enzima pierde su actividad gradualmente. Es debido a esto que se han estudiado nuevas posibilidades para fabricar una combinación enzima-detergente que sea adecuada para su

utilización.

Landwerlen (11) preparó una formulación acuosa estable de una enzima adecuada para utilizarse en combinaciones enzima-detergente, se trata de una formulación acuosa de una proteasa o de una mezcla proteasa-amilasa y un alcohol polihídrico que contiene también un detergente.

Las proteasas utilizadas fueron aquellas enzimas compatibles con detergentes, que son activas en medios alcalinos y débilmente ácidos con un pH mínimo de 6, teniendo preferencia las proteasas derivadas de *Bacillus subtilis*. La concentración de enzima utilizada fue de 0.001 a 3.0% en peso basada en la formulación acuosa total.

Los alcoholes polihídricos utilizados contenían arriba de 6 átomos de carbono y de 2 a 6 grupos hidroxilo, tales como: etilén glicol, propilén glicol, 1,3-butilén glicol, 1,6-hexilén glicol; y también los glicoles polialkilénicos en donde el grupo alquilénico contenía arriba de 6 átomos de carbono, por ejemplo, polietilén glicol, polipropilén glicol, etc. El alcohol polihídrico debió ser soluble en agua al menos para diluir 30 g en 100 partes de agua.

Los componentes preferidos fueron propilén glicol y glicerina aunque otras sustancias dentro de ese grupo sean igualmente efectivas. La concentración de alcohol fue de 5 a 60%.

Pueden utilizarse también mezclas de estos alcoholes. El detergente puede ser simple o una combinación de surfactantes aniónicos, no iónicos o anfotéricos.

En el siguiente ejemplo se muestra una composición que fue incorporada dentro de una formulación detergente en aerosol, (ejemplo 1).

## Ejemplo 1:

| Componente   | %     |
|--|-------|
| Polióxietileno (10 a 11 unidades) nonilfenol                                 | 3.5   |
| Polióxietileno (30 unidades) nonilfenol                                      | 2.25  |
| Polióxietileno (4 unidades) nonilfenol                                       | 2.75  |
| Antaron FC-34 (una solución acuosa al 87% de alkil amida sulfonato de sodio) | 4.0   |
| Monosteárate de glicerilo (90% monoéster)                                    | 2.0   |
| Ácido cítrico  | 0.09  |
| Propilén glicol  | 20.0  |
| Blanqueadores ópticos  | 0.85  |
| Proteasa alcalina  | 1.0   |
| Agua   | 63.56 |

(31).

Esta composición se aplicó como una espuma a diferentes tipos de manchas que fueron aplicadas a muestras de tejidos de una gran variedad de materiales.

Después de 30 minutos , el tejido se lavó por 15 minutos en un litro de agua a 130°F (54.4°C), conteniendo 1.5 g de un detergente (alkil sulfonato de sodio ). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19 , en la cual, la calificación de la limpieza se basa en la escala del 1 al 10, en donde 1 indica la ausencia completa de mancha y 10 indica un tejido en el cual ésta no ha sido eliminada (31).



TABLA 19. Resultados de la aplicación de la fórmula detergente en diferentes manchas.

| Mancha                         | Tratamiento con la fórmula seguido por un lavado detergente. |           | Lavado con detergente solamente. |            |
|--------------------------------|--|-----------|----------------------------------|------------|
|                                | Algodón  | D/algodón | Algodón                          | D/algodón* |
| Higado                         | 1  | 1         | 6                                | 3          |
| Te                             | 3  | 1         | 7                                | 5          |
| Café                           | 1  | 1         | 5                                | 4          |
| Jugo de uva                    | 1  | 1         | 2                                | 4          |
| Grasa                          | 3  | 4         | 8                                | 8          |
| Chocolate                      | 3  | 1         | 5                                | 2          |
| Mostaza                        | 4  | 1         | 8                                | 2          |
| Salsa francesa                 | 2  | 1         | 6                                | 7          |
| Ropa homogénea-mente manchada. | 8  | 2         | 5                                | 7          |

\*Dacrón

(31).

Weber (32) preparó también una composición líquida limpiadora conteniendo enzimas estabilizadas. Esta composición es una solución acuosa que contiene de 10 a 50% en peso de sólidos e incluye constituyentes detergentes, agentes de superficie activa, un sistema enzimático derivado de *Bacillus subtilis* y un agente estabilizador de la enzima. Los agentes estabilizantes comprenden sales de sodio o potasio altamente solubles en agua, o hidroxialcoholes solubles en agua que permiten que la solución se almacene por periodos de tiempo prolongados sin sufrir desactivación de las enzimas.

Esta composición detergente tiene la siguiente formulación en por ciento en peso:

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| Constituyentes detergentes     | 2-25%           |
| Agente de superficie activa    | 5-30%           |
| Agente estabilizante de enzima | 5-40%           |
| Sistema enzimático             | 0.1-5%          |
| Agua                           | Diluir al 100%. |

Los constituyentes detergentes pueden ser fosfatos inorgánicos solubles en agua, ácido nitrilo tetraacético, ácido etilén diamino tetraacético, la mezcla de metasilicato de sodio y carbonato de sodio. Algunos ejemplos de fosfatos que pueden utilizarse son: trisodio fosfato, tetrasodio pirofosfato, hexametáfosfato de sodio, tripolifosfato de sodio y otros. Pueden emplearse con iguales resultados los derivados de potasio de los fosfatos antes mencionados.

Algunos ejemplos de agentes de superficie activa que se pueden utilizar son alquil sulfatos, glicoles acetilénicos y alquil aril sulfonatos muy solubles en agua, particularmente aquellos que tienen alrededor de 8 a 15 átomos de carbono en el grupo alquilo.

Se prefiere utilizar el detergente alquil bencen sulfonato por su efectividad óptima.

Los agentes estabilizantes comprenden sales altamente solubles en agua o hidroxialcoholes solubles en agua. Las sales solubles pueden ser sulfatos o cloruros de sodio o potasio, mientras que los hidroxialcoholes pueden ser glicerol, glicoles alquilénicos, en los cuales el grupo alquilénico contiene de 2 a 8 carbonos, tales como etilén glicol, propilén glicol, butilén glicol, hexilén glicol, sorbitol y otros.

Dependiendo de la naturaleza de los ingredientes activos el pH de la solución es generalmente de 7 a 11, y el sistema enzimático utilizado es una proteasa alcalina producida por una cepa seleccionada de *Bacillus subtilis*.

La proteasa alcalina se emplea en una concentración en el rango de 500 a 10000 Unidades Delft por gramo de solución (32)

#### Detergente líquido de servicio pesado.

A finales de 1981, Nordtend, una fábrica de detergentes sueca introdujo al mercado un detergente de lavado líquido bajo el nombre de "Flytande Tvättmedel".

El detergente es adecuado para toda clase de lavado, a una temperatura de 40 a 60°C para lavado a mano y puede utilizarse también a temperaturas tan elevadas como 95°C, que es la temperatura normal de lavado para fibras blancas en Europa.

El detergente líquido es un detergente concentrado que contiene surfactantes, enzima, perfume, blanqueadores ópticos y agentes secuestrantes.

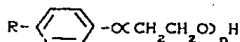
#### Ingredientes:

a) Surfactantes. La detergencia es provista por una mezcla de surfactantes no iónicos y aniónicos en una proporción de aproximadamente 2:1. El etoxilato de alquilfenol con un número adecuado de unidades etoxi tiene el mejor funcionamiento a una temperatura de 50 a 60°C. El alquilfenol con carácter lipofílico tiene un buen funcionamiento de lavado a una temperatura de 30 a 60°C. El alcohol polioxietilénico es un surfactante no iónico que se utiliza como hidrófilo para los otros surfactantes. Este también actúa como un ajustador de viscosidad y tiene su mejor poder de lavado a una temperatura mayor de 50°C.

Como componente aniónico se utilizan un sulfonato alcano de sodio secundario (SAS) y una mezcla de ácido graso (neutralizada con etanolamina). Está presente un pequeño exceso de etanolamina para mejorar la detergencia y las propiedades físicas del sistema (figura 26).

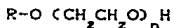
## DETERGENTES NO IÓNICOS

Alkilfenol etoxilato



$$R = \text{C}_9\text{H}_{19}, n = 9 \text{ a } 10 \text{ o } 6$$

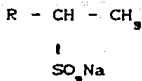
Etoxilatos alcohol alifáticos



$$R \text{ es predominantemente de } \text{C}_{10} - \text{C}_{18}, n = 10.$$

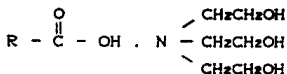
## DETERGENTES ANIÓNICOS

Alcano sulfonato de sodio



$$R = \text{C}_{12} - \text{C}_{18}$$

Sal de trietanolamina de ácido graso



$$R = \text{C}_{10} - \text{C}_{18}$$

FIG. 26 Detergentes aniónicos y no iónicos

b) Enzima. La enzima está presente en el detergente líquido en una suspensión, ésta tiene un rango tolerante de actividad e hidroliza a todas las sustancias de origen protéico, tales como sangre, leche y huevo.

Un procedimiento especial asegura que la actividad de la enzima es protegida contra la acción de los componentes del detergente durante el almacenaje. Las pruebas han

mostrado que después de un año de almacenaje a temperatura ambiente, la actividad de la enzima del detergente líquido decrece 40%.

c) Agente blanqueador fluorescente. Los agentes blanqueadores fluorescentes se incluyen en muchos productos de lavandería para incrementar la blancura percibida en los tejidos. Estos agentes aumentan la luminosidad absoluta de los tejidos por absorción de luz ultravioleta y por la conversión de ésta a luz visible azul blanca. Para éste detergente se encontró apropiado un derivado del estilbena, el cual se disuelve exitosamente en el sistema (figura 27) (40).

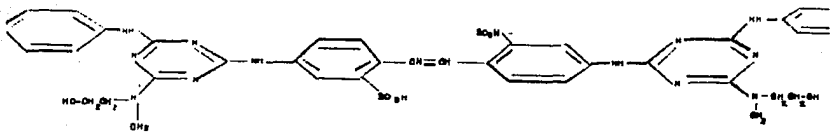


FIG. 27 Agente blanqueador fluorescente

d) Compuesto. En sistemas líquidos las sales del ácido fosfónico son superiores en efectividad a los polifosfatos y además son significativamente más estables en agua.

e) Disolventes y perfume. El detergente líquido de Nordtend contiene 5% de alcohol y una pequeña cantidad de perfume. El perfume se incorpora para enmascarar olores desagradables y el alcohol se agrega con el fin de perfeccionar las propiedades físicas y como agente preservativo.

En la tabla 20 se presenta la composición completa del detergente líquido de servicio pesado.

TABLA 20. Composición química del detergente líquido de lavandería.

| Componente                      | Porcentaje |
|---------------------------------|------------|
| Surfactante no iónico           | 30.0       |
| Surfactante aniónico            | 5.0        |
| Jabones y ácidos grasos         | 10.0       |
| Etanolamina (exceso)            | 6.0        |
| Agente secuestrante             | 1.0        |
| Agente blanqueador fluorescente | 0.3        |
| Enzima                          | 0.5        |
| Alcohol                         | 5.0        |
| Perfume y agua                  | 42.0       |

Contenido activo = 57%; pH = 8.5; viscosidad = 200 cp (40)

A continuación se presentan otros ejemplos de formulaciones de detergentes líquidos enzimáticos.

#### Detergentes líquidos.

##### Ejemplo 1:

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Surfactantes no iónicos     | 10-40%    |
| Surfactantes aniónicos      | 5-10 %    |
| Solubilizador               | 5-15 %    |
| Agente secuestrante         | 0-15 %    |
| Agua                        | max. 45 % |
| Blanqueador óptico, perfume | 0.1-0.5%  |
| Suspensión de Espearasa     | 0.4-0.8%  |
| pH 7.0-9.5                  | (5).      |

**Detergente de servicio pesado (para propósitos generales).**

| <u>Componente</u>              | <u>%</u>        |
|--------------------------------|-----------------|
| Tripolifosfato de sodio        | 20- 40          |
| Perborato de sodio             | 15- 30          |
| Surfactantes aniónicos         | 7 - 15          |
| Silicato de sodio              | 4 - 8           |
| Jabón                          | 2 - 4           |
| Surfactantes no iónicos        | 1 - 5           |
| Carboximetil celulosa de sodio | 0.5- 1          |
| Blanqueadores ópticos, perfume | 0.4-0.8         |
| Alcalasa 1.5T/Espesasa 4.0T    | 0.4-0.8         |
| Sulfato de sodio, agua         | balance al 100% |
| pH 9.5-10.5                    | (5).            |

**Detergente lava-vajillas.**

| <u>Componente</u>       | <u>%</u> |
|-------------------------|----------|
| Bicarbonato de sodio    | 40-60    |
| Tripolifosfato de sodio | 20-50    |
| Metasilicato de sodio   | 10-30    |
| Surfactante             | 3-10     |
| Termamyl 60G            | 1- 3     |
| pH 9-9.5                | (5).     |

**Detergente en polvo de servicio pesado de Europa Occidental.**

| <u>Componente</u>              | <u>%</u> |
|--------------------------------|----------|
| * Surfactantes aniónicos       | 2 -20    |
| no iónicos                     | 0.5-6    |
| jabón                          | 1 - 5    |
| Compuestos STP                 | 30-50    |
| o zeolita                      | 15-18    |
| STP                            | 20-22    |
| Blanqueador perborato de sodio | 20-30    |
| Enzimas Maxatasa P 440.000 o   |          |
| Maxacal F 400,000              | 0.3-0.8  |
| Derivados de celulosa          | 0.5-2.0  |
| Blanqueadores ópticos          | 3 - 5    |
| Perfumes                       | 0.1-0.3  |
| * 10-15%                       | (8).     |

**Detergente en polvo de servicio pesado de Estados Unidos.**

| <u>Componente</u>                      | <u>%</u> |
|--|----------|
| Surfactantes aniónicos                 | 14.0     |
| Surfactantes no iónicos                | 9.2      |
| Jabón                                  | 1.0      |
| Silicato de sodio                      | 20.0     |
| Carbonato de sodio                     | 20.0     |
| Sulfato de sodio                       | 28.8     |
| Carboximetil celulosa                  | 2.0      |
| Perfume, colorante, blanqueador óptico | 1.0      |
| Maxatasa/Maxacal                       | 1.0      |
| Agua                                   | 3.0      |
|  | (8).     |



Detergente enzimático europeo.

| Componente                        | %    |
|-----------------------------------|------|
| Tripolifosfato de sodio           | 38.0 |
| Sodio LAS (a) (40%)               | 25.0 |
| Perborato de sodio tetrahidratado | 25.0 |
| Alkilfenol etoxilato (11 EO) (b)  | 3.0  |
| Jabón                             | 3.0  |
| Sulfato de sodio                  | 2.5  |
| Carboximetil celulosa (59%)       | 1.6  |
| Metasilicato de sodio             | 1.0  |
| Alcalasa 1.5M                     | 0.9  |
| Total                             | 100  |

(a) Alcano sulfonato lineal (surfactante)

(b) Promedio de 11 unidades de óxido de etileno

(127).

Detergente enzimático de Estados Unidos.

| Constituyente                   | Composición en % |             |
|---------------------------------|------------------|-------------|
|                                 | con fosfato      | sin fosfato |
| Sodio LAS                       | 10-20            | 10-22       |
| Sebo de alcohol sulfato         | 0-10             |             |
| Sebo de éter sulfato            | 0-30             | 0-12        |
| Tripolifosfato de sodio         | >34              |             |
| Carbonato de sodio              |                  | 20          |
| Silicato de sodio               | >12              | >20         |
| Carboximetil celulosa de sodio. | 0-0.5            | 0-1.0       |
| Blanqueadores fluorescentes     | 0.1-0.5          | 0.1-0.5     |
| Proteasa alcalina               | 1.0              | 1.25        |
| Sulfato de sodio y perfume      | balance          | balance     |

(127).

## Detergentes con mezclas de enzimas.

El proceso desarrollado por Inamorato (33) proporciona una composición de un detergente enzimático que incluye una mezcla de un detergente no catiónico de superficie activa, una  $\alpha$ -amilasa bacteriana y una proteasa alcalina, la cual contiene de 100,000 a 400,000 unidades  $\alpha$ -amilasa Novo de amilasa, por unidad Anson de proteasa alcalina. Se encontró que utilizando una cantidad de  $\alpha$ -amilasa, se reduce la cantidad de proteasa (que es más cara) necesaria para la eliminación de las manchas, y el costo del contenido enzimático del detergente se reduce considerablemente, a la vez que se conserva la efectividad enzimática del producto.

La subtilopeptidasa A, una proteasa alcalina, es especialmente adecuada para utilizarse en este detergente. Esta enzima se vende bajo el nombre de Alcalasa, que presenta mayor actividad a pH de 8 a 9. La  $\alpha$ -amilasa utilizada en esta formulación se puede obtener por la fermentación de *Bacillus subtilis*. Esta preparación contiene otra enzima mezclada con la amilasa (por ejemplo, una proteasa neutra).

La cantidad de la mezcla enzimática presente en la composición detergente depende de la cantidad de detergente que se añade al agua de una carga de lavado.

Para un detergente destinado a utilizarse en concentraciones de 0.15% en el agua de lavado de una máquina lavadora doméstica, la cantidad de mezcla enzimática adecuada, es la provista por 1 Unidad Anson de proteasa alcalina por cada 100 a 500 gramos de composición detergente. La mezcla contiene preferentemente un agente aniónico de superficie activa sulfonado, tal como alkilbencen sulfonato. También pueden estar presentes agentes de superficie activa no iónicos o anfotéricos

solos o junto con el detergente aniónico.

Ejemplo:

Se prepara una composición granular por rociado en seco de una suspensión acuosa conteniendo los siguientes ingredientes : 10% de tridecylbencen sulfonato de sodio (lineal); 2% de producto etoxilado hecho a partir de óxido de etileno y alcoholes primarios de cadena larga de  $C_{12}$  a  $C_{15}$  átomos de carbono. (el producto etoxilado contiene 11 moles de oxietileno por mol de alcohol) ; 2% de jabón de sodio de una mezcla de 3 partes de sebo de ácidos grasos y una parte de ácidos grasos de aceite de coco ; 34% de fosfatos; 7% de silicato de sodio ( $Na_2O:SiO_2$  en razón molar de 1:2.35) ; 0.15% de azul ultramarino ; 0.5% de carboximetil celulosa de sodio ; 0.2% de alcohol polivinílico hidrosoluble ; 0.44% de abrillantadores fluorescentes ; 0.023% de azul brillante ; 0.01% de un antioxidante fenólico y el resto de sulfonato de sodio y una pequeña cantidad de perfume.

La suspensión se prepara por agitación vigorosa a una temperatura aproximada de  $80^{\circ}C$  , el fosfato se agrega al último justo antes del rociado. La suspensión se rocía dentro de una torre alimentadora, a contracorriente con aire caliente. El aire entra por la base de la torre a una temperatura de  $290$  a  $310^{\circ}C$  y sale a una temperatura de  $80$  a  $105^{\circ}C$  , formándose así los gránulos o grupos de gránulos de la suspensión.

Los gránulos resultantes se mezclan al 0.25% de su peso con una preparación en polvo de la proteasa alcalina ( Alcalasa, que contiene 1.5 Unidades Anson de proteasa por gramo, medidas a pH de 7.5 ) y con 0.25% de su peso con una  $\alpha$ -amilasa ( conteniendo 360.000 Unidades Novo por gramo, junto con una cantidad menor de aproximadamente 0.4 a 0.5 Unidades Anson por gramo de una proteasa neutra ).

El producto resultante es altamente eficaz en pruebas prácticas de lavado en máquinas automáticas, utilizando 0.15% de producto, agua con una dureza aproximada de 100 ppm, 49°C (120°F) y ropa de algodón y fibras de polietileno. Los resultados son tan buenos como aquellos que se obtienen con otra composición idéntica que contiene el doble de Alcalasa (0.5%) y sin  $\alpha$ -amialsa (33).

## VI. FUTURO DE LOS DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Se prevee que se incrementará la atención en formulaciones de detergentes líquidos en respuesta al perfeccionamiento en los sistemas de máquinas de lavado. En menor extensión, se tenderá a alterar la composición de los detergentes, especialmente para obtener bajo contenido de fosfato y biodegradabilidad incrementada.

También se observará la reducción de la temperatura de lavado debido al ahorro en el consumo de energía, lo que dará oportunidad para la selección y presentación de nuevas enzimas, que proporcionarán un elevado funcionamiento catalítico entre 20 y 49°C.

Por otra parte, se espera un desarrollo de nuevos sistemas blanqueadores, eliminando así los métodos tradicionales de blanqueo.

Normalmente no hay enzimas completamente compatibles con aditivos para blanqueo, de modo que la enzima solamente puede ser útil en aquella fórmula que se utiliza en donde una etapa a baja temperatura precede a la liberación del agente de blanqueo.

Por lo tanto, ésta es una expectativa razonable para intentar encontrar enzimas que sean tolerantes a esos aditivos para dar un beneficio de limpiado en lavado de una sola etapa (5).

Para las amilasas, que actualmente se encuentran en el mercado de detergentes en porcentajes relativamente bajos, se anticipa una tendencia ascendente.

También se espera que se desarrollen nuevas enzimas proteolíticas asegurando gran estabilidad de almacenaje en detergentes líquidos de lavandería.

Las lipasas conocidas comúnmente son un poco inestables en formulaciones de detergentes, sin embargo su

uso tiene grandes perspectivas (8).

Es posible que se puedan desarrollar otras enzimas, tales como celulasas para fabricar suavizadores y oxidasas para propósitos de blanqueo (67).

Se espera que sigan desarrollándose nuevos tipos de detergentes enzimáticos, ya que la eliminación fácil y efectiva de manchas es una ventaja que éstas ofrecen y es un atributo preferido ampliamente por los consumidores.

Además, el mercado de detergentes es muy grande en Latinoamérica y seguirá creciendo paralelamente con el crecimiento de la población. ( la población total de Latinoamérica era en 1987 de aproximadamente 400 millones y se incrementa aproximadamente 2.5% por año ) (64).

Se calcula que en 1985 en Latinoamérica ( 33 países independientes) el consumo total de jabones de tocador y detergentes de lavandería domésticos fue de 2.8 millones de toneladas comparados con 2.4 millones de toneladas en Estados Unidos y 4.5 millones de toneladas en Europa Occidental. Del consumo total en Latinoamérica, 12% fue de jabones de tocador, 42.3% de barras detergentes y 45.7% de polvos detergentes.

El mercado de detergentes tiene un crecimiento anual del 2% en el volumen total de consumo, de 2.2 millones de toneladas en 1980 a 2.4 millones de toneladas en 1985, de modo que se observa un crecimiento constante, que a la vez demandará nuevas tendencias y mejoras en todos los tipos de productos incluyendo a los detergentes enzimáticos.

Si se examina la utilización de detergentes por país, se observa que México es por mucho el líder en tonelaje con arriba de 1/3 del volumen total latinoamericano (tabla 21).

TABLA 21. Tonelaje de consumo de detergentes en Latinoamérica (1985). (000 toneladas).

| Pais            | Detergentes | Barras | Total |
|-----------------|-------------|--------|-------|
| México          | 477         | 139    | 616   |
| Brasil          | 209         | 420    | 629   |
| Venezuela       | 153         | 20     | 173   |
| Argentina       | 70          | 106    | 176   |
| Colombia        | 44          | 139    | 183   |
| Guatemala       | 12          | 35     | 47    |
| Ecuador         | 12          | 52     | 64    |
| Rep. Dominicana | 5           | 30     | 35    |

(64).

Otro factor que permitirá el desarrollo de nuevos detergentes enzimáticos en México, es la tendencia que existe en este país y en Latinoamérica de llevar a cabo un remojo antes del lavado, que va desde 30 minutos hasta toda la noche, costumbre que permite a las enzimas una mejor actuación en la eliminación de las manchas y que es recomendada en las instrucciones de uso de los detergentes enzimáticos comunes actualmente.

Es posible especular que los detergentes enzimáticos del futuro podrán ser sistemas multienzimáticos, los cuales podrán incluir no sólo proteasas para manchas de proteína, sino también lipasas para manchas de aceites animales y vegetales, amilasas para manchas que contienen almidón y, posiblemente algunas otras enzimas de ambas categorías, hidrolasas y oxidasas (6).

## VII . CONCLUSIONES

De la información analizada se derivan las siguientes conclusiones:

1. Los detergentes enzimáticos ofrecen varias ventajas sobre los detergentes no enzimáticos, entre las que se encuentran: la mayor efectividad en la eliminación de manchas de origen bioquímico, mayor rapidez de desmanchado y por lo tanto, ahorro en el tiempo de lavado, ahorro de trabajo mecánico y ahorro de energía, ya que las enzimas pueden actuar aun a bajas temperaturas ( $20^{\circ}\text{C}$ ).

2. Para obtener mejores resultados en la utilización de detergentes enzimáticos con agua de lavado fría o tibia ( $15-40^{\circ}\text{C}$ ), es recomendable ejercer un pre-remojo que puede ir desde 2 horas hasta el tiempo que se considere conveniente según sea el grado de manchado de las prendas.

3. Si se ejerce el lavado con agua caliente ( $50-55^{\circ}\text{C}$ ), se incrementa la velocidad de desmanchado, aunque no es recomendable exceder esta temperatura, ya que las enzimas se desnaturalizan por calor.

4. En México no se acostumbra lavar con agua caliente, lo más común es llevar a cabo el lavado con agua fría o tibia, lo que asegura un ahorro de energía y también provoca que los principales fabricantes de detergentes enzimáticos recomienden en sus instrucciones ejercer un remojo antes del lavado a mano o en máquinas.



11. Los detergentes de lavandería, ya sean polvos o líquidos, ofrecen un mercado creciente que demanda innovaciones y mejoramientos en su función, por lo tanto, son también un amplio campo para la aplicación de enzimas alcalinas proteolíticas, amilolíticas y lipolíticas.

12. Actualmente se siguen desarrollando investigaciones para obtener nuevas proteasas, amilasas y lipasas útiles en formulaciones detergentes.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Aunstrup, K.: New developments in traditional enzyme products. En: Industrial and Clinical Enzymology. Vitale, L.,J., Simeon, V. (Eds.), Pergamon Press, New York, 1980, pp. 3-11.

2.- Edwards, H., Victor : Future directions in enzyme engineering. En: Biotechnol. & Bioeng. Symp. No. 3., Kendall, E., Pye, Wingard, L.,B. (Eds.), Plenum, New York, 1972, pp. 343-353.

3.- Kirk-Othmer., Encyclopedia of Chemical Technology., 2nd. Ed., Vol.5, John Wiley & Sons., Inc., New York, 1966, pp. 363-417.

4.- Gran Enciclopedia Ilustrada Circulo. Vol. 4, Circulo de Lectores, S.A., Plaza & Janés, S.A., Ed., Barcelona 1984, pp. 1202.

5.- Barfoed, H., C.: Detergents. En: Industrial Enzymology. Godfrey, T., Reichelt, J. (Eds.), Macmillan Publishers Ltd., Great Britain, 1983, pp. 284-293.

6.- Starce, C., A.: Detergents enzymes, past present and future. J. Am. Oil Chem. Soc., 60(5): 1025-1027, May 1983.

7.- Hasselberger, Francis, X.: Industrial uses of enzymes. En: Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes., Nelson-Hall, Chicago, 1978, pp. 49-52.

8.- Tilburg, R., Van : Enzymes in powdered and liquid detergents. En: Innovations in Biotechnology. Houwink, E., H., Vander Meer, R.,R. (Eds.), Progress and industrial microbiology Vol. 20, New York, 1984 , pp. 31-52.

9.- Mofett, J.,G., Hennig von, D.,H. Soaps, cosmetics, chemical specialities., Sept., 1981, pp. 29-57.

- 10.- Campbell, T., C., Falcone, J., S. Soaps, cosmetics, chemical specialities., March., 1978, pp. 33-58.
- 11.- N., N., Consumer's Research Magazine, April , 1978, pp. 24-29.
- 12.- Zuidweg, M., H., J., Bos, C., J., H. van Welzen. Biotechnol. Bioengin. 14, 1972, pp. 665-714.
- 13.- Nijenhuis, B., (to Gist-Brocades N.V.), U.S. patent 4,002,572, 1977.
- 14.- Raaff, G., H. Lecture Am. Oil Chem. Soc. Congress, Chicago, May, 1983, pp. 8-12.
- 15.- Maase, F., W., J., L. Lecture C.E.D./A.I.D., Barcelona, March, 1983, pp. 9-11.
- 16.- Starce, C., A. Soaps, cosmetics, chemical specialities, May, 1983, pp. 49-50F.
- 17.- Maase, F., W., J., L., Tilburg, R., Van: The benefit of detergents enzymes under changing washing conditions. J. Am. Oil Chem. Soc., 60(9): 1672-1675, Sep. 1983.
- 18.- Proteolytic enzymes for detergents. En: Industrial Enzymes Recent Advances. Jeanne, C., Johnson Park Ridge. (Eds.), N.J. Noyes Date. Chemical Technology Review No. 85, 1977, pp. 216-242.
- 19.- Fukumoto, J., Yamamoto, T., Tsuru, D., U.S. patent 3,838,009, September 24, 1974, (assigned to Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan).
- 20.- Villadsen, K., J., S., Vestberg, K., P., U.S. patent 3,960,865, June 1, 1976.
- 21.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., 1957.
- 22.- Aubert, J., P., Longin, R., Millet, J., U.S. patent 3,833,474, September 3, 1974, (assigned to Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (Anvar), France).

23. - Agricultural and Biological Chemistry, Vol. 30, 1966, pp. 651-58, 856-62, 1164-69, 1261-68; Vol. 31, 1967, pp. 330-35, 718-23.

24. - Tobe, S., Hirose, Y., Nakamura, Y., Mitsugi, K., U.S. patent 3,871,963, March 18, 1975, (assigned to Ajinomoto Co., Inc., Japan).

25. - Vroemen, A., J., U.S. patent 3,855,064, December 17, 1974, (assigned to Gist-Brocades N.V., Netherlands).

26. - Craveri, R., Manachini, P., L., Aragozzini, F., U.S. patent 3,813,319, May 28, 1974, (assigned to Società Italiana Resine SIR, SpA, Italy).

27. - Eygermans, P., J., U.S. patent 3,801,463, Apr. 2, 1974, (assigned to Koninklijke Nederlandsche Gist-En Spiritus-Fabriek NV, Netherlands).

28. - Nara, K., Katamoto, K., Ito, K., Ikeda, S., U.S. patent 3,846,240, November 5, 1974, (assigned to Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan).

29. - Win, M., H., De Salvo, Kenney, U.S. patent 3,858,854, January 7, 1975.

30. - Diehl, F., L., Zeffren, Milbrada, U.S. patent 3,944,479, March 16, 1976, (assigned to The Procter & Gamble Company).

31. - Landwerlen, R., G., Kritchevsky, U.S. patent 3,860,536, January 14, 1975, (assigned to CPC International Inc.)

32. - Weber, M., H., U.S. Patent Application (Published) B 458,819, April 13, 1976, (assigned to Midwest Biochemical Corporation).

33. - Inamorato, J., T., Hunter, U.S. patent 3,931,034, January 6, 1976, (assigned to Colgate Palmolive Company).

34. - Cooperman, I., N., U.S. patents 3,813,342, May 28, 1974 and 3,532,599 October 6, 1970.

35. - Aunstrup, K., Outtrup, H., Andresen, O., Dambmann, C. En: Terui, G. (Ed.), Proceedings IV International Fermentation Symposium, Kyoto, 1972.
36. - Aunstrup, K., Andresen, O., Nielsen, T.K. En: Peppler and Perlman (Ed.), Microbial Technology, New York, 1979.
37. - Buonocore, V., Caporale, C., et. al. J. Bact., 128, 1976, pp. 515.
38. - Outtrup, H., Aunstrup, K., Ed. Hasegawa, Proc. First Int. Congr. of IAMS, Vol. 5, 1974, pp. 204.
39. - Slott, S., Madsen, G., Norman, B.E., Ed. Pye and Wingard, Enzyme Engineering, 2, 1973, pp. 343.
40. - Palicka Jadwiga: Heavy-duty liquid detergent. J. Am. Oil Chem. Soc., 80(9): 1704-09, Sep, 1983.
41. - Bohak, Z., Sharon, N., (Eds.) Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes, Academic Press, New York, 1977.
42. - Gaden, E., (Ed.), Enzymatic conversion of Cellulosic Materials, Interscience, New York, 1976.
43. - Messing, R., A., (Ed.), Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Academic Press, New York, 1975.
44. - Ondarza, R., N. Biología Moderna, 8a. Ed., Trillas, México, 1986.
45. - Austrup, K.: Industrial production of proteolytic enzymes. En: Industrial Aspects of Biochemistry Part 1, Spencer, B. (Ed.), New York, 1974, pp. 135-38.
46. - Smith, N., Gordon, R., Clark, F.: Aerobic Sporeforming Bacteria, Washington, 1952.
47. - Welker, N., Campbell, L.: Unrelatedness of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amiloliquefaciens*. J. Bact. 94, 1967, pp. 1124.

48. - Keay, L., Moser, P., Wildi, B.: Proteases of the genus *Bacillus*. II Alkaline Proteases. *Biotech. Bioeng.* 12, 1970, pp. 213.
49. - Markland, F., Smith, E. : Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. *The Enzymes*. 3rd. Ed. Vol. 3, 1971, pp. 581.
50. - Murray, E., Prince, M.: Process for preparing milk coagulating enzyme complex, U.S. patent 3,507,750, 1970.
51. - Niwa et al: Protease production by microorganisms, U.S. patent 3,669,844, 1971.
52. - Kiyoshi, Kisai: Method for the production of alkaline protease. Danish patent application 3106/71, 1971.
53. - Guntelberg, A. V.: A method for the production of the plakalbuminforming proteinase from *Bacillus subtilis*. *Compt. rend. lab. Carlsberg, Ser Chim.* 29, 1954, pp. 27.
54. - Jensen, D.E.: Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two-stage fermenter. *Biotech. Bioeng.* 14, 1972, pp. 847.
55. - Keay, L.: Purification and recovery of alkaline protease using cationic-exchange resin. U.S. patent 3,623,955, 1971.
56. - Dambmann, C., Holm, P., Jensen, V., Nielsen, M.: How enzymes got into detergents. *Developments in Industrial Microbiology* 12, 1971, pp. 11.
57. - Cerletti Paolo: Industrial application of enzymes: present and future an overview. En: *Industrial Aspects of Biochemistry Part 1*, Spencer B. (Ed.), New York, 1974, pp. 135-38.
58. - Bround, G.B., Manecke, Wingard, L. *Enzyme Engineering* Vol. 4, Plenum Press, New York, 1978.

59. - Ghose, T., Fiechter, A., Blakebrough, N. Advances in Biochemical Engineering Vol. 10, Springer Verlag, Berlin, 1978.

60. - Cheetham, P.S.J.: The applications of enzymes in industry. En: Handbook of Enzyme Biotechnology. Wiseman, A. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd., New York, 1985, pp. 274-373.

61. - Whitaker, J.R. Food related enzymes. Amer. Chem. Soc. Washington, 1974.

62. - Wiseman, A.: Enzyme and Fermentation Technology. Ellis. Horwood, Ltd., Chichester, 1977.

63. - Rothgeb, T., Goodlander, B., Garrison, P., Smith, L.: The raw material, finished products and dust pad analysis of detergent proteases using a small synthetic substrate. J. Am. Oil Chem. Soc., 65(5): 808-10, 1988.

64. - Hidalgo Alberto F.: Detergents in Latin America. J. Am. Oil Chem. Soc., 64(2): 264-68, 1987.

65. - Murata Moriyasu: Trends in the soap and detergent industry in Japan. J. Am. Oil Chem. Soc. 64(2): 260-63, 1987.

66. - Geng Yong Q: The detergent industry in China. J. Am. Oil Chem. Soc. 64(2): 257-59, 1987.

67. - Brenner Theodore E.: Soaps and detergents: North American trends. J. Am. Oil Chem. Soc. 64(2): 251-56, 1987.

68. - Cutler, W.G., Davis, R. Detergency Theory and Test Methods Part 1. Surfactant Science Series Vol 5, Dekker Marcel (Ed.) I.N.C., New York, 1972, pp. 7-29.

69. - Wolnak, B.: Survey of the enzyme industry. En: Enzyme Engineering. Slott, S., Madsen, G. (Eds.), Pye and Wingard, Vol 2, pp. 369-73., 1973.

70. - Dunnill, P. and Lilly, M. : Recent developments in enzyme isolation processes. *Enzyme Engineering* 2: 43-45, 1973.

71. - Dunnill, P. and Lilly, M. *Biotech. Bioeng. Symp.* No. 3: 97, 1972.

72. - Robinson, P., Dunnill, P., Lilly, M. *Biochem. Biophys. Acta* 285: 28, 1972.

73. - Currie, J., Dunnill, P., Lilly, M. *Biotech. Bioeng.* 15: 725, 1972.

74. - Gray, P., Dunnill, P., Lilly, M. *Biotech. Bioeng.* 15: 309, 1973.

75. - Robinson, P., Dunnill, P., Lilly, M. *Biotech. Bioeng.* 15: 603, 1973.

76. - Hirotooshi Samejima: Recent trends of enzyme engineering in Japan. *Enzyme Engineering* 2, 363-67, 1973.

77. - Wingard Lemuel, B.: Developments and challenge of enzyme engineering. *Enzyme Engineering* 2, 3-7, 1973.

78. - Farrés Amelia et al:  $\alpha$ -amilasa: bases moleculares y bioquímicas para la superproducción de la enzima. *B.E.B.* , 5(1): 10-18, 1968.

79. - Wolnak, B.: Present and future technological and commercial status of enzymes. Report PB- 210636, National Technical Info. Service, U.S.A., 1972.

80. - Flores Ramírez, C.: Obtención y estudio de un detergente alkilaril sulfónico. México, U.N.A.M., 1951.

81. - William, W., Niven. *Fundamentals of Detergency*. Reinhold Publishing Co. 1959, pp. 26-33.

82. - Young, C., Coons, K. *Surfac. Active Agents*. Chemical Publishing and Co., 1954, pp. 13-35.

83. - Holmberg, K., Osterberg, E.: Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(9): 1544-48, 1988.



84. - Crossin Michael C.: Protease stabilization by carboxylic acid salts: relative efficiencies and mechanisms. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(7): 1010-13, 1989.
85. - Grandi, C., Smith, R., Luisi, P. *J. Biol. Chem.* 256: 837, 1981.
86. - Barbaric, S., Luisi, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 103: 4239, 1981.
87. - Han, D., Rhee, J.S. *Biotech. Bioeng.* 28: 1250, 1986.
88. - Han, D., Rhee, J.S. *Biotech. Lett.* 7: 651, 1985.
89. - Aunstrup, K., Andresen, O., Outtrup, H.: Proteolytic enzymes, their production and use. *Brit. patent 1,243,784*, 1971.
90. - Zuidweg, M., Vroemen, A., Benkers, I.: Proteolytic enzymes. *Process Biochemistry* 4: 19, 1969.
91. - Buchholz, K., Gödelmann, B. *Biotech. Bioeng.* 20: 1201-20, 1978.
92. - Karube, I., Hirano, K., Suzuki, S. *Biotech. Bioeng.* 19:1233-38, 1977.
93. - Alberti, B., Klibanov, A. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 47-49, 1982.
94. - Meessing, R.A. *Biotech. Bioeng.* 16: 897-908, 1974.
95. - Underkofler, L.A.: Manufacture and uses of industrial microbial enzymes. *Chemical Engineering Progress Symposium Series* 62(66), 1966.
96. - Perlman, G., Lonard, L.: Proteolytic enzymes. *Methods in enzymology* 19, 1970.
97. - Spickett, R.G.W.: Proteolytic enzymes. *Chemistry and Industry* 3: 83, 1971.
98. - Langguth Robert P., Raymond, L., Monsanto (Company): Enzyme detergents. *En: Encyclopedia of Chemical Technology* 3rd. Ed. Vol. 9, 1984. pp. 138-48.
99. - *Chem. Eng. News.* 27, Aug. 18, 1975.

100. - Ronald, A., Brabant, W. U.S. patent 3,451,935. June 24, 1969, (Assigned to The Procter & Gamble Company).
101. - Adam, N.K. J. Soc. Dyers Colourists, Vol. 53, pp. 121, 1937.
102. - Spring, W., Kolloid, Z. Vol. 4 pp 161, 1909; Vol. 6 pp. 11-164, 1910.
103. - Rhodes, F., Brainerd, S. Ind. Eng. Chem., Vol. 21, pp. 60, 1929.
104. - Vaughn, T., Vittone, A., Bacon, L. Ind. Eng. Chem., Vol. 33, pp. 1011, 1941.
105. - Heron, G. Textile Mfr., Vol 71, pp. 253, 1945.
106. - Kling, W., Langer, E., Haussner, I. Melliand Textilber., Vol. 25, pp. 196, 1945.
107. - Schwartz, A., Perry, J. Surface Active Agents. Interscience, New York, 1949.
108. - Alckin, R. J. Soc. Dyers Colourists. Vol. 60, pp. 60, 170, 1944.
109. - Seck, W., Fettchem. Umschau Vol. 42, pp. 120, 1935.
110. - Lindner, K., Fette, U., Seifen. Vol. 43 , pp. 214-233, 1936; Vol. 44, pp. 47, 1937.
111. - Hall, L. P. Am. Dyestuff Repr., Vol. 27, pp. 612-616, 1938.
112. - Neunhoeffer, O., Kolloid, Z. Vol. 107, pp. 104, 1944.
113. - Sisley, J. P. Corps gras, savons . Vol. 1, pp. 66 , 1943.
114. - Bacon, O., Smith, J.E. Ind. Eng. Chem. Vol. 40, pp. 2361, 1948.
115. - NOM-AA-39-1980. Agua. Determinación de sustancias activas al azul de metileno (Detergentes).
116. - Pelczar, Reid, Chan. Microbiología. Mc. Graw Hill, 4a. Ed. , España , 1981.

117.- Aunstrup, K., Andersen, O., Outtrup, H. U.S. patent 3,674,643, July 4, 1972, Assigned to Novo Terapeutisk Laboratorium A/S.

118.- Jensen, G.: Paper presented at the meeting in Deutsche Gesellschaft für Ferrwissenschaft, Giessen, FRG, Oct., pp. 8-12, 1972.

119.- Dombusch, C.L., Paper presented at the third Biennial Symposium sponsored by the Soap and Detergent Association, St. Louis., Mo., Apr. 13, 1978.

120.- Aunstrup, K. and Andersen, O. U.S. patent 3,827,938, Aug. 6, 1974 Assigned to Novo Terapeutisk Laboratorium A/S.

121.- Terry, B.W. and Groves, W.L.: Paper presented at the Annual Spring Meeting of the American Oil Chemists Society, San Francisco, Calif., April, 1969.

122.- R.B. 204118, Report of the Ad. Hoc. Committee on Enzyme detergents, Division of Medical Sciences, National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1971, pp. 10-18.

123.- Newman, E.A. and Nixon, G.A. Food Cosmet. Toxicol. 7, 581, 1969.

124.- Documentation of Threshold Limit Values for Substances in Workroom Air., ACGIH, Washington, D.C., 1971.

125.- First Supplement to the Food Chemicals Codex, 2nd. ed., 1974.

126.- Eidgenössische Material Prüfungs und Versuchsanstalt für Industrie (EMPA), Bauwesen and Gewerbe, St. Gallen, Switz, or Testfabrics Inc., New York.

127.- Holm, P. Unpublished data of Novo Industri A/S.

128.- Christensen, P., Holm, P. J. Am. Oil Chem. Soc. 55, 101, 1978.

129.- Jørgensen, E.B. J. Biol. Biccalle 5, 239, 1977.

130.- Enzyme Denture Cleansers, Novo Technical Research Booklet 173a-GB500, Novo Laboratories, Inc. Wilton, Conn, 1977.

131.- Guggenheim, B. Helv. Odontol. Acta 14 (suppl. V), 89, 1970.

132.- Cayle, T. J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 515, 1969.

133.- Jensen, G. Process Biochem 7(8), 23, 1972.