



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE INGENIERIA



GUÍA DE PRÁCTICAS

PERIODO ACADÉMICO: 2023-2S

VERSIÓN: 1

Página 1 de 4

CARRERA: Agroindustria	DOCENTE: MSc. Víctor Hugo Valverde	SEMESTRE: Cuarto PARALELO: A
----------------------------------	--	---

NOMBRE DE LA ASIGNATURA: Biotecnología	CÓDIGO DE LA ASIGNATURA: AGP330941	LABORATORIO A UTILIZAR: Control de Calidad
--	--	--

Práctica No.:	Tema:	Duración (horas)	No. Grupos	No. Estudiantes (por Grupo)
4	Aplicaciones enzimáticas, uso como detergentes ecológicos y sostenibles (Medidas de actividad amilasa en detergentes)	4	3	3 grupos de 3 estudiantes

Objetivos de la Práctica:

- Detectar la presencia de las enzimas en la formulación de detergentes de lavadora en polvo. Entre los componentes que se encuentran en una proporción inferior al 5% se encuentran las enzimas. En particular se va a determinar la actividad amilasa siguiendo la reacción de hidrólisis del almidón.
$$(\text{Almidón})_n + \text{Agua} + \alpha\text{-amilasa} \rightarrow (\text{Almidón})_{n-1} + \text{Maltosa}$$

Equipos, Materiales e Insumos:

Materiales:

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

Reactivos:

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

Procedimiento:

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

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

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

a) Método del DNS

El fundamento del método utilizado para medir la actividad amilasa se basa en determinar la concentración de los productos de reacción (maltosa fundamentalmente) con el tiempo. Para ello se utiliza un reactivo de color en el que los grupos reductores liberados del almidón son medidos por reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico. La reacción tiene lugar en un tubo de ensayo con la temperatura controlada a 40 °C. Los resultados son mejores si se calienta la reacción a 30-40 °C, atendiendo a que el lavado de la ropa se realiza a esas temperaturas.

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

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

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

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

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

Una vez mezclados los tubos se incuban en un baño a 90 °C durante 15 minutos y se observa la coloración que toman.

Finalmente estos tubos se miden también en el espectrofotómetro a 540 nm. El resultado de la recta de calibrado será Absorbancia vs mM. Construir esta recta de calibrado nos va a permitir relacionar los valores de absorbancia determinados con la concentración de maltosa de las muestras.

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

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

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

b) Método de medida con yodo

El fundamento del método se basa en que una disolución de yodo que con almidón produce un complejo de color azul intenso. El almidón está compuesto aproximadamente por un 25% de amilosa, y un 75% de amilopectina. La amilosa, el componente del almidón de cadena lineal, forma hélices donde se incluyen las moléculas de yodo, formando un color de azul oscuro a negro. La amilopectina, el componente del almidón de cadena ramificada, forma hélices mucho más cortas, y las moléculas de yodo son incapaces de incluirse, conduciendo a un color ámbar, entre naranja y amarillo. Al romperse o hidrolizarse el almidón en unidades más pequeñas de carbohidrato, el color azul-negro desaparece. En consecuencia, esta prueba puede determinar la hidrólisis de la amilosa por la enzima amilasa asociando la pérdida del color azul-negro con la actividad de la enzima. Se procede como en el caso anterior realizando la reacción con la temperatura controlada a 40 °C, adicionando al tubo de ensayo 1 mL de disolución de detergente y 4 mL de disolución de almidón. En el momento que se pone en contacto la disolución de detergente (que contiene la enzima) y la disolución de almidón (el sustrato de la enzima) se inicia la reacción y se considera como tiempo cero. En ese instante se anota la hora mirando el reloj, se toma 1 mL de la mezcla y se pone en contacto con 4 mL de agua y 0,2 mL de reactivo de yodo (betadine diez veces diluido). Esta operación se repite a los 15, 30 y 60 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a 590 nm frente a un blanco con agua. Este ensayo es más sencillo que el anterior pues no implica calentamiento, se usan reactivos de fácil acceso y por tanto no se es necesario pedir reactivos especiales. Aún así hay que tener la precaución de probar la práctica antes de realizarla para ajustar la cantidad de betadine diluido que se debe usar, pues algunos detergentes contienen blanqueantes oxigenados y se debe adicionar más betadine diluido. Como ensayo previo se debe preparar una disolución con 4 mL de agua y 1 mL de disolución de detergente, tomar 1 mL y añadir disolución de betadine diluida hasta que quede un color ambar claro. Al hacer la reacción con almidón en vez de con agua, tal y como se hace en el ensayo de actividad enzimática, el color azul a tiempo cero tiene que poder medirse en el espectrofotómetro (absorbancia próxima a 1,5 unidades).

Cuestionario:

Resultados:

El estudiante estará en capacidades de reconocer e interpretar las reacciones enzimáticas que tienen lugar en procesos de limpieza y degradación de sustancias.

Anexos:

Referencias bibliográficas:

- BANET, E. Innovación curricular y enseñanza de las ciencias en educación secundaria. Editorial: Murcia: Universidad de Murcia, 2000.
- GOÑI ZABALA, J.M. El Espacio Europeo de Educación Superior: competencias, tareas y evaluación, los ejes del currículum universitario. Editorial: Barcelona: Octaedro: Universitat de Barcelona, Institut de Ciències de l'Educació, 2005.

Fecha de Revisión y Aprobación: 15 de octubre de 2023

Firma Director de Carrera

Firma Docente