



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Ciencias

**INDUSTRIA BLANCA: EL CASO DE LA $Z\alpha$ PEROXIDASA
EN LOS DETERGENTES LÍQUIDOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO GASTEAZORO PIÑEIRO

Directora de tesis: María Brenda Valderrama Blanco



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Industria Blanca: El caso de la Zo-peroxidasa en los detergentes líquidos"

realizado por José Francisco Gasteazoro Piñero

con número de cuenta 300592706 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dra. María Brenda Valderrama Blanco

Propietario M en IBB. Claudia Andrea Segal Kischinevzky.

Propietario Quím. Viviana Escobar Sánchez.

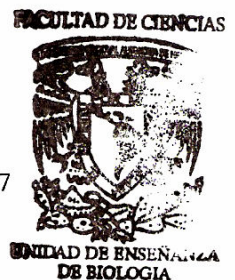
Suplente M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante.

Suplente M. en C. Paloma Columba Gil Rodríguez.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 13 de febrero
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

del 2007

Dr. Zenón Cano Santana



A María de la Cruz Lorenzo Maroto.

GRACIAS!

Un pañuelo de silencio a la hora de partir
a la hora de partir un pañuelo de silencio
a la hora de partir un pañuelo de silencio a
la hora de partir...

Ese vacío que deja el amigo que deja el
amigo que se va...

No te vayas todavía no te vaya por favor
no te vayas todavía que hasta la guitarra
mía llora cuando dice adiós...

Agradecimientos:

A la Dra. Brenda Valderrama, por apoyarme durante momentos difíciles y enseñarme tanto.

Al Dr. Eduardo Horjales por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Enrique Rudiño por sus críticas constantes.

A mis sinodales: M. en IBB. Claudia Segal Kischinevzky, Q. Viviana Escobar Sánchez, M. en C. Paloma Gil y M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante. Sin su apoyo este trabajo no sería el mismo.

A mi familia por apoyarme siempre.

A los amigos, ustedes saben quienes son!

A los compañeros del laboratorio, en especial al grupo del Dr. Lorenzo por hacer del trabajo diario un rato ameno y a mis amigos los tallerines.

A la UNAM, por brindarme la educación necesaria para convertirme en Biólogo.

A quien haya tolerado mis constantes quejas y críticas varias.

Finalmente a ti, por leer esta tesis.

Agradezco a Conacyt-Semarnat-2004-CO1-100 por la beca para realizar mi tesis. Este proyecto fue financiado parcialmente por el programa PAPIIT de la DGAPA (IN202407-3), UNAM.

Índice general

ÍNDICE GENERAL	I
1. RESUMEN	- 1 -
2. INTRODUCCIÓN	- 2 -
2.1 INDUSTRIA BLANCA Ó ¿POR QUÉ UTILIZAR LA BIOTECNOLOGÍA?	- 2 -
2.2 EL PAPEL DE LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA QUÍMICA	- 3 -
2.2.1 INDUSTRIA ALIMENTICIA	- 6 -
2.2.2 INDUSTRIA DE ALIMENTOS PARA ANIMALES	- 7 -
2.2.3 INDUSTRIA TÉCNICA.	- 8 -
2.3 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DETERGENTES.	- 8 -
2.3.1 DESEMPEÑO DE LOS DETERGENTES BIODEGRADABLES.	- 12 -
2.3.2 INHIBICIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE TINTURAS.	- 15 -
2.4 OTRAS APLICACIONES DE LAS ENZIMAS OXIDATIVAS EN LA INDUSTRIA	- 17 -
2.5 ¿PEROXIDASAS PARA DETERGENTES?	- 18 -
3. HIPÓTESIS	- 21 -
4. OBJETIVO	- 21 -
5. MATERIAL Y MÉTODO	- 22 -
5.1 REACTIVOS.	- 22 -
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERGENTES UTILIZADOS.	- 22 -
5.3 ESTABILIDAD DE LAS PEROXIDASAS EN LOS DETERGENTES.	- 23 -
5.4 PERFIL DE PH DE LAS PEROXIDASAS.	- 24 -
5.5 OXIDACIÓN DE COLORANTES MODELO.	- 24 -
5.6 PRUEBA DE RENDIMIENTO EN TELAS.	- 24 -
5.7 PRUEBA DE ANAQUEL.	- 25 -
5.8 DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA DE ACTIVACIÓN.	- 25 -
6. RESULTADOS	- 26 -
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERGENTES UTILIZADOS.	- 26 -
6.2 ESTABILIDAD FUNCIONAL DE LAS PEROXIDASAS EN LOS DETERGENTES	- 28 -
6.3 OXIDACIÓN DE COLORANTES MODELO	- 29 -
6.4 PRUEBA DE ITT CON TELAS	- 34 -
6.5 PRUEBAS DE ANAQUEL	- 35 -

6.6 DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA DE ACTIVACIÓN	- 36 -
<u>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	- 37 -
<u>7. PERSPECTIVAS</u>	- 41 -
<u>ANEXO 1</u>	- 42 -
<u>ANEXO 2</u>	- 44 -
<u>8. BIBLIOGRAFÍA</u>	- 46 -

1. Resumen

La Biotecnología fomenta el desarrollo sostenible al generar nuevas tecnologías como la biocatálisis. Una de las industrias que mejor han aprovechado esta coyuntura tecnológica es la de los detergentes, donde las diferentes formulaciones han evolucionado rápidamente hasta convertirse en productos inocuos al medio ambiente. Uno de los elementos esenciales para lograr esto ha sido la incorporación de enzimas a las fórmulas, lo que permite acortar los tiempos de lavado, así como reducir la cantidad y temperatura del agua que se utiliza en el lavado con la ventaja adicional de ser biodegradables.

En contraste con su enorme potencial, la utilización de enzimas en cualquier industria, incluyendo la de los detergentes, se ve limitada por la susceptibilidad de éstas a condiciones y agentes desnaturalizantes involucrados en los diferentes procesos. Este problema está ejemplificado con la baja estabilidad de enzimas ante el peróxido de hidrógeno utilizado en los sistemas de blanqueado.

La Zo Peroxidasa (ZoPrx) es una hemoperoxidasa proveniente *Raphanus sativus* L. var. Daikon, caracterizada principalmente por su estabilidad ante la inactivación por H_2O_2 lo que la perfila como una enzima con gran potencial de aplicación industrial en lo general y en el campo de los detergentes en particular.

Con la finalidad de comprobar la posible funcionalidad de la ZoPrx en la industria de los detergentes líquidos llevamos a la caracterización parcial de algunas formulaciones comerciales. La adición de ZoPrx incrementa la funcionalidad de los detergentes líquidos respecto a la oxidación de colorantes modelo y les permite aumentar la inhibición de transferencia de tinturas hasta en un 30%. Adicionalmente, y debido a su baja energía de activación, la ZoPrx muestra su potencial para trabajar a temperatura ambiente, un requerimiento clave para las nuevas generaciones de detergentes. Nuestros resultados indican que la estabilidad operacional de la ZoPrx ante la matriz detergente en dilución y su resistencia bajo condiciones de trabajo la perfilan como una buena opción para su uso como aditivo en detergentes.

2. Introducción

2.1 Industria Blanca ó ¿Por qué utilizar la Biotecnología?

El término Industria Blanca representa el compromiso de los sectores manufactureros para alcanzar una producción y procesamiento sustentable dentro del contexto ecológico y social, basado en el uso de enzimas y microorganismos ^{5,20,25}. Esta visión busca cumplir con la definición de desarrollo sostenible que establece la Comisión Mundial de Medioambiente y Desarrollo (World Commission on Environment and Development): satisfacer las necesidades presentes sin comprometer la capacidad de generaciones futuras de satisfacer sus propias necesidades¹.

La industria es verdaderamente sostenible¹ solo si es viable económicamente, compatible con el ambiente y socialmente responsable. Hasta ahora los cambios tecnológicos han estado dirigidos por tendencias globales resultando en una creciente demanda de recursos ^{5,20}. La Biotecnología ha permeado substancialmente en el cuidado de la salud ("Biotecnología roja"), los procesos de producción de alimentos; en la agricultura y la silvicultura ("Biotecnología verde"), en la protección ambiental y en la producción de materiales y químicos ("Biotecnología blanca"), cumpliendo cabalmente con los preceptos del desarrollo sustentable al generar bienestar e influenciar de manera benéfica cada sector de la economía, disminuir la producción de desechos, el consumo de energía y la emisión de gases de efecto invernadero.

La Biotecnología blanca es una herramienta versátil y se ha visualizado como una tecnología clave para otorgar a la industria química la cualidad de ser sostenible, proveedora de oportunidades completamente nuevas para la obtención de productos y servicios nuevos o ya existentes. También ofrece nuevas aproximaciones para la comprensión, manejo, preservación y restauración del medio ambiente, transformando los contaminantes en sustancias menos tóxicas, utilizando material biodegradable generado de fuentes renovables, y desarrollando manufacturas amigables con el medio al igual que procesos de desecho seguros. En este contexto, los procesos basados en el uso de altas temperaturas y por lo tanto energéticamente exhaustivos, son sustituidos por el uso de biocatalizadores, con frecuencia basados en enzimas ^{5,17}.

¹ Es decir, la capacidad de ser sustentable y permanecer en el tiempo

La industrialización de las enzimas es un caso representativo de los avances en la Biotecnología moderna. Las enzimas se han utilizado desde tiempos ancestrales, p. ej. en la producción de alimentos (quesos, vino, vinagre, etc.) y para la manufactura en industrias como la peletera y la fabricación de lino e índigo (utilizado para teñir la mezclilla). En un inicio, todos estos procesos recaían en enzimas que no se encontraban en su forma pura²⁶. El advenimiento de los procesos de fermentación durante la última parte del siglo pasado, hizo posible la producción de éstas en su forma pura, lo cual facilitó su adecuada caracterización. Este desarrollo detonó el uso de las enzimas en nuevas aplicaciones para la producción y procesos industriales.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que las enzimas son catalizadores naturales, que se encuentran universalmente en todos los organismos vivos y que la mayoría de sus actividades no ha sido explotada en procesos industriales⁹. El uso de la ingeniería de proteínas y de la evolución dirigida ha revolucionado aún más el desarrollo de las enzimas industriales, dando lugar a una nueva generación de enzimas "a la medida" poseedoras de nuevas actividades y adaptadas a nuevos procesos y condiciones. Las enzimas han sido por lo tanto mejoradas técnicamente en términos de especificidad, pureza, estabilidad y propiedades bioquímicas, permitiendo así una expansión en su uso industrial^{18,25,26}.

2.2 El papel de las enzimas en la industria química

La industria química global ha contribuido de manera importante para que tengamos la calidad de vida actual. Sus productos son virtualmente omnipresentes, siendo las piezas que construyen todo aquello con lo que satisfacemos nuestras necesidades más fundamentales, desde alimento, abrigo y salud, e impactando trascendentalmente en la alta tecnología de la computación, las telecomunicaciones y la ciencia en general. El éxito arrollador de la industria química se debe principalmente a los avances científicos y tecnológicos que nos brindan nuevos productos y procesos. Actualmente el proceso de investigación y desarrollo se dirige a transformar las prácticas de trabajo tradicionales para favorecer las alternativas ecológicas, en especial existe preocupación por la utilización predominante de energías y recursos no renovables (principalmente combustibles y derivados fósiles); por la existencia de procesos de

producción que dañan al ambiente y que pueden no ser seguros al generar productos y desechos tóxicos, por la generación de productos que actualmente no son reciclables y/o biodegradables después de su uso, y por favorecer la concentración regional excesiva de la producción por lo cual los beneficios sociales no se distribuyen ^{2,5,20}.

La aplicación de las enzimas en la industria se basa en sus mecanismos de reacción específicos y su compatibilidad con la ecología. Comenzando con la estabilidad, es crucial la búsqueda de formulaciones óptimas para que las enzimas puedan desplegar su potencial dentro de cualquier industria. Estas formulaciones no son nada triviales tomando en cuenta que desde 1970 se conoce que las enzimas pueden ocasionar cierto tipo de sensibilidad desde rinitis hasta asma. Es por esto que las industrias deben contemplar el bienestar de trabajadores y consumidores en sus formulaciones, considerando el tiempo de exposición al producto (variando en un intervalo que va de minutos a horas), temperatura, pH y la presencia de quelantes. Para lograr este cometido, la Biotecnología blanca se acoge bajo el amparo de disciplinas científicas como la bioquímica, microbiología, proteómica, bioinformática y la bioingeniería ^{5,29,34}.

Las enzimas han penetrado progresivamente en la industria química como catalizadores de numerosas reacciones. En 1999 el mercado global de enzimas se estimaba en alrededor de $\$1.5 \times 10^3$ millones de dólares, llegando a alcanzar en 2003 $\$1.9 \times 10^3$ millones de dólares (<http://bio4eu.jrc.es>). Según el reporte "RC-147U Enzymes for Industrial Applications" liberado por la *Business Communication Company* ⁷, el mercado global de enzimas industriales aumentó a $\$2 \times 10^3$ millones de dólares en 2004 esperando alcanzar en el 2009 cerca de $\$2.4 \times 10^3$ millones de dólares, tal como se muestra en la Figura 1.

Alrededor del 75% de las enzimas de valor industrial son utilizadas para el sector de los detergentes y en procesos de la industria alimenticia y del almidón. Son en su mayoría enzimas hidrolíticas como proteasas, amilasas, lipasas y celulasas y de forma más reciente se han introducido comercialmente algunas oxidoreductasas (p. ej. catalasas, peroxidasas y lacasas). De las enzimas utilizadas comercialmente, cerca del 60% son producto de la Biotecnología moderna ²⁰.

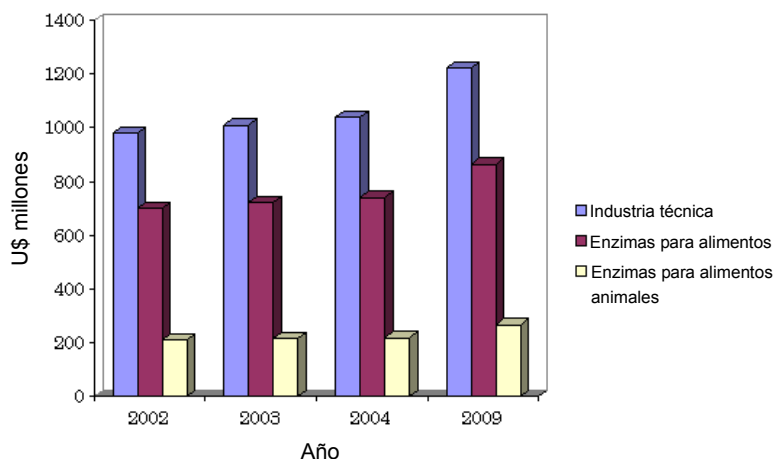


Fig. 1. Mercado Global de Enzimas por Sector de Aplicación (U\$) ⁷.

Durante las últimas dos décadas, la Biotecnología ha tenido gran auge en México. Su crecimiento ha sido desigual ya que algunas de las áreas de investigación científica han alcanzado niveles comparables con estándares internacionales, mientras que en otras el desarrollo es aún incipiente. Esta situación es extensiva al sector productivo, donde empresas usuarias de Biotecnologías modernas conviven con otras que se limitan a aplicaciones tradicionales con baja tasa de innovación.

Actualmente en México las Biotecnologías tradicionales son ampliamente utilizadas para la diversos procesos de producción. En el país existen más de noventa empresas biotecnológicas (Anexo 1), sin tomar en cuenta a las más de cien empresas productoras de bebidas alcohólicas y a las 400 empresas que producen derivados lácteos, y que generan la mayor parte de los más de cien productos netamente biotecnológicos que se encuentran en el mercado mexicano. La Figura 2 nos muestra la distribución de la industria biotecnológica mexicana ¹⁷. Sin embargo el reunir la información de la industria biotecnológica mexicana no es una labor sencilla ya que se cuentan con pocos reportes generados por esta.

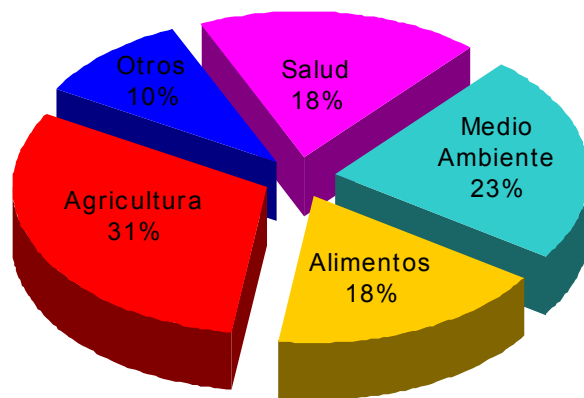


Fig. 2. Distribución de la Industria Blanca en México. En otros se encuentran concentradas la producción de enzimas de extractos vegetales, pigmentos y aditivos alimentarios para uso industrial, detergentes biológicos y cosméticos.

Los sectores de aplicación de las enzimas en la industria se clasifican en tres grandes grupos: el alimenticio, el de alimentos para animales y el técnico. La aplicación de las enzimas dentro de estos sectores abarca una gran cantidad de ejemplos. A continuación se describirán algunos de los que parecen más ilustrativos del potencial que despliega la Biotecnología.

2.2.1 Industria alimenticia

Es conocido que las enzimas se utilizan en diversos procesos involucrados en la generación de alimentos, ahorrando energía y recursos; y haciendo más eficiente el procesamiento. Hoy en día se cuenta con una amplia variedad de enzimas que hacen posible la generación de ingredientes con alto valor agregado. Aunque las enzimas comparten con algunos productos químicos la generación de los mismos efectos, las tendencias del consumidor a preferir productos orgánicos abren un mercado en el que las enzimas pueden competir.

Históricamente la preparación del pan se ha relacionado con el uso de enzimas, remontándose a los antiguos egipcios, quienes utilizaban enzimas endógenas presentes en la harina. El uso de enzimas para el mejoramiento intencional de las harinas se introdujo en el S. XX, siendo las α -amilasas las primeras utilizadas para suplementar los productos con malta y después sustituyendo ésta por enzimas bacterianas con mayor termoestabilidad. La utilización de lipasas en el mejoramiento de la masa ayuda a acrecentar las propiedades de estabilidad y maleabilidad. De igual manera proporciona

celdas de gas estables dentro de la masa, lo cual se traduce en una estructura de migas homogénea, más agradable a la vista y en un incremento del volumen del producto horneado ³⁵.

Otra de las aplicaciones que resultan familiares en el sector alimenticio es la clarificación de jugos. Las manzanas son la segunda materia prima, después de las naranjas, en la producción de jugos y se cosechan cerca de 54 millones de toneladas al año. De éstas, el 10% son utilizadas en la producción de concentrados clarificados y un 2% transformadas en néctares, sidra y salsa de manzana. Desde 1930 se utilizan pectinasas para la clarificación del jugo de manzana y paulatinamente se han introducido otro tipo de enzimas en el procesamiento hasta su transformación en jugos transparentes, atractivos comercialmente. Actualmente se utilizan diferentes productos [*Rapidase Press* (DSM), *Pectinex Ultra SP* (Novozymes) y *Rohapect MA+* (Röhm)] que son un conjunto de enzimas que ayudan a la maduración del puré de manzana obteniendo un producto fácil de comprimir. Después de haber madurado los frutos es posible extraer el jugo, el cual debe pasar por tres etapas de clarificación, de las cuales la primera utiliza pectinasas y amilasas para la degradación de la pectina y el almidón respectivamente. Después de esto se sedimentan los agentes causantes de la turbidez dentro del jugo y se procede a un proceso de filtración o ultrafiltración para eliminar las enzimas utilizadas en los procesos de clarificación ³⁵. Recientemente Novozymes introdujo los productos *Pectinex XXL*, *Smash XXL* y *AFP XXL* que incrementan la obtención de jugo haciendo más económica la producción ¹³.

2.2.2 Industria de alimentos para animales

El uso de enzimas representa un adelanto reciente en este sector. Siendo su utilidad preferente el ensalzar la digestión del alimento mediante el incremento de bolo alimenticio seco, en particular de nitrógeno y carbohidratos, que el animal puede retener, reduciendo la excreción de materia no digerida y por lo tanto la contaminación. También permiten procesar factores no nutricionales inherentes al alimento y mejorar el desempeño de los animales ya sea con una ganancia de peso ó mejor rendimiento del alimento. Las enzimas más comunes son amilasas, pectinasas, pentosanasas, proteasas, β -glucanasas, xylanases y hemicelulasas.

Por ejemplo, en un alimento típico, entre 50-80% del fósforo total se encuentra como ácido fítico (*myo*-inositol hexakisfosfato) el cual pasa por el sistema digestivo de los animales monogástricos sin ser digerido. La fitasa actúa removiendo selectivamente el ortofosfato del ácido fítico, produciendo inositol-fósforo y el intermediario *myo*-inositol. El suplemento del alimento con fitasas disminuye el requerimiento de complementación con fósforo inorgánico, lo cual es una fuente reconocida de contaminación. El mejoramiento en el aprovechamiento del fósforo se estima entre 20-45%^{9,12}. Ejemplo de estas fitasas es *Phyzyme XP* de Diversa adicionada a alimento de puercos y pollos¹³. Sin embargo, la utilización de fitasas en la fabricación de croquetas no sería posible sin ayuda de la ingeniería de proteínas que, como reporta Lehmann *et al.* permitió generar una fitasa consenso con mayor termoestabilidad (15-22° C)²⁸.

2.2.3 Industria técnica.

La industria técnica es el segmento de la industria que comprende la industria de los detergentes, almidón, textiles, combustible a base de alcohol, piel, y la industria del papel. Siendo un sector muy diverso, las enzimas han sido abundantemente utilizadas en algunas de estas, p. ej. en las industrias del papel y de textiles. Por la orientación de este documento, nos enfocaremos a la industria de los detergentes, uno de los mercados más grandes y antiguos para enzimas industriales.

2.3 Breve descripción de los detergentes.

Durante el tiempo de los egipcios y de los "fullones"² romanos la forma habitual de lavar la ropa era utilizando los pies, i.e. pisando las prendas sumergidas en agua. El proceso de lavado era muy sencillo, fundamentando en un simple tratamiento mecánico que consistía en golpear, pisar y/o frotar en agua; sin embargo, se sabe desde tiempos remotos que el poder de lavado del agua se puede incrementar. Con este fin los antiguos egipcios utilizaron potasa como aditivo. Posteriormente se comenzó a utilizar silicato de sodio para hacer el agua menos dura. Fue en 1878 que la primera marca comercial de detergentes Henkel libera en el mercado alemán "*Bleichsoda*", con base en carbonato y silicato de sodio, con el inconveniente de generar un color amarillento en la ropa.

² Persona que abatan paños. Nombre otorgado a los romanos encargados del lavado de las vestimentas, su forma peculiar de lavar se describe mejor con las imágenes encontradas en Fullonica, Pompeya.

El jabón, el surfactante más primitivo conocido (desde 2500 AC.), se ha utilizado en propósitos de lavado generales y de lavandería. A principios del S. XX el jabón toma su lugar como ingrediente en sistemas multicomponentes para el lavado rutinario de textiles. En este tipo de sistemas, el jabón se combinó con carbonato de sodio, silicato de sodio y perborato de sodio lo cual permitió que el procedimiento adicional de blanqueado se eliminara. El siguiente desarrollo que permitió una transición en el lavado fue el invento de la lavadora, provocando cambios en las formulaciones de detergentes necesarias para adecuarse al cambio en la acción mecánica aplicada al lavado. El jabón, sensible a la dureza del agua, fue reemplazado por surfactantes sintéticos.

Los primeros surfactantes sintéticos, como los alcoholes grasos sulfatados no eran 100% biodegradables lo que conllevó a que en 1961 se promulgara la primera ley de detergentes alemana que impactó a la industria de todo el mundo y sentó un precedente para legislaciones posteriores ^{37,39} (Tabla 1).

Tabla 1. Legislaciones que han impactado históricamente en la industria de los detergentes ⁴.

Año	Legislación	Contenido
1961	Alemania. Ley sobre Detergentes y Productos de Limpieza	Degradación primaria en detergentes
1973	Consejo Directivo Europeo en Biodegradabilidad de Surfactantes Aniónicos	Requerimientos generales en biodegradabilidad
1975/87	Alemania. Ley sobre Detergentes y Productos de Limpieza	Control en la liberación al medio de ingredientes de los detergentes
1970-91	Europa. Regulación para la limitación de fosfatos	Leyes o acuerdos voluntarios
1972-88	EE. UU. Regulación de fosfatos utilizados	Prohibiciones y limitaciones
1989	Recomendación de la Comisión Europea para el etiquetado de Detergentes	Datos cuantitativos de ingredientes contenidos en mas de 0.02% en la formulación
1991/98	Alemania. Ordenamiento de Empaque	Prevención de desechos, reciclaje
1995	Decisión de la Comisión Europea en las Eco-marcas para detergentes de lavandería	Establecimiento del criterio ecológico y de rendimiento
1998	Recomendación de la Comisión Europea en las Buenas Prácticas Ambientales para Detergentes de Lavandería de Uso Doméstico	Objetivos de conservación

Como consecuencia a los cambios en la legislación, la biodegradabilidad de los componentes en los detergentes se fijó entre 80 y 97%, lo que modificó de manera irreversible el uso de surfactantes, reemplazando los alquilbencenosulfonados y nonanofenoletoxilados por alquilbencenosulfonato lineales (LAS) y alcoholes etoxilados

de cadena larga ³⁹. Desde octubre de 2005, todos los surfactantes para detergentes domésticos deben de probar su biodegradabilidad de manera obligatoria dentro de EE. UU. ^{8,32}. El hecho de que los productos detergentes sean biodegradables impacta las políticas industriales, generando modificaciones para brindar a los consumidores una imagen corporativa amigable con el ambiente. No todo se resume en la legislación sino en acuerdos entre productores y organizaciones ambientalistas. Otro paso importante en la industria fue el intercambio de los potenciadores o constructores de carbonato de sodio por trifosfato de sodio que a su vez fue sustituido por zeolitas (en especial zeolita A). Con la intención de adecuar la industria de los detergentes a las legislaciones vigentes, en la última década se observó la introducción de elementos amigables con el medio ambiente y con los usuarios. Lo anterior llevo a la generación de una formulación estándar para los detergentes modernos consistente en: surfactantes, intercambiadores iónicos, agentes anti-redeposición de suciedad, repelentes de suciedad, co-constructores policarboxilados, agentes blanqueadores/fluorescentes y enzimas.

Los surfactantes o agentes activos en superficie cuando se encuentran solubles en agua son capaces de eliminar la suciedad de las superficies. Formados por una porción hidrofóbica unida a grupos funcionales hidrofílicos como se ve en la Figura 3 en donde se muestra la estructura general de los principales surfactantes utilizados en la industria de los detergentes ^{8,37,39}.

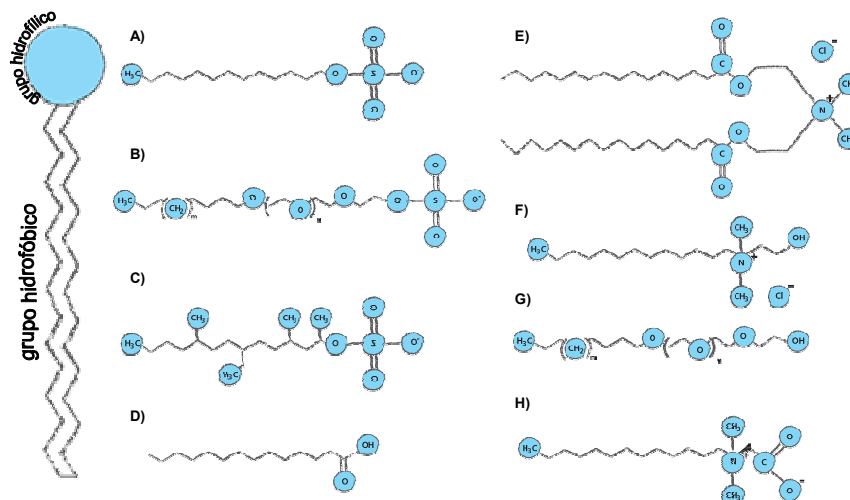


Fig. 3. Estructura de los surfactantes. A) LAS, B) Alquil sulfato ramificado, C) Alquil éter sulfatado, D) Ácidos grasos/ jabón (A, B, C, y D ej. de surfactantes aniónicos) E) Esterquat, F) sistema mono alquil cuaternario (E y F ej. de surfactantes cationicos) G) estructura de surfactantes no iónicos H) Alquil botaina (surfactante anfotérico) Modificado de P&G en www.sciencinthebox.com

En los sistemas de blanqueado se ha utilizado peróxido de hidrógeno en la forma de su precursor perborato de sodio desde 1907. Los activadores de blanqueado (p. ej. Tetra-acetil etilendiamina, TAED) reaccionan con H_2O_2 a pH básico haciendo perhidrólisis para formar peroxi-ácidos orgánicos *in situ*, lo cual genera un potencial oxidativo mayor a temperaturas cercanas a $40^\circ C$ ¹⁶.

Los constructores son materiales de origen sintético o natural que eliminan iones calcio y magnesio que se desprenden de las manchas y del agua reduciendo la dureza de ésta última por secuestro o intercambio iónico. Además de éstos, también pueden intercambiar iones plomo, cobre, plata, cadmio, zinc y mercurio, dependiendo de su tamaño, su concentración, el tiempo de acción, temperatura y pH. Esta acción permite que los surfactantes actúen removiendo la suciedad de manera más eficiente. La estructura de los principales constructores se muestra en la Figura 4, siendo los principales las zeolitas (silicatos de aluminio cristalino) ⁴. Los co-constructores son polímeros orgánicos que ayudan a que los constructores rindan más, p. ej. carbonato de sodio para elevar el pH.

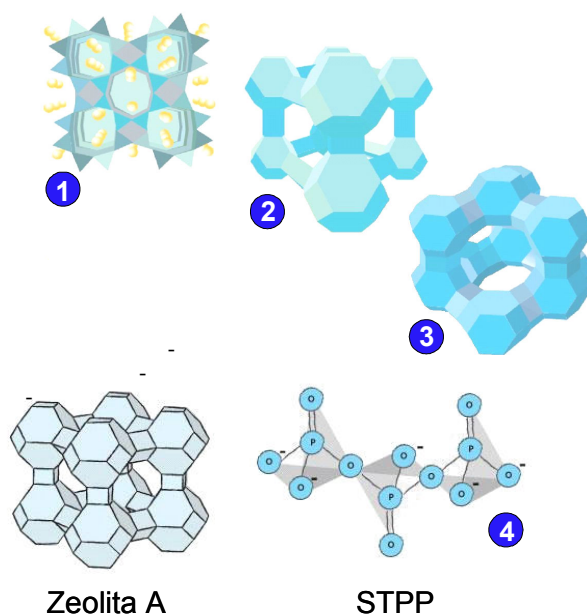


Fig. 4. Estructura de los principales constructores e intercambiadores iónicos: 1 – Zeolita P, 2 – Zeolita A, 3 – Zeolita X, 4 – STPP (modificado de Zeodet).

Los surfactantes, constructores y blanqueadores son cuantitativamente los mayores componentes de los detergentes modernos. Los aditivos (o agentes auxiliares) son introducidos en pequeñas cantidades y cada uno de ellos se encuentra para

desarrollar un propósito en específico ³⁹. El uso de enzimas en detergentes se describe por primera vez en 1913 por Otto Rhöm que añade tripsina al detergente "Burnus".(Anexo 2).

Desde la introducción de las enzimas a los detergentes, es menor la carga del proceso de lavado sobre el ambiente. La energía ahorrada al disminuir la temperatura de lavado de 90° C a 60° C se ha estimado tan solo en Dinamarca en la reducción de 38, 000 toneladas por año de emisiones de CO₂. El uso de enzimas también reduce los tiempos de lavado y el uso de agua. Adicionalmente el impacto al medio ambiente se ve minimizado ya que las enzimas reemplazan el uso de ciertos químicos ⁶.

Hoy en día básicamente todos los detergentes de lavandería, salvo algunas formulaciones específicas, contienen enzimas. Las enzimas actúan degradando la suciedad en pequeños fragmentos más solubles. Sin embargo, el proceso de lavado requiere de la acción conjunta de enzimas, surfactantes, constructores y blanqueadores para poder eliminar las manchas por completo.

2.3.1 Desempeño de los detergentes biodegradables.

El proceso de lavado y limpieza dentro de un medio acuoso involucra la intervención cooperativa de todos los componentes de las formulaciones, ya sean factores físicos ó químicos. El desempeño del proceso es sensible a las propiedades del textil, tipos de manchas, calidad del agua, técnica de lavado y, particularmente, a la composición del detergente. Es por esto que los ingredientes en las formulaciones varían de país a país, e incluso a nivel de región. De igual manera, las manchas y los procesos de lavado varían según los usos y costumbres de cada región.

No sólo es importante considerar las interacciones entre los componentes del detergente, sino también la interacción de cada uno de ellos con diferentes tipos de sustratos. Por ejemplo, la remoción física de las manchas desde una superficie es el resultado de la adsorción no específica de agentes quelantes y surfactantes en las diferentes fases presentes. Los agentes quelantes promueven la liberación de iones calcio desde la mancha y la fibra, ocasionando una pérdida de estructura del residuo, facilitando la desintegración de gran parte de la mancha y la remoción de suciedad. Sin embargo, no toda la mancha se remueve, por lo que los residuos son blanqueados con

el fin de ocultarlos a la vista ³⁹. Los surfactantes reducen la tensión superficial del agua y promueven la desintegración de la mancha, ya sea disolviéndola o alternativamente, mediante el enrollamiento o emulsificación de líquidos aceitosos y grasas. Es de esta forma que los surfactantes constituyen micelas capaces de disolver materiales no solubles en agua y prevenir la redeposición. Los mecanismos de enrollamiento y emulsificación se ilustran en la Figura 5 ^{8,39}.

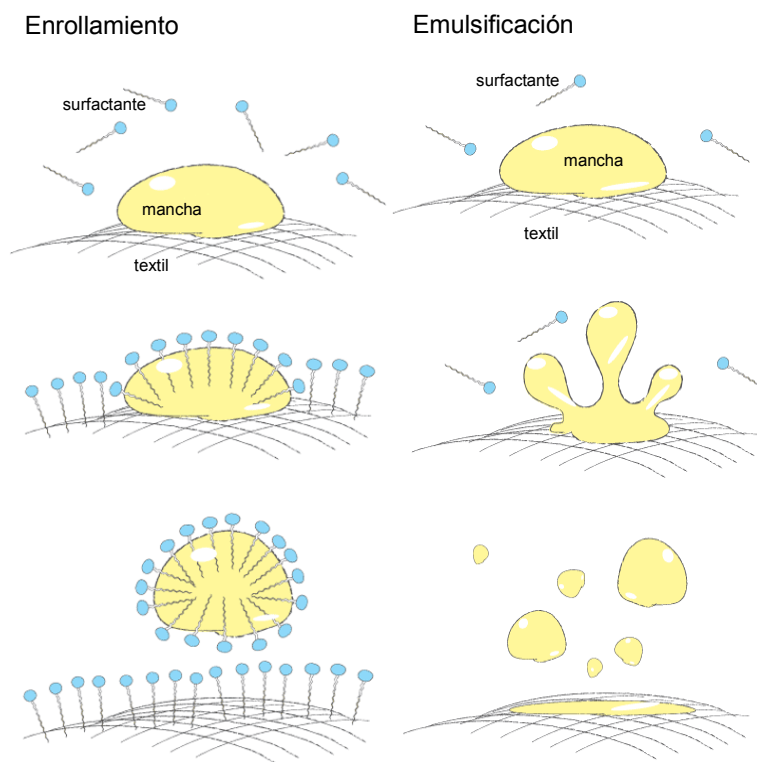


Fig. 5. Proceso de enrollamiento y emulsificación de los surfactantes Modificado de P&G en www.scienceinthebox.com

La remoción de una mancha desde una superficie puede ocurrir sin intercambio químico o estar acoplada a una reacción química. La desestabilización de la unión entre la suciedad y el tejido sería un ejemplo de la primera opción. Los surfactantes reducen la tensión superficial de la interfase (p. ej. aire/agua, agua/mancha, mancha/tela) para que después la parte hidrofóbica pueda realizar enrollamiento o emulsificación de la mancha.

Un ejemplo en donde la remoción de manchas este acoplada a una reacción química es el proceso de oxidorreducción involucrado en el blanqueado, que consiste en la degradación química de la parte de una molécula responsable de absorber la radiación electromagnética visible, usualmente un sistema de enlaces π conjugados (típicos de los colorantes) representada en la Figura 6 ¹⁶.

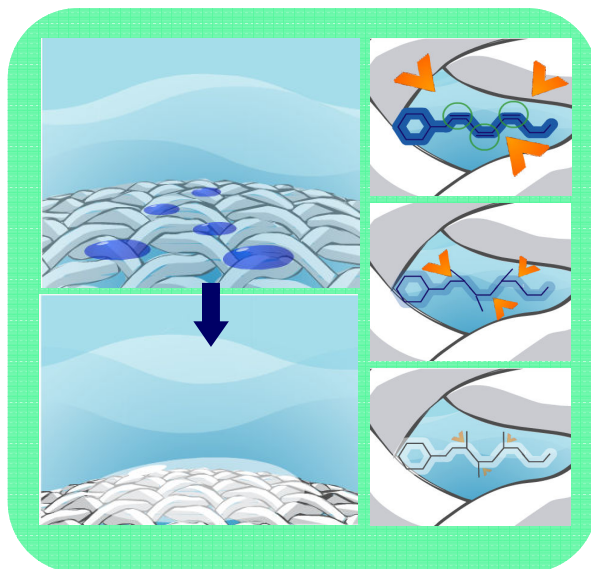


Fig. 6. Representación esquemática del proceso de blanqueado. En las figuras de la izquierda se representa el proceso de forma microscópica; mientras que las figuras de la izquierda representan los efectos de los agentes blanqueadores sobre los dobles enlaces de los cromóforos Modificado de P&G en www.scienceinthebox.com.

Ambos tipos de remoción de manchas pueden ser realizados por enzimas ^{6,11,39}. En el primer caso el uso de proteasas y amilasas permite la remoción de manchas proteicas y de almidón, respectivamente. Las grasas y aceites pueden ser tratados con lipasas, mejorando su remoción. El uso de celulasas se ha implementado dentro de los detergentes para eliminar las fibrillas que se puedan desprender de las telas, obsequiando al consumidor el realce de los colores. El uso de enzimas para blanqueado es el único rubro en el cual aún no hay una aplicación comercial, sin embargo, existen varias patentes de sistemas que involucran oxidorreductasas. Uno de los problemas con los sistemas de blanqueado es que las manchas más difíciles de remover de las telas son los tinturas ³⁹.

El objetivo de adicionar diferentes enzimas a la formulación de los detergentes es potenciar la sinergia entre ellas hasta obtener un balance entre sus propiedades y la actividad desarrollada mediante un ciclo catalítico complejo ²⁷. En la Figura 7 se ilustra las catálisis acoplada de tres enzimas para generar *in situ* un sistema de oxidorreducción ideal. Este tipo de acoplamiento enzimático permitiría la eliminación de algunos productos químicos agresivos de la formulación, generándolos enzimáticamente *in situ* evitando su exceso. Esta reducción en los componentes de las formulaciones ofrece un

mayor cuidado con los textiles y una reducción energética derivada de la catálisis enzimática.

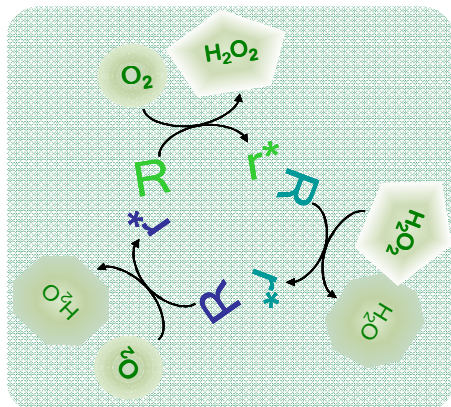


Fig. 7. Representación de las reacciones que se encontrarían dentro de un producto ideal, en donde las reacciones se encuentren acopladas unas con otras. La figura representaría una cadena de tres probables enzimas Redox.

2.3.2 Inhibición de la transferencia de tinturas.

La posibilidad de lavar mezclas de textiles con diferentes tinciones implica un ahorro en el tiempo y agua del lavado, y por ende, impacta positivamente a la ecología del planeta. Sin embargo, el desprendimiento del colorante desde las telas con colores más fuertes resulta en el manchado de las telas más claras por redeposición del mismo. Dar solución a este problema, denominado transferencia de tinturas, domina la formulación de los detergentes. Con este fin se han utilizado polímeros que interactúan con los tinturas en solución y evitan la redeposición de los cromóforos, entre los que Figuran las poli(vinilpirrolidonas), el poli(vinilimidazol), y el poli(vinilpiridin-N-óxido). Alternativamente, se ha desarrollado la oxidación química de las tinturas generando especies no coloradas mediante la generación *in situ* de perácidos^{3,24,31}. Sin embargo, este método no combate eficientemente la transferencia de tinturas a temperatura ambiente por su alta energía de activación, generando un conflicto con la tendencia mundial de reducir la temperatura de lavado a 40°C¹⁶. Además, los perácidos suelen atacar los colorantes de las telas^{15,23,41}.

El problema de la transferencia de tinturas no es sólo estético ya que la mayoría de los tinturas textiles se consideran recalcitrantes y tóxicos generando eutroficación de los cuerpos de agua en los que son liberados. Es por todas estas razones que desde hace algunos años se ha buscado desarrollar un proceso enzimático de blanqueo. El principio de la inhibición de la transferencia de tinturas (ITT), es un proceso enzimático

que inhibe la transmisión de un cromóforo de una tela teñida a otra no teñida durante el lavado (Fig. 8) ^{3,15}. La ITT representa una vertiente más de la industria blanca en donde la biocatálisis con enzimas oxidativas se puede explotar para reducir el gasto energético y de agua del proceso de lavandería así como para reducir la descarga de agentes que resultan contaminantes al ambiente.

De las pocas enzimas competentes para la realización de ITT reportadas en la literatura (incluyendo las bases de datos de patentes) se encuentran peroxidadasas y oxidasas. En particular, el uso de las peroxidadasas junto con H_2O_2 ó con un precursor ha sido promovida para el blanqueado de la pulpa y del papel (SE 88/0673), en los tratamientos del agua de desecho durante la producción de la pulpa (U.S. Pat. No 4, 623, 465, JP-A 2-31887) y en el mejoramiento del blanqueado en detergentes de lavandería (WO 89/09813). En particular, Guardzyme, una peroxidada de Novo Nordysk se ha comercializado para el sistema de ITT ^{3,14,15,41}.

La gran virtud biológica de las enzimas como catalizadores es su especificidad hacia la estructura de los sustratos. Sin embargo, en el contexto de ITT, en donde coexisten más de 10,000 diferentes tinturas y pigmentos, la especificidad se convierte en una desventaja. Para combatir este inconveniente la reacción enzimática de las enzimas oxidativas se, puede incorporar a la reacción a un mediador redox (Fig. 8) ^{3,15,40,41}.

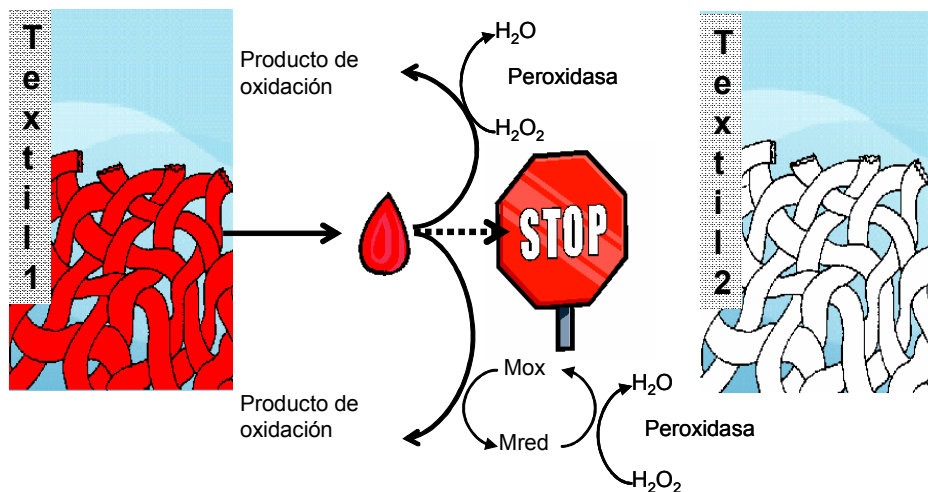


Fig. 8. Representación del proceso de ITT. Mox denota el mediador oxidado y Mred al mediador reducido.

mayor intensidad en la tintura puede transmitirse a un textil 2 de menor intensidad. La degradación de los cromóforos liberados por el textil 1 mediante la catálisis de una peroxidada de puede ser directa, es decir, si la peroxidada utiliza como sustrato al cromóforo, o mediante el uso de un mediador redox generando un producto de

oxidación no colorido. Este juego de interacciones busca generar un producto que permita el lavado de textiles con tinciones diferentes generando un bienestar al reducir tiempo y energía en el lavado.

2.4 Otras aplicaciones de las enzimas oxidativas en la industria

Debido a su enorme potencial, el campo de aplicación para enzimas oxidativas es muy atractivo. Sin embargo, fue poco explotado durante la etapa temprana de la Biotecnología. Es más, la brecha que existe entre el número de oxidasas del repertorio natural y las utilizadas dentro de aplicaciones industriales crea el espacio y potencial idóneos para la búsqueda de nuevos procesos de biocatálisis mediados por éstas^{30,42}.

Dentro de las pocas aplicaciones a las cuales las oxidasas se han aplicado Figuran:

- Aplicaciones textiles como la de lacasas utilizadas en combinación con peróxido de hidrógeno para el blanqueado del algodón. De igual manera se ha promovido su uso en la conversión de precursores de tintura mejorando la calidad del teñido, además de que promueve la conversión del precursor ya unido en las fibras lo cual asegura una unión más fuerte entre la fibra y la molécula colorida⁴².
- En la industria alimenticia se han utilizado la glucosa oxidasa, la lipo-oxigenasa, peroxidasa y polifenol oxidasas durante la preparación de productos horneados. El uso de oxidasas conlleva a diferentes cambios fisicoquímicos en la masa influenciando parámetros como volumen, textura y estructura de la migaja en el producto horneado y efectos de blanqueado, mediante la modificación de proteínas de gluten³⁵. También se han usado lacasas en el mejoramiento y modificación de la apariencia colorida de bebidas y comida. Incluso se han utilizado glucosa oxidasas y catalasas para incrementar la frescura en camarones y peces conservados^{35,42}.
- Las oxidasas poseen aplicaciones no sólo dentro de la industria química sino también pueden ayudar a proteger al medio ambiente, siendo las peroxidasa el ejemplo más frecuente. Dado que los cromóforos son compuestos muy estables, con los tratamientos habituales que se aplican a aguas residuales no se

remueven de manera eficiente, resultando ser fuertes contaminantes de los cuerpos de agua. Utilizando hemo-peroxidasas para transformar las tinturas desechadas por la industria textil (en conjunto con lacasas) es posible el blanqueado, degradación o polimerización de los desechos para facilitar los tratamientos sucesivos. El ciclo catalítico del sistema puede requerir de la acción de un mediador redox para completar la oxidación de los cromóforos. Otro ejemplo de la aplicación de oxidasas en el manejo de desechos es el uso de catalasas para eliminar el peróxido de hidrógeno, conduciendo a la formación de oxígeno y agua. Esta aplicación ha encontrado un nicho dentro del proceso de tintura, en el paso donde se requiere remover el exceso de peróxido de las fibras blanqueadas antes de la aplicación del colorante. El uso de catalasas reduce el consumo de agua y energía ^{10,42}.

- Desde 1960 se han intentado patentar diferentes sistemas de oxidasas para uso en la industria cosmética; más específicamente, el uso de oxidasas, peroxidasas y tirosinasas como substitutos del sistema de peróxido de hidrógeno para conseguir un proceso de teñido capilar ligero. Para el año 2004 no se contaba con ningún producto que aplicara este método, sin embargo, un promedio de 40 nuevas patentes aparecen anualmente ligadas a metodologías relacionadas con teñido capilar, lo cual puede traducirse como el interés de las compañías (L'Oréal, Wella, Lion, Henkel y Kao) por mejorar las características de sus productos enzimáticos. ²⁹.

2.5 ¿Peroxidasas para detergentes?

El uso de las oxidasas dentro de las diferentes industrias se ha abierto paso lentamente. La industria de los detergentes ha puesto especial atención al uso de las enzimas como biocatalizadores y de forma reciente se ha interesado por el uso de oxidasas para las nuevas formulaciones. La Zo peroxidasa (ZoPrx), es una novedosa hemo-peroxidasa ácida intrínsecamente resistente a la inactivación por peróxido de hidrógeno, característica que no se ha reportado anteriormente. Esta enzima se obtiene del rábano japonés *R. sativus* L. var. Daikon y fue identificada como una hemo-proteína debido a su banda Soret a 403 nm. Es una especie monomérica con una masa molecular de 47 KD y punto isoeléctrico a pH 4 ^{21,22}.

Resultados preliminares obtenidos por Paloma Gil en el laboratorio indican que la ZoPrx es más cercana evolutivamente a las peroxidadas ácidas ATPrx53 de *A. thaliana* y HRP2 de *A. Rusticana* que a ninguna otra de las aproximadamente 3,000 homólogas reportadas a la fecha. La evaluación de estabilidad oxidativa confirma, de manera sistemática, la superioridad de la ZoPrx respecto a su homóloga estructural, la HRP2 (Fig. 9). Es importante mencionar que en estudios realizados por otros autores se había documentado que la HRP2 era la isoperoxidasa de plantas más estable a inactivación oxidativa conocida.

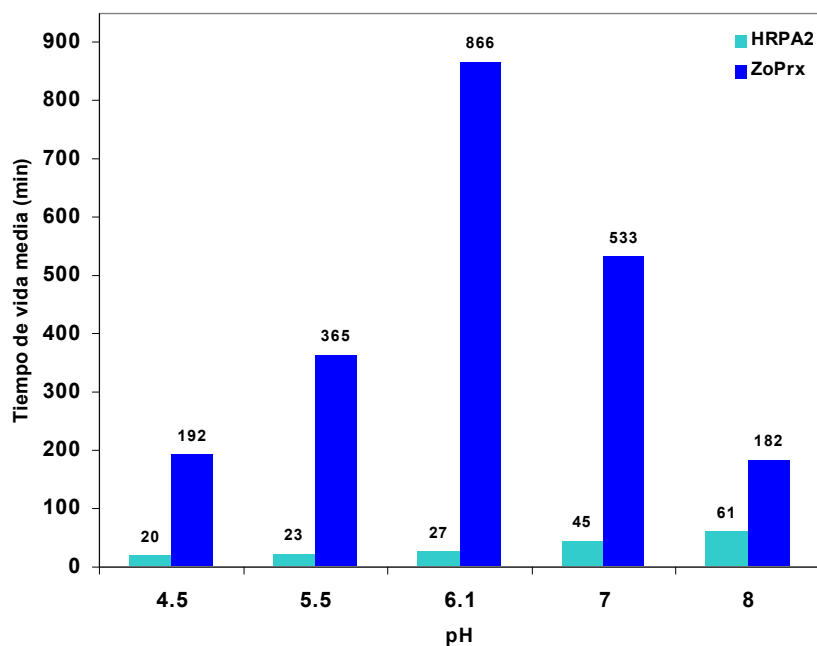


Fig. 9. Tiempo de vida media a diferentes pHs de HRP2 y ZoPrx , incubadas con 10 mM de H₂O₂ ^{modificado de²²}.

La identificación de regiones equivalentes para la catálisis reconocidas en peroxidadas lábiles, indica que la estabilidad oxidativa de la ZoPrx podría no estar conferida por una estructura significativamente diferente, sino que apunta a que puede deberse a elementos discretos, ligados a su catálisis, igual de eficiente que cualquier otra conocida ²².

Debido a su gran estabilidad, característica que no comparte con ninguna otra peroxidasa conocida, la ZoPrx se erige como una enzima con un amplio potencial para su uso como biocatalizador o para ser tomada como un modelo para el diseño de nuevos biocatalizadores. Dentro del sistema de ITT la característica intrínseca de resistencia a

H₂O₂ es de gran valor potencial para evitar la inactivación por éste o sus precursores dentro de los detergentes y tener una enzima estable durante el tiempo de lavado. Hay que tener presente que en los sistemas de ITT los cromóforos a ser blanqueados no se encuentran presentes desde el principio del lavado, sino que se comienzan a desprender durante el proceso. Por esto, la adición de una enzima con las características de la ZoPrx nos aseguraría que la reacción de ITT ocurrirá durante todo el proceso de lavado y no sólo al principio ^{14,23}.

3. Hipótesis

La estabilidad oxidativa de la ZoPrx le conferirá estabilidad operativa como aditivo para detergentes.

4. Objetivo

El objetivo general de este estudio es comprobar la estabilidad operativa de la ZoPrx en detergentes, comparándole con la HRP2.

Objetivos Particulares

- Analizar el potencial de la ZoPrx de realizar inhibición de transferencia de tinturas.
- Evaluar la estabilidad de la ZoPrx en diluciones detergentes.
- Realizar pruebas de anaquel.

5. Material y Método

5.1 Reactivos.

Todos los reactivos usados fueron calidad analítica y provinieron de Sigma-Aldrich, a reserva de que se indique lo contrario en el texto. La Zo Peroxidasa se purificó según la metodología de Gil. Veinte kilogramos de rábanos fueron procesados con un extractor comercial. El extracto crudo fue equilibrado con amortiguador fosfatos 10mM, pH6.1, centrifugado a 20, 000 rpm y concentrado a 1, 3 L por ultrafiltración. El sobrenadante fue cargado en una columna de intercambio catiónico fuerte (pH 6.1) y eluida con un gradiente lineal 0-1 mM NaCl. Las fracciones efluentes seleccionadas se cargaron en una columna de intercambio aniónico fuerte (pH 6.1), la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal 0-100 mM NaCl. El efluente se hizo pasar por una matriz de intercambio catiónico débil (pH 4). Las fracciones seleccionadas se sometieron a cromatografía de interacción hidrofóbica (pH 6.1) y se eluyó en un gradiente lineal de 1.8-0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La actividad de peroxidasa durante la purificación se siguió utilizando 16mM de guayacol ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como sustrato y 1 mM de H_2O_2 en 1ml de amortiguador fosfatos 100 mM, pH 6.1²².

La HRP2 se obtuvo de Sigma-Aldrich y se usó sin mayor procesamiento. Los detergentes utilizados se encuentran disponibles para uso doméstico y fueron adquiridos en una tienda de autoservicio local, TriZyme y Sa8 de Amway, Viva, Mas Ropa obscura, Mas Blancura, Mas Ropa delicada y Mas Color de Henkel, y Foca de La Corona.

5.2 Caracterización de los detergentes utilizados.

Los detergentes fueron sometidos a una caracterización inicial que consistió en la determinación de pH en solución acuosa (en agua tetradestilada y según las instrucciones del fabricante).

La estimación de su capacidad proteolítica intrínseca mediante dos procedimientos independientes. Uno cualitativo utilizando un soporte acuoso de gelatina al 10%. La gelatina se disolvió en agua caliente y se dejó solidificar en cajas de petri de 15 cm de diámetro, los detergentes se aplicaron como gotas sobre el

soporte de gelatina y se dejaron incubar por 12 hrs; la actividad proteolítica se considero como proporcional al diámetro de las placas de lisis respecto a dos controles, pepsina como control positivo y Extran MA01 de Merck (pH 12) como control negativo del efecto de los surfactantes en la matriz.

El método cuantitativo de proteólisis consistió en la comparación de la capacidad de los detergentes para hidrolizar muestras de albúmina sérica bovina (0.5 mg/ml) respecto a pepsina. El procedimiento consistió en mezclar diferentes diluciones del detergente con la albúmina, se incubaron a temperatura ambiente, al pH del detergente y se tomaron alícuotas a tiempos determinados, deteniendo la reacción mediante la adición de un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete de Roche). Posteriormente se observaron las bandas de proteína residual en un gel SDS-PAGE al 10%, el cual fue procesado digitalmente y la imagen analizada con el programa Scion Image-Release Alpha 4.0.3.2 de Scion Co.

El contenido intrínseco de peróxido de hidrógeno en los detergentes se determinó mediante la evaluación de actividad de peroxidasa con la oxidación de guayacol por la HRP2 en el detergente diluido al pH correspondiente. Los amortiguadores utilizados fueron: fosfatos 100 mM pH 6.1 (Fluka), tris-HCl 100 mM pH 6.8, HEPES 100 mM pH 7.7, y boratos 100 mM pH 9.5. La concentración de peróxido en la muestra se calculó comparando con una curva patrón obtenida con la misma enzima usando concentraciones conocidas de peróxido de 0.5 mM a 2 mM.

Finalmente, la actividad de oxidasa intrínseca en los detergentes se determinó espectroscópicamente mediante la adición de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en el detergente diluido para monitorear la presencia de peroxidasas o de 2,6-dimetoxifenol 2 mM ($\epsilon_{468} = 214.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para lacasas al pH correspondiente.

5.3 Estabilidad de las peroxidasas en los detergentes.

Se prepararon diluciones del detergente en agua según lo indican los fabricantes, posteriormente se añadió la enzima (ZoPrx 23 ng/ml ó HRP2 4 ng/ml) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la actividad residual como la velocidad inicial de la oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en el amortiguador correspondiente al pH de cada detergente por triplicado. La estabilidad se expresa como la vida media de la actividad resultante de ajustar los datos experimentales con el programa Enz-Fitter de Biosoft.

5.4 Perfil de pH de las peroxidasas.

La actividad relativa de las enzimas en un intervalo de pH entre 6 y 9 se determinó con la velocidad inicial de la oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en los amortiguadores fosfatos 100 mM pH 6.1, tris-HCl 100 mM pH 6.8, HEPES 100 mM pH 7.7, ó boratos 100 mM pH 9.5.

5.5 Oxidación de colorantes modelo.

La actividad oxidativa de las peroxidasas frente a los colorantes Chicago Sky Blue y Rojo Congo se monitoreó espectroscópicamente mediante una serie de barridos en el rango de 250-700 nm con una mezcla conteniendo 31 ng/ml de ZoPrx ó 15 ng/ml de HRP2, colorante 0.05 mM y H₂O₂ 10 mM en amortiguador fosfato 100 mM pH 6.1. En el ensayo se probaron ambas rutas del proceso de ITT, la directa y la indirecta utilizando ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] 1 mM como mediador (el exceso de ABTS oxidado se eliminó al reducirlo con 1,4-Dithiotreitol al momento de medir). Para evaluar la actividad oxidativa en presencia de los detergentes diluidos se adicionó el detergente a la mezcla previamente descrita excepto por una reducción de la concentración de ZoPrx a 10 ng/ml y ABTS a 500 ng/ml. En este caso la reacción se incubó por 24 hrs. a temperatura ambiente. Para este ensayo se tomó en cuenta que las concentraciones de enzima y mediador utilizadas en formulaciones comerciales son muy bajas. A los barridos espectroscópicos se les determinó el centro de masa utilizando la ecuación $R = 1/M \sum m_i r_i$ en los datos observados en donde m denota la absorbancia, M la suma de todas las m y r la longitud de onda en cada uno de los puntos del barrido espectroscópico. El cálculo de las constantes de decoloración se realizó ajustando los datos de centros de masa obtenidos con el programa Enz-Fitter de Biosoft.

5.6 Prueba de rendimiento en telas.

Se monitoreó la capacidad de las peroxidasas para realizar ITT en un ciclo de lavado usando fragmentos de tela 100% algodón teñido con Chicago Sky Blue y sin teñir. Para la tinción se hirvieron fragmentos de 2.5 cm² de tela durante 10 min. en agua con el colorante y 0.5 M de NaCl. Los trozos de tela se enjuagaron en agua hasta eliminar el exceso de colorante de la tela y se secaron. Los trozos de tela teñidos se lavaron conjuntamente con trozos de igual tamaño de tela sin teñir. La mezcla de

lavado consistió en 10 ml de una mezcla de amortiguador fosfatos 10 mM pH 6.1 y 31 ng de ZoPrx ó 15 ng de HRP2, 0.5 mM de ABTS como mediador y H₂O₂ 10 mM. Para observar la capacidad de los detergentes comerciales para realizar ITT, se hizo un ensayo similar usando los diferentes detergentes diluidos en agua. El proceso de lavado consistió en 15 minutos de lavado utilizando la mezcla mencionada previamente, seguidos de tres ciclos de enjuague de 15 min. cada uno usando agua tridestilada. Se dejaron secar las muestras de tela, se procesaron digitalmente y la imagen fue analizada con el programa Scion Image-Release Alpha 4.0.3.2 de Scion Co. La transmisión de tinturas se expresa como el porcentaje de transmisión de Chicago sky blue desde el trozo de tela teñido a la tela blanca, comparando con los fragmentos sin procesar.

5.7 Prueba de anaquel.

Para estimar la vida de anaquel de la enzima en detergente concentrado, se adicionaron ZoPrx ó HRP2 a 1 ml de detergente de tal forma que al disolver el detergente la enzima mostrara 1U de absorbancia de la oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10mM. Esta mezcla se dejó incubar por tiempos determinados y la actividad residual de las enzimas se monitoreó como la velocidad inicial de la oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en amortiguador fosfatos 100 mM pH 6.1.

5.8 Determinación de la energía de activación.

La energía de activación de cada una de las enzimas se determinó con la actividad inicial de la enzima en un intervalo de temperatura de 5-80° C. Los ensayos se realizaron en amortiguador fosfatos 100mM pH 6.1 previamente atemperado y se midió la velocidad inicial de la oxidación de guayacol 20 mM y H₂O₂ 10 mM en 1ml de amortiguador. El cálculo se realizó utilizando la ecuación de Arrhenius $E_a = -RT \ln(k/A)$ sobre los datos experimentales ajustados

6. Resultados

6.1 Caracterización de los detergentes utilizados.

El primer paso en este estudio fue la caracterización bioquímica de los detergentes comerciales, especialmente las actividades enzimáticas, ya que la legislación actual sólo obliga a declarar aquellos componentes que representen más de un 2% del volumen total del producto. Esta caracterización nos ofrece un panorama de las condiciones en las cuales se evaluará el desempeño de la ZoPrx y HRP2.

Nuestra caracterización indica que ninguno de los detergentes contiene actividad de peroxidasas y sólo uno de ellos presenta actividad de lacasa en Mas ropa oscura, a niveles tan bajos que solo se puede observar después de incubar la dilución más de 12 hrs con el sustrato 2,6 DMP. Para determinar la concentración de H₂O₂ dentro de los detergentes se hizo un primer ensayo utilizando la HRP2 en el cual se evaluó la actividad de peroxidasa sin la adición de H₂O₂. El único detergente que contiene H₂O₂ fue el Tri-zyme (1.75 mM).

Dado que una alta actividad proteolítica en las matrices podría impactar directamente en la estabilidad operativa de la ZoPrx, utilizamos dos métodos diferentes para evaluarla: cualitativamente en placas de gelatina y cuantitativamente por degradación de BSA en solución. En el ensayo cualitativo se observó que dos de los detergentes (Tri-zyme y Mas ropa oscura) desarrollan halo de proteólisis como el que presenta la muestra control, siendo más evidente en el primer caso (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación cualitativa de actividad proteolítica en detergentes, en la tabla se muestra la presencia o ausencia de actividad. ST indica que las gotas no fueron tratadas, I denota las gotas tratadas con el inhibidor (COMPLETE).

	ST	I
SA8 gelzyme	x	x
Viva	x	x
Foca	x	x
Mas ropa Oscura	✓	x
Mas ropa Delicada	x	x
Mas Color	x	x
Mas Blancura	x	x
Tri-zyme	✓✓	x
Extran	x	x
Pepsina	✓✓✓	x

De las dos muestras positivas en el ensayo cualitativo, solo fue posible cuantificar la actividad proteolítica presente en el detergente Trizyme ya que aún para ésta, el tiempo de incubación requerido para evidenciar la degradación de la BSA fue muy extenso (Fig. 11). La Figura 12 panel inferior nos muestra la cinética que se obtuvo de la degradación de BSA por el detergente Trizyme obteniendo una constante de degradación de 0.63 U/m que contrasta con el que se obtuvo con pepsina de 4.7 U/m (Fig. 12; panel superior), definiendo como una unidad la cantidad de BSA necesaria para generar una unidad de intensidad con Scion image en la imagen digitalizada.

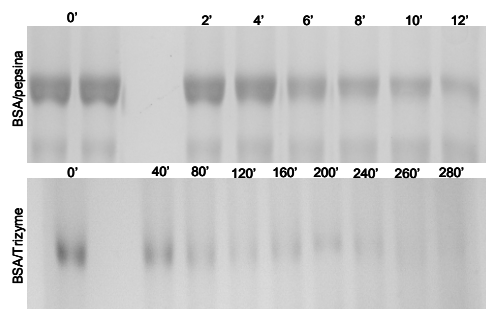


Fig. 11. SDS-PAGE, BSA incubada con pepsina (arriba) BSA incubada con Trizyme (abajo).

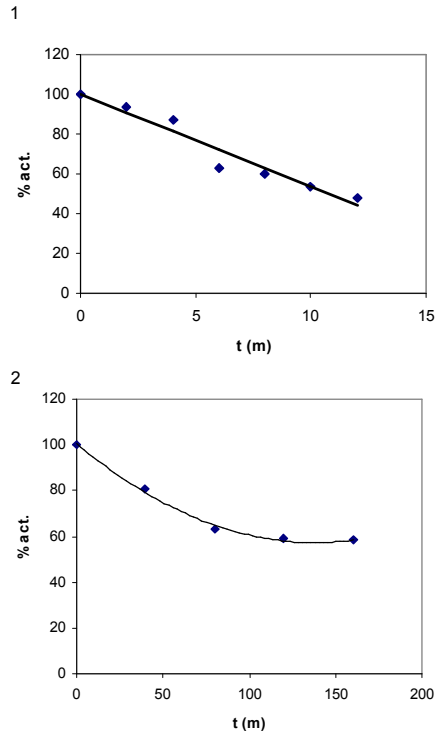


Fig. 12. Datos ajustados de la intensidad de las bandas de BSA en el gel SDS-PAGE para 1) la incubación con pepsina y 2) con Trizyme

6.2 Estabilidad funcional de las peroxidasas en los detergentes

El siguiente paso para poder comprobar nuestra hipótesis fue analizar la estabilidad de la ZoPrx dentro de una matriz formada por la dilución del detergente. Es importante que nuestra enzima sea capaz de completar su ciclo catalítico de forma eficiente y estable dentro de los detergentes en un tiempo considerado de acción en el lavado. Esta no es una aproximación ortodoxa, ya que usualmente los fabricantes generan una formulación en función de las condiciones óptimas de las enzimas usadas como aditivo y no al revés. Sin embargo, nos permite evaluar diferentes condiciones en una aproximación mas realista a los problemas que se podría enfrentar una formulación estándar.

En la Figura 13 se muestra comparativamente la vida media de las enzimas en diluciones del detergente comercial. Como podemos observar, la ZoPrx presenta una mayor estabilidad respecto a la HRP2 (14 veces en promedio), siendo los casos extremos el Más blancura (41.5 veces) y el Sa8 gelzyme (1.3 veces).

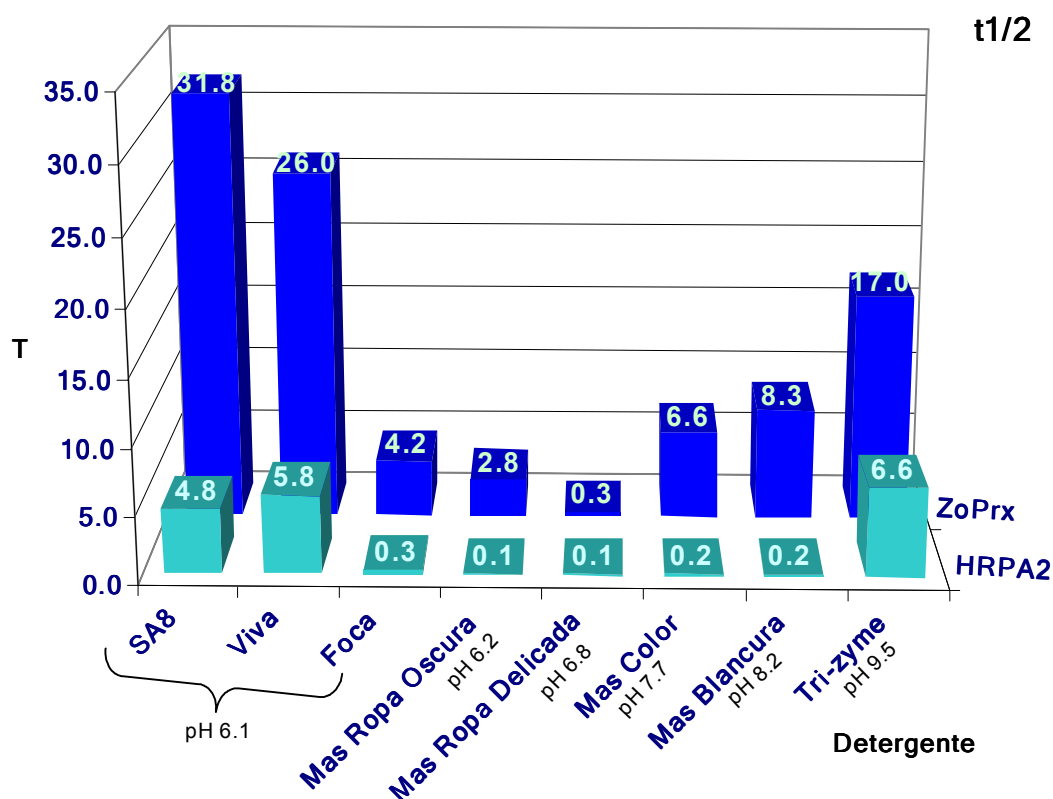


Fig. 13. Tiempo de vida media en horas calculado para la ZoPrx (en azul) y para la HRP2 (en verde) en dilución de detergentes comerciales.

El mejor desempeño de la ZoPrx puede estar relacionado con su tolerancia oxidativa intrínseca, propiedad que no comparte la HRPA2, aunque también pudiera estar relacionada con el pH de la solución detergente. Hay que recordar que cada enzima posee un pH óptimo en el cual su actividad es máxima. Para poder discriminar entre estos posibles factores se determinó el perfil de la actividad de ZoPrx y HRPA2 a los mismos valores de pH establecidos para la dilución de los detergentes (Fig. 14). En ambos casos el pH óptimo es 6.1, mientras que para la ZoPrx la actividad disminuye alrededor de 40% a pH 7.7 y hasta 90% a pH 8.2; en este pH la HRPA2 solo disminuye un 60%. De manera interesante, el mejor desempeño de la ZoPrx fue a valores de pH básicos (Más Blancura y Más Color), condición en la que la HRPA2 presenta mejor actividad residual en. En consecuencia, podemos concluir que el efecto de la disminución de estabilidad ante los detergentes encontrado en cada una de las diluciones no es consecuencia del pH.

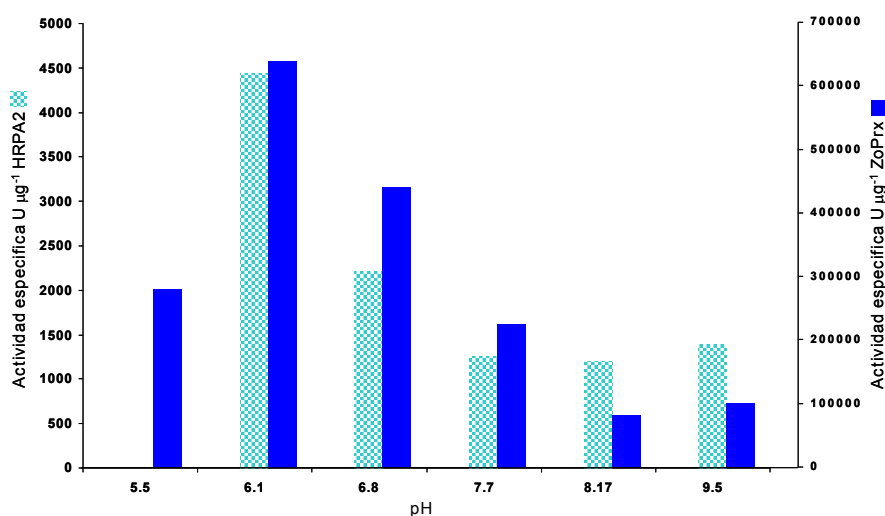


Fig. 14. Actividad específica respecto a pH para la ZoPrx y la HRPA2

6.3 Oxidación de colorantes modelo

La siguiente prueba, necesaria para documentar el potencial de la ZoPrx en la industria de los detergentes, consistió en comprobar su capacidad de realizar la ITT, y en caso de ser posible, elucidar el mecanismo utilizado. En trabajos previos se ha reportado la utilización del colorante *Chicago sky blue* para la evaluación del desempeño de oxidorreductasas en ITT^{14,33}. Adicionalmente probamos el Rojo Congo, otro colorante azo con diferentes grupos sustituyentes (Fig. 15)⁴¹. Para las pruebas de

oxidación de colorantes se exploraron las dos vías descritas previamente, con y sin mediador.

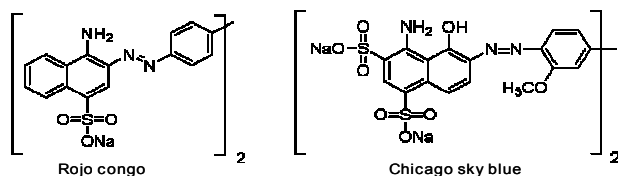


Fig. 15. Estructura de los colorantes Rojo Congo (izq) y Chicago sky blue (der).

Ninguna de las dos enzimas fue capaz de realizar la oxidación de colorantes modelo sin un mediador, lo cual sugiere que las moléculas de colorante no pueden adentrarse en el sitio activo de las enzimas y por lo tanto no son sustrato directo de éstas. Para superar la limitación, usamos como mediador ABTS, fácilmente oxidado por ambas enzimas y utilizado previamente como mediador en un sistema de ITT ¹⁹. Debido a que la oxidación de ABTS da como producto un radical libre catiónico colorido que interfiere la observación espectroscópica, se optó por reducir la reacción con DTT para poder hacer el barrido. En la Figura 16 podemos observar que tanto la ZoPrx como la HRP2 son capaces de realizar la oxidación de colorantes modelo mediada por ABTS.

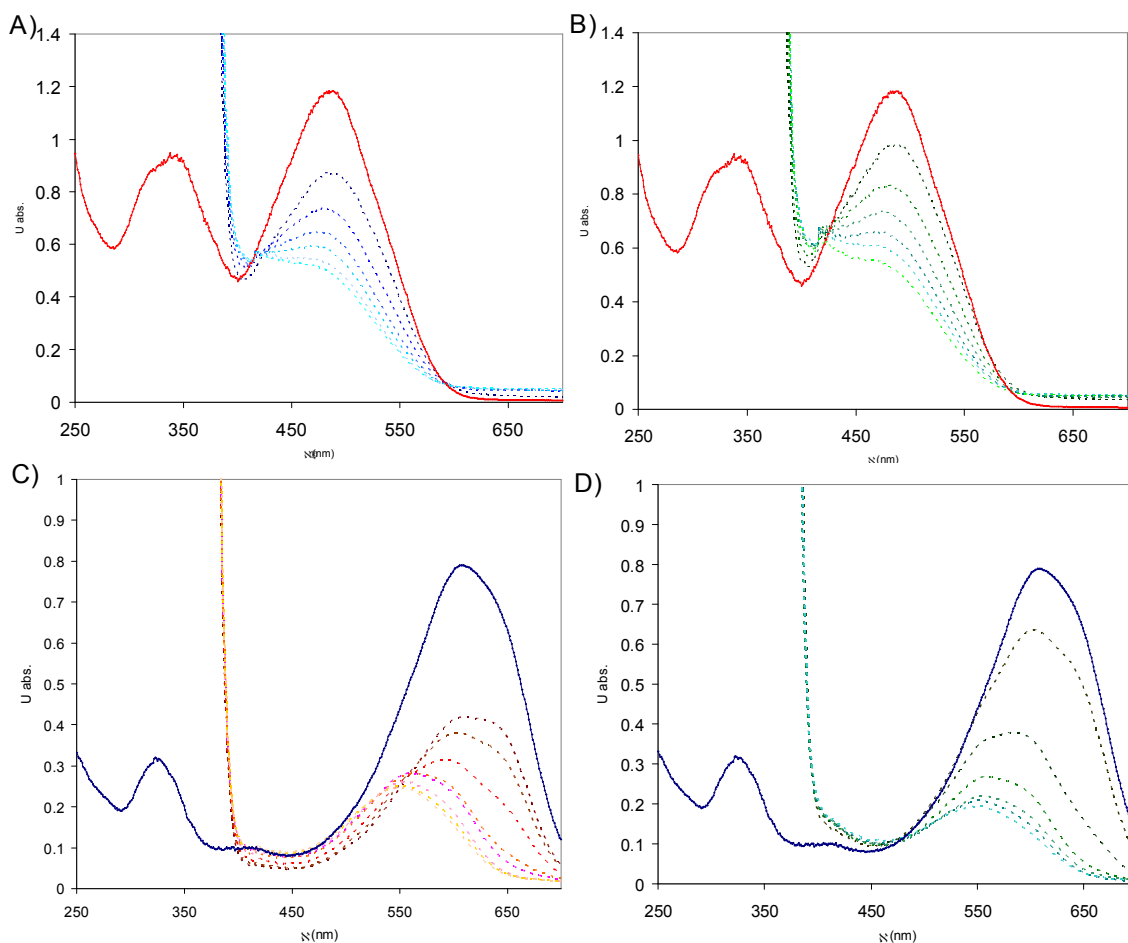


Fig. 16. Cinética de decoloración de Rojo Congo (paneles A y B) y de *Chicago Sky Blue* (paneles C y D) por acción de las peroxidasas ZoPrx (paneles A y C) ó HRP2 (paneles B y D). la línea sólida es el colorante sin tratamiento, mientras que las líneas punteadas son los tratamientos con las enzimas para cada uno de los casos en tiempos de 10 min. para Rojo congo y cada 3 min. para la ZoPrx con el *Chicago sky blue* y 15 min. para la HRP2.

Los paneles inferiores de la Figura 16 muestran la oxidación de *Chicago sky blue* tanto para la ZoPrx como para la HRP2, hay que resaltar que para la ZoPrx los tiempos entre cada una de las líneas punteadas son cinco veces menores que los tiempos para cada una de las líneas de la HRP2. Esto nos habla de la velocidad con la que la ZoPrx degrada el ABTS que se encuentra reaccionando con las moléculas de colorante. Situación favorable en una reacción de ITT ya que una mejor velocidad de reacción es significativa al intentar combatir las tinciones liberadas por los textiles en el lavado, asegurando así, que los cromóforos no lleguen a otras telas. Para poder cuantificar este fenómeno, se calculó el centro de masa de cada uno de los barridos espectroscópicos para poder obtener su constante de decoloración (Tabla 3).

Tabla 3. Constantes de decoloración para la ZoPrx y HRP A2 utilizando como colorante Rojo congo y *Chicago sky blue*.

Rojo Congo	Constante de decoloración	U Abs. min⁻¹
ZoPrx	8.306* 10⁻⁵	
HRPA2	8.411* 10⁻⁵	
<i>Chicago Sky blue</i>		
ZoPrx	5.4* 10⁻²	
HRPA2	5.0* 10⁻⁸	

Las constantes de decoloración utilizando Rojo Congo son muy similares para ambas enzimas, en donde se puede observar una diferencia muy marcada es en la constante de decoloración para el *Chicago Sky Blue* la constante para la ZoPrx es superior a la de HRP A2 por varios órdenes de magnitud, indicando la superioridad de la primera para realizar la reacción.

Con la intención de evaluar si la ZoPrx tiene potencial para realizar la reacción de ITT en detergentes, probamos su capacidad para decolorar tanto el Rojo Congo como el *Chicago Sky Blue* en una dilución de las preparaciones comerciales. Mientras que la reacción con Rojo Congo no muestra ningún cambio aún después de 24 hrs de incubada (datos no mostrados), la reacción con *Chicago Sky Blue* brindó evidencias de la capacidad de la ZoPrx para decolorarlo en presencia de cinco de los ocho detergentes probados (Fig. 17).

	ST	ZoPrx	HRPA2	ZoPrx	HRPA2
SA8				38.3	70.2
Tri-zyme				85.1	74.4
Mas ropa delicada				79.6	94.9
Viva				39.8	80
Foca				67.2	93.8
Mas Ropa oscura				13.2	91.6
Mas color				0	93.6
Mas blancura				12.9	97.7

Fig. 17. Prueba de ITT en diluciones detergentes con Chicago sky blue, de izquierda a derecha 1) mezcla sin tratamiento, 2) ZoPrx y 3) HRPA2. Los datos a la derecha de los pozos indican el porcentaje de decoloración de los mismos con respecto a la mezcla sin enzima.

Con base en estos resultados, la ZoPrx parece ser una muy buena candidata para ser utilizada dentro de los detergentes para el sistema de ITT, demostrando estabilidad ante las diferentes condiciones de los detergentes y oxidación de colorantes (en este caso *Chicago sky blue*). Es importante tener en consideración que existen cuatro factores por los que las peroxidases pueden presentar comportamiento diferencial bajo estas condiciones: 1) la desigual tolerancia al H_2O_2 ; 2) la estabilidad de cada una de ellas frente a la dilución detergente; 3) la eficiencia en la utilización del sustrato [ABTS en este caso]; y 4) el desempeño al pH de la formulación del detergente. Todas estas variantes pueden ser el motivo por el cual la HRPA2 no muestre oxidación de los colorantes dentro de la matriz detergente a pesar de haber mostrado oxidación de los colorantes al pH óptimo de la enzima como se muestra en las constantes de decoloración. Este hecho nos permite asegurar la superioridad de la ZoPrx ante la HRPA2 en sistemas detergentes.

6.4 Prueba de ITT con telas

Los experimentos anteriores indican que la ZoPrx tiene un mejor potencial para la realización de ITT. Para valorar esto, diseñamos una prueba de transferencia de tinte utilizando tela de algodón teñida con Chicago Sky Blue en el laboratorio. En la Tabla 4 podemos ver el desempeño de diferentes aditivos en cuanto a su capacidad para inhibir la transferencia de color entre la tela teñida y la tela sin teñir. Entre las dos enzimas probadas, la ZoPrx es significativamente superior comparada con la HRP2 al reducir 2.4 veces la redeposición del colorante. La ITT intrínseca a la formulación detergente se puede observar en la Tabla 4, en donde se comparan el desempeño de las formulaciones comerciales en el ensayo de ITT. Es importante considerar que la prueba se realizó con concentraciones excesivas de colorante en la mezcla de lavado por lo que es razonable esperar que en condiciones normales la magnitud de desempeño de la ZoPrx sea aún mayor.

Tabla 4. Porcentaje de ITT para cada una de las condiciones de lavado (25°, 15 min. por ciclo) en un ciclo de lavado típico utilizando ZoPrx y HRP2.

Aditivo	% ITT (Desv. est.)
Ninguno	0 (1.8)
H ₂ O ₂	5.2 (0.2)
ABTS	11.5 (0.2)
HRPA + H ₂ O ₂ + ABTS	12.3 (4.4)
ZoPrx + H ₂ O ₂ + ABTS	30.0 (0.6)
Más Color	23.4 (3.4)
Sa 8	32.2 (0.05)
Foca	38.0 (0.14)
Más Ropa Delicada	38.6 (0.06)
Viva	40.7 (0.1)
Más Ropa Oscura	44.0 (0)
Más Blancura	47.7 (0.4)

En la siguiente Figura (Fig. 18) se muestran los alcances de la prueba de ITT comparando cuatro diferentes condiciones, entre ellas con Más Blancura, el detergente que ofreció el mejor desempeño y donde podemos ver que la adición de ZoPrx produce un efecto tan bueno como este último detergente, producto de una compleja formulación.

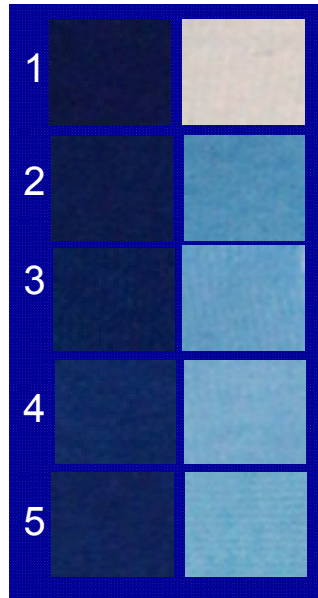


Fig. 18. Rendimiento de ITT en telas. En el panel de la izq. observamos la tela teñida y en el de la derecha la tela sin teñir después de la prueba de lavado. 1) Sin tratamiento, 2) Amortiguador, 3) HRP2, 4) ZoPrx y 5) Mas Blancura.

6.5 Pruebas de anaquel

Realizamos una prueba preliminar de estabilidad de las enzimas al almacenamiento en las formulaciones comerciales. Desgraciadamente ninguna de las dos enzimas resultó estable al ser incorporada a la fórmula detergente sin mayor modificación. Sin embargo, la ZoPrx resistió hasta 30 min. en algunos de los detergentes comparado con ninguna resistencia por parte de la HRP2.

Uno de los efectos observados en la prueba de anaquel fue la formación de turbidez en el detergente. El origen de éste fenómeno no queda del todo claro pero pudimos descartar que fuera efecto de la carga proteica añadida a la fórmula detergente o que fuera efecto del grupo hemo de las peroxidasas reaccionando con algún componente del detergente (datos no mostrados).

6.6 Determinación de la energía de activación

Calculamos la energía de activación para la HRP A2 y la ZoPrx como una herramienta para conocer si sería posible la utilización de la enzima dentro de los nuevos detergentes que optan por una reducción de la temperatura de lavado. La ZoPrx presentó una energía de activación de 5.4 KJ mol^{-1} , mientras que para la HRP A2 fue de 21.3 KJ mol^{-1} . La energía de activación de la ZoPrx es, por lo tanto, cuatro veces menor a la que necesita la HRP A2, por lo que su utilización dentro de la nueva generación de detergentes para lavado a temperaturas cercanas a 40° C como es la tendencia mundial e incluso a temperaturas ambiente (en lo que respecta a México) es viable. Esto se puede observar en la Figura 19 en donde mostramos los datos de actividad específica con respecto a temperatura, destacando la actividad dos veces mayor de la ZoPrx en temperaturas bajas cercanas a los 40° C . Una variación en la temperatura de la HRP A2 muestra un aumento en la actividad específica, que no es comparable con la variación de la temperatura de la ZoPrx, la cual no muestra un cambio en su actividad específica tan significativo como el de su homóloga (Fig. 19).

Adicionalmente, esta determinación nos aporta indicios sobre la estabilidad térmica de la ZoPrx utilizando el punto de inflexión de la curva trazada para la ecuación de Arrhenius. Esta temperatura es cercana a 85° C para la ZoPrx, cinco grados mayor que para la HRP A2.

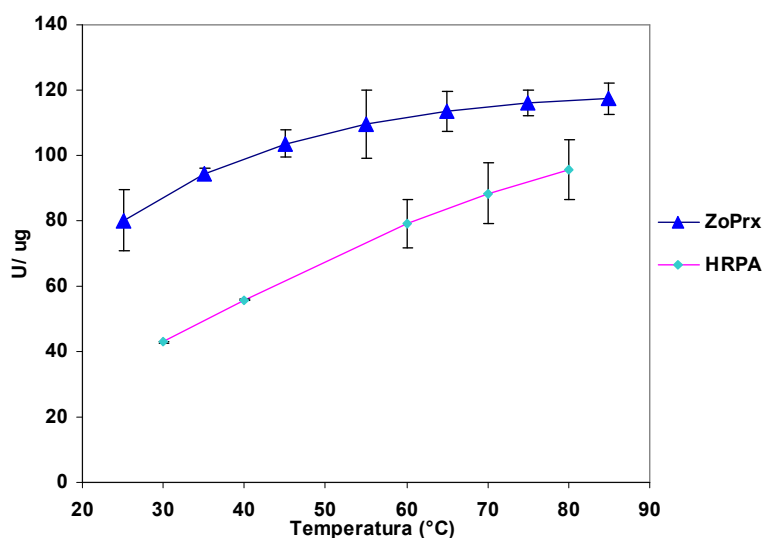


Fig. 19. Actividad específica respecto a temperatura para la ZoPrx y la HRP A2

7. Discusión y Conclusiones

En este trabajo nos concentramos en explorar la estabilidad operativa de la ZoPrx para su aplicación en la industria de los detergentes. No hay duda de que aplicaciones enzimáticas novedosas se verán en un futuro cercano favoreciendo la implementación de una biocatálisis industrial más eficiente y sostenible, lo cual se traduce en ahorro monetario ²⁵. Esta investigación es una aproximación a los programas de investigación y desarrollo dirigidos por la industria blanca.

Uno de los retos de la industria en el futuro es encontrar maneras novedosas de realizar las mismas reacciones sin un gasto energético tan elevado, especialmente, la industria química ha optado por la utilización de biocatalizadores como ya hemos mencionado anteriormente. Estos biocatalizadores despliegan un sinnúmero de beneficios a la industria, pero estos atractivos no son perfectos, p. ej. las reacciones mediadas por los biocatalizadores pueden ser de mucho agrado para sustituir procesos que involucran químicos tóxicos y altas temperaturas, pero estos biocatalizadores pueden no funcionar bajo las condiciones originales del sistema de reacción. Por eso es que la Biotecnología busca involucrar diferentes disciplinas para conseguir biocatalizadores diseñados a la medida.

En este caso en particular, la ZoPrx es una enzima provechosa para trabajar, que a diferencia de sus homólogas más cercanas, no presenta susceptibilidad al H₂O₂. Esta característica fundamenta nuestra hipótesis en la estabilidad oxidativa de la ZoPrx y nos lleva a comprobar que esta estabilidad intrínseca puede ser la característica que le otorga estabilidad operacional dentro de los detergentes.

La caracterización parcial de los detergentes elegidos para el estudio es de importancia para establecer el contexto en el cual la reacción se estará llevando a cabo permitiendo analizar las diferentes variables a las que nos enfrentamos. Los fabricantes de los detergentes están obligados a reportar los componentes de los mismos solamente cuando su concentración exceda al 2% total del volumen. Por esta razón es que una buena caracterización sobre la preexistencia de actividades enzimáticas en los detergentes es imprescindible, tanto para determinar si poseen

alguna oxidorreductasa que pueda interferir en el estudio y en segundo lugar, sobre la existencia de proteasas que puedan degradar a la ZoPrx o la HRP2.

Al encontrar que dos de los detergentes contenían en su formulación proteasas, nos enfrentábamos a la posibilidad de una proteólisis inminente de nuestras enzimas, de la cual no seríamos capaces de conocer si el daño estaba fundamentado en esta actividad. Sin embargo, como se pudo observar posteriormente, esta actividad proteolítica no es la causante de la pérdida de estabilidad de la ZoPrx ya que no correlacionan con los datos de desempeño.

En todos los ensayos realizados en este trabajo encontramos una funcionalidad superior para la ZoPrx en comparación con la HRP2, que además resulta ser suficientemente estable y capaz de soportar un ciclo de lavado completo. Esto es de suma importancia, pues los colorantes suelen desprenderse de las prendas durante todo el ciclo y no solamente en la fase inicial.

La consideración inicial de que la actividad proteolítica preexistente sería una determinante fundamental no constituyó un problema real al no ser significativa, no siendo una determinante en la pérdida de estabilidad. Por otro lado el hecho de que el perfil de actividad a diferentes valores de pH de la ZoPrx no correlacione con los niveles de estabilidad observados en la Figura 13, nos da un indicio de que el pH tampoco es el factor categórico de la pérdida de estabilidad. Finalmente, la tasa a la cual pierde su actividad la ZoPrx en los detergentes diluidos es pequeña respecto a lo que el tiempo de lavado se refiere, por lo que la estabilidad desplegada por la ZoPrx es suficiente para cubrir los requerimientos necesarios de estabilidad operativa. Así nuestra hipótesis es cierta y la estabilidad oxidativa se extiende a otras manifestaciones de estabilidad que le permitan ser funcional operativamente dentro de la dilución detergente.

La demostración concluyente sobre la eficacia de la ZoPrx, era demostrar su capacidad de realizar algún tipo de biocatálisis dentro de la fórmula del detergente. La reacción de ITT era el modelo perfecto y había que comprobar si la ZoPrx era capaz de seguir alguna de las dos rutas de la reacción. Como se mencionó anteriormente, se ha reportado la utilización de ABTS para ITT, que sabemos que es utilizada eficientemente por la ZoPrx, de forma que solo fue necesario comprobar si era capaz de realizarlo en alguno de los mecanismos propuestos. El hecho de que la ZoPrx no

utilice las moléculas de colorante elegidas para este trabajo no es un obstáculo y abre una puerta ya que el uso de un mediador generalizado no es tan selectivo como una enzima. Demostramos que tanto la ZoPrx como la HRP2 pueden realizar oxidación de colorantes en amortiguador con ayuda del mediador. De igual manera se pudo comprobar que la tasa de decoloración para el *Chicago Sky Blue* es mayor para la ZoPrx que para la HRP2. Los datos obtenidos, así como la estabilidad desplegada por la ZoPrx, la sitúan como una excelente candidata para formulaciones detergentes. El cálculo de la energía de activación nos permite perfilar a la ZoPrx como la mejor candidata para los nuevos detergentes que son utilizados a temperaturas cercanas a 40° C, asegurando que la enzima se encontrará activa sin la necesidad de recurrir a elevar la temperatura en el lavado para tener un buen desempeño en la reacción. Aún mas, el análisis del punto de inflexión de la curva trazada para la ecuación de Arrhenius nos habla de la capacidad conservar el plegamiento a una temperatura considerable dentro del proceso de lavado. Este análisis no parece ser significativo ya que estos puntos para la ZoPrx y la HRP2 se encuentran muy cercanos.

La prueba de rendimiento en el lavado para la inhibición de la transferencia de tinturas demuestra la superioridad de la ZoPrx sobre la HRP2, sin embargo el porcentaje de inhibición de la ZoPrx se encuentra dentro del rango de acción de los mejores de los detergentes para esta función. En este contexto hay que tomar en cuenta que los detergentes poseen diversos sistemas que permiten la ITT y que varios de los productos utilizados son formulados especialmente según el fabricante para lavar ropa blanca o de color. Desde el punto de vista de este proyecto, la ZoPrx se coloca como una de las mejores alternativas para ser utilizada en los detergentes una vez que el mediador apropiado sea identificado. Esto daría como resultado un producto que realice la ITT tan eficiente como los detergentes que encontramos hoy en día comercialmente.

Todos los elementos que hemos reunido para comprobar la estabilidad operativa de la ZoPrx apuntan a su superioridad comparándola con la HRP2, siendo la opción para uso dentro de los detergentes. El hecho de que no haya tolerado las pruebas de anaquel no es motivo por el cual no sea una buena opción dentro de la industria, tomando en cuenta que la mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales pueden ser modificadas químicamente o de alguna otra forma para generar un producto estable en condiciones de almacén.

En resumen, los resultados mostrados comprueban la hipótesis de la estabilidad operacional de la ZoPrx en detergentes, siendo superior a su homóloga más cercana, la HRPA2. Demostramos de igual manera su capacidad para realizar ITT de una manera eficiente y superior a la HRPA2 posicionando a la ZoPrx como una extraordinaria opción para aditivo en detergentes.

7. Perspectivas

Distinto a la simplicidad que enmarca el hecho de utilizar detergentes para realizar un trabajo científico, este ha sido un proyecto complejo ya que son múltiples los factores que intervienen en el proceso de lavado. El trabajar con una enzima que nos brinda las características de la ZoPrx genera las posibilidades de explorar metodologías implicadas en procesos industriales.

Las diferentes patentes existentes en el campo de ITT lidian con las propiedades de las peroxidasas de *Bacillus pumilus*⁴¹, *Coprinus macrorhizus*⁴⁵ y la existencia de un producto comercializado por Novo, Guardzyme. Estos nos ofrecen diferentes parámetros con los que la eficiencia de la ZoPrx debe ser comparada para comprobar su potencial operativo en detergentes. Permittiéndonos explorar la eficiencia de la ZoPrx frente a sus homologas industriales.

La prueba de rendimiento realizada en este proyecto nos deja la interrogante sobre la capacidad de la ZoPrx para realizar ITT en un detergente formulado para que las condiciones de esta sean desplegadas de tal manera que se obtenga el mejor rendimiento. Esta prueba debe de realizarse utilizando otro mediador que se reporta para el sistema enzimático de ITT, el ácido 10-propiónico^{3,41}, lo cual nos ofrecería una visión más real a la eficiencia desplegada en ITT por la ZoPrx.

Debido a que la prueba de anaquel generada en este estudio no fue significativa, proponemos la modificación de la enzima, como podría ser por un sistema que se ha revisado exhaustivamente como son la generación de agregados enzimáticos unidos químicamente (CLEAs por sus siglas en inglés) que se ha perfilado como una de las metodologías mas socorridas por la industria blanca ya que presenta una menor complejidad que otras similares ^{36,38}.

Anexo 1

Principales productos biotecnológicos y empresas que los elaboran en México.

PRODUCTO	EMPRESA
Acido acético	Casa Pedro Domecq, S. A. de C. V. y varios productores
Acido 6-aminopenicilánico	Fersinsa, S. A. de C. V.
Acido cítrico	Mexama, S. A. de C. V.
Acido clavulánico	Fermic, S. A. de C. V.
Acido giberélico	Grupo Bioquímico Mexicano
Acido fúlvicos	Química Foliar S. A. de C. V.
Aditivos probióticos	Levamex, S. A. de C. V.
α -amilasa	Enmex, S. A.
Antiinflamatorio proteolítico enzimático	Cynamid
Antocianinas	Maltos y Asociados S. A. de C. V.
Aspartame	Enzymóloga, S. A. De C. V.
Auxinas	Laboratorio Agroenzymas, S. A. de C. V.
Bioinsecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	Agrobionsa, S. A. de C. V.
<i>Pseudomonas</i> nativas	Germen, S. A. de C. V.
Bacterina contra carbón sintomático, edema maligno, enterotoxinas, hepatitis necrótica y pasteurolosis neumónica	Biotell, S. A. de C. V.
Bacterina contra brucelosis, pasteurolosis neumónica-carbón sintomático, edema maligno-pasteurolosis neumónica-carbón sintomático	Química Hoescht, S. A. de C. V.
Distintos biofertilizantes	Varios productores
Citocinas	Laboratorio Agroenzymas, S. A. de C. V.
Composta	Grupo Bioquímico Mexicano
<i>Encarcia</i>	Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Sinaloa
Eritromicina	Fermic, S.A.de C.V., Abbot Labs. de México, S. A. de C. V.
Extracto de levadura	Bioclon, S. A. de C. V.
Extracto de fresa, limón, melón y papaya	Bioextracto, S. A. de C. V.
Gentamicina	Fermic, S. A. de C. V.
Giberelinas	Laboratorio Agroenzymas, S. A. de C. V.
β -glucanasa y glucoamilasas	Enmex, S. A.
<i>Hipodamia</i>	Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Sinaloa
Hongos entomopatógenos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , y <i>Paelomyces fumoroseus</i>	Agrobionsa, S. A. de C. V.
Huevo y embrión SPF	Investigación Aplicada, S. A. de C. V.
Interferón α -2a y 2b	Probiomed, S. A. de C. V.
Inmunoglobulinas	Investigación Aplicada, S. A. de C. V.
Leche deslactosada	Neolac y Parmalat, S. A. de C. V.
Lisina grados farmacéutico y pecuario	Fermex, S. A. de C. V.
Micropropagación de Anturio Woody, <i>C. agave</i> , <i>Dieffenbachia</i> , Eucalipto y Pino	Agrobionsa, S. A. de C. V. Biogenética Mexicana, S.A. de C.V.
Micropropagación de crisantemos y de violeta africana	FIRA
Micropropagación de frambuesa, <i>Gypsophila</i> , piña y fresa	Invernamex, S. A. de C. V.

Micropropagación de gerbera	Invernamex, S.A. de C.V. FIRA y Biogenética Mexicana, S.A. de C.V.
Micropropagación de <i>Gypsophila paniculata</i>	Invernamex, S.A. de C.V. y Biogenética Mexicana, S.A. de C.V.
Micropropagación de rosas	Visaflor, S.de R.L. de C.V. y Evergreen Invernaderos S.A. de C.V.
Micropropagación de <i>Singonium</i> y de <i>Spatiphyllum</i>	Biogenética Mexicana, S. A. de C. V. y Viveros El Morro
Micropropagación de Zempoalxóchitl	Laboratorios Bioquimex, S. A. de C. V. y Maltos Asociados S. A. de C. V.
Molgramostin (GM-CSF)	Probiomed, S. A. de C. V.
Mosca estéril	Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Sinaloa
Oxitetraciclina	Fermic, S. A. de C. V.
Penicilina G	Cibiosa, S. A. de C. V.
Productos alimenticios diversos	Biotecnología y Nutrición
Producto lácteo fermentado con <i>Casei shirota</i>	Yakult, S. A. de C. V.
Proteasa neutra y alcalina	Enmex, S. A.
<i>Rhizobium japonicum</i>	Química Lucava S. A. de C. V. y Bio-Typs
Rinfamicina	Fermic, S. A. de C. V.
Semillas mejoradas de cebolla, chícharo, frijol de soya, maíz, pepino, tabaco, tomate	Agroindustrias La Moderna, S. A. de C. V.
Sistema biológico de tratamiento de efluentes gaseosos	Cydsa, S. A. de C. V.
Suero anti-alacránico, anti-viperino y anti-arácnidos	Bioclon, S. A. de C. V.
Tetraciclina	Fermic, S. A. de C. V.
Toxoide tetánico	Bioclon, S. A. de C. V.
Treonina	Fermex, S. A. de C. V.
<i>Tricoderma harcianum</i>	Biótica, S. A. de C. V.
<i>Trichograma</i>	Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Sinaloa
Triptofano	Fermex, S. A. de C. V.
Vacuna anti-diftérica y anti-poliomelítica	Gerencia General de Biológicos y Reactivos - Secretaría de Salubridad y Asistencia de México

Modificado de ¹⁷.

Anexo 2

Resumen histórico de la utilización de enzimas en los detergentes

Año	Enzima	Detergente que contiene la enzima
1913	Otto Röhm reclama el uso de enzimas tríplicas para los detergentes	Detergentes que contienen enzimas pancreáticas (Burnus, Alemania)
1945	Tripsina pancreática purificada por Schweizerische Ferment AG	Bio 38
1955	Proteasa bacteriana desarrollada por Schweizerische Ferment AG	Bio 40
1959	Proteasa bacteriana	Bio 49 (Gebr. Schnyder, Suiza)
1960	Alcalasa y Maxatasa, proteasas bacterianas industrializadas por Novo Industri, Bagsvaerd, Dinamarca y Gist-Brocades, Delft, Holanda, respectivamente.	Novo, Gebrüder Schnyder incorporan la Alcalasa a Bio 40
1963		Detergente de prelavado Biotex (Kortman &Schulte, Holanda)
1966		Primeros detergentes para trabajo pesado con proteasas bacterianas
1969		Proteasas bacterianas presentes en el 80% de los detergentes alemanes
1970		El debate alergénico conduce a una reducción sustancial del uso de enzimas en detergentes
1972	Amilasas comerciales	Se declara la seguridad del uso de enzimas en detergentes por la German Federal Health Agency
1973	Amilasas introducidas en Alemania "Esperase" proteasa alcalina	Detergentes de prelavado y remojado (Mustang, Henkel, Alemania)
1975	Proteasas líquidas para HDL (Maxatase LS, Alcalase L)	El mercado de detergentes que contienen enzimas en Alemania alcanza el 80%
1980's	Proteasas altamente alcalinas se hacen disponibles (Savinase, Novo; Maxacal, IBIS; BLAP, Henkel; Purafect, Genencor)	Se incrementa la eficacia y vida de almacén para enzimas en detergentes de uso rudo
	Celulasas	Patentado por Murata (Japon)
1982		
1986	Celulasas (Celluzyme, Novo)	
1987	Celulasa Biotex de Kao	Detergentes de uso rudo con celulasas KAC(Attack, Kao, Japón)

1988	Lipasa (Lipolase, Novo)	Detergentes de uso rudo con lipasas (Hi Top, Lion, Japón)
1988-1989	Proteasas resistentes a blanqueadores (Maxapem, Gist-Brocades; Durazym, Novo)	
1989	Maxacal (de tipo Savinasa) de Gist-brocades, Delft, Holanda y la Subtilisina Novo modificada por ingeniería genética de Genencore International, California, Estados Unidos.	
1990's	Enzimas incluidas en los detergentes alrededor del mundo (China, India y Sudamérica)	Salida al mercado de detergentes multienzimáticos en Europa, Japón y Estados Unidos
1995	Pullulasas (Pululano 6-glucohidrolasa)	

Modificado de³⁹.

8. Bibliografia

1. **Our Common Future.** 1987. UN World Commission on Environment and Development.
2. **Technology Vision 2020 The U.S. Chemical Industry.** 1996. Washington, DC, The American Chemical Society, American Institute of Chemical Engineers, The Chemical Manufacturers Association, The Council for Chemical Reserch, and The Syntetic Organic Chemical Manufacturers Association.
3. **INFORM. 8,** 950-957. 1997.
4. **Zeolites for Detergents-As nature intended.** 2000. ZEODET Association for detergent Zeolite Producers.
5. **Industrial or White Biotechnology A driver of sustainable growth in Europe.** 1-25. 2002. EuropaBio The European Association for Bioindustries.
6. **White Biotech fact sheet: Enzymes and Detergents.** 2002. EuropaBio The European Association for Bioindustries.
7. **Enzymes for Industrial Applications.** BCC Research . 2004.
8. **The New Detergent Regulation: Fact Sheet on Aerobic Biodegradation of Surfactants.** 2006. Brussels, A.I.S.E. Association Internationale de la Savonnerie, de la Detergence et des Produits d'Entretien.
9. **Ahuja S.K., Ferreira G.M., and Moreira A.R.** 2004. Utilization of Enzymes for Environmental Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **24**:125-154.
10. **Antrim R., Buchert J., Burrows H., Herbots I., Kottwitz B., Lenting H., Niku-Paavola M., Reilly P., Suurnäkki A., and Viika L.** 4 A.D. *Industrial Enzymes: Enzymes in Nonfood Applications* , p. 155-244. *In* Aehle W. (ed.), *Enzymes in Industry.* Wiley-VCH, Germany.
11. **Antrim R., Buchert J., Burrows H., Herbots I., Kottwitz B., Lenting H., Niku-Paavola M., Reilly P., Suurnäkki A., and Viika L.** 4 A.D. *Industrial Enzymes: Enzymes in Nonfood Applications* , p. 155-244. *In* Aehle W. (ed.), *Enzymes in Industry.* Wiley-VCH, Germany.
12. **Antrim R., Buchert J., Burrows H., Herbots I., Kottwitz B., Lenting H., Niku-Paavola M., Reilly P., Suurnäkki A., and Viika L.** 4 A.D. *Industrial Enzymes: Enzymes in Nonfood Applications* , p. 155-244. *In* Aehle W. (ed.), *Enzymes in Industry.* Wiley-VCH, Germany.
13. **Challenger C.** 2003. *Innovating for Succes in Industrial Enzymes.* Chemical Market ReporterFR10.

14. **Cherry J.R., Lamsa M.H., Schnider P., Vind J., Svendensen A., Jones A., and Pendersen A.H.** 1999. Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology* **17**:379-384.
15. **Damhus T., Kirk O., Pedersen G., and Venegas M.** Dye Transfer Inhibition. Novo Nordisk A/S. PCT/DK90/00261[WO 91/05839]. 1990. US. Patent
16. **Dannacher J.J.** 2006. Catalytic bleach: Most valuable applications for smart oxidation chemistry. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **251**:159-176.
17. **Diaz C, Castañon R., Solleiro J.L., and Ortega P.** 2003. Perfil de la Industria Biotecnológica a Nivel Nacional: México *In* Verástegui J (ed.), La biotecnología en America Latina: Panorama al año 2002. CamBiotec, Ottawa.
18. **Galante Y.M. and Formatici Cristina.** 2003. Enzymes Applications in Detergency and in Manufacturing Industries. *Current Organic Chemistry* **7**:1399-1422.
19. **Garca M.B., Pessoa de Amorim M.T., and Costa Ferreira M.** 2001. Use of laccase together with redox mediators to deRemazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* **89**:123-129.
20. **Gavrilescu M and Chisti Y.** 2005. Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**:471-499.
21. **Gil P.C.** Identificación y Caracterización Bioquímica de una Peroxidasa de Rábano (*Raphanus sativus*). 2004. Cuernavaca, Mor., Mex., Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
22. **Gil P.C.** Zo Peroxidasa: Mecanismo de Reacción de una Peroxidasa Intrínsecamente Estable al Peróxido de Hidrogeno. 2006. Cuernavaca, Mor., Mex., Instituto de Biotecnología, UNAM.
23. **Hazenkamp M.F., Bachmann J.J., Dannacher J.J., and Schlingloff G.** 1999. Oxidation catalysts for dye transfer inhibition. *Tenside Surf. Det.* **36**:393-398.
24. **Hazenkamp M.F., Bachmann J.J., Dannacher J.J., and Schlingloff G.** 2001. Kinetic Aspects of Dye-Transfer Inhibition by Catalytic Oxidation. *Journal of Surfactants and Detergents* **4**:65-72.
25. **Jaeger K-E.** 2004. Protein technologies and commercial enzymes White is the hype-biocatalysts on the move. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:269-271.
26. **Kirk O., Borchet T., and Fuglsang C.** 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:345-351.
27. **Kumar C.G., Malik R.K., and Tiwari M.P.** 1998. Novel enzyme based detergents: an Indian perspective. *Current Science* **75**:1312-1318.
28. **Lehmann M., Kostrewa D., Wyss M., Brugger R., D'Arcy A., Pasamontes L., and van Loon A.P.G.M.** 2000. From DNA sequence to improved functionality> using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Engineering* **13**:49-57.

29. **Maurer K-H. and Seritler A.** 2004. Industrial Enzymes: Development of New Industrial Enzyme Applications, p. 244-257. *In* Aehle W. (ed.), Enzymes in Industry. Wiley-VCH, Germany.
30. **May S.W.** 1999. Applications of oxidoreductases. *Current Opinion in Biotechnology* **10**:370-375.
31. **Nakayama T and Amachi T.** 1999. Fungal peroxidase: its structure, function, and application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**:185-198.
32. **Nalankilli G. and Sunder A.E.** 2002. Enzyme based Eco-friendly detergents. *Man-made Textiles in India* 9-10.
33. **Oakes J.** 2003. Principles of colour loss. Part 2: Degradation of azo dyes by electron transfer, catalysis and radical routes. *Review of Progress in Coloration and Related Topics* **33**:72-84.
34. **Rogers P.L., Jeon J., and Svenson C.J.** 2005. Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. *ICHEME* **83**:499-503.
35. **Roos A., Grassin C., Herweier M., Kragh K.M., Poolsen C.H., Soe B., Sorensen J.F., and Wilms J.** 2004. Industrial Enzymes: Enzymes in Food applications, p. 101-155. *In* Aehle W. (ed.), Enzymes in Industry. Wiley -VCH, Germany.
36. **Schoevaart R., Woolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., van Rantwijk F., van der Wielen L.A.M., and Sheldon R.A.** 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Croo-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering* **87**:754-762.
37. **Sekhon B.S. and Sangha M.K.** 2004. Detergents N Zeolites and Enzymes Excel Cleaning Power. *Resonance* 35-45.
38. **Sheldon R.A., Schoevaart R., and van Langen L.M.** 2005. Croos-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation* **23**:141-147.
39. **Smulders E.** 2002. Laundry Detergents. Wiley-VCH, Germany.
40. **Soares G.M.B., Amorim M., and Costa-Ferreira M.** 2001. Use of lacasse together with redox mediators to decolorourize Remazol Brilliant Blue. *Journal of Biotechnology* **89**:123-129.
41. **Venegas M., Pedersen G., Kirk O., and Damhus T.** Dye Transfer Inhibition. *Novo Nordisk A/S. 448292[5855621].* 1999. US.
42. **Xu F.** 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology* **1**:38-50.