

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA
OBTENCIÓN DE LA PAPAÍNA CRUDA A PARTIR DEL LÁTEX
DE PAPAYA (*Carica papaya L.*)”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO

Alicia Milagros, Vite Codarlupo
Jaquelyne, Pérez Díaz

CALLAO – 2021
PERÚ



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
VI CICLO DE TESIS
JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

“AÑO DEL BICENTENARIO DEL PERÚ: 200 AÑOS DE INDEPENDENCIA”

LIBRO N° 01 FOLIO N° 61 ACTA N° 60 DE SUSTENTACIÓN DE TESIS CON CICLO DE TESIS

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO**

Siendo las **14:00** horas del día 10 de julio de 2021, de manera no presencial en forma remoto virtual - vía plataforma de internet google meet: <https://meet.google.com/skp-zvsf-ato>, se reunió el Jurado de Sustentación del VI Ciclo de Tesis para la obtención del TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO por la modalidad de Ciclo de Tesis de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, designado mediante Resolución de Consejo de Facultad N° 107-2021-CFIQ de fecha 14 de junio de 2021, integrado por:

Ing. Dr. ANCIETA DEXTRE CARLOS ALEJANDRO	PRESIDENTE
Lic. Dr. TRUJILLO PÉREZ SALVADOR APOLINAR	SECRETARIO
Ing. Mg. REYNA MENDOZA GLADIS ENITH	VOCAL

Con la finalidad de evaluar la sustentación de la tesis titulada **“DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA PAPAÍNA CRUDA A PARTIR DEL LÁTEX DE PAPAYA (*Carica papaya L.*)”**, presentado por el(la) bachiller:

Don(ña)
JAQUELYNE PEREZ DIAZ

Don(ña)
ALICIA MILAGROS VITE CODARLUPO

Acto seguido se procedió a la sustentación de la tesis en forma remoto virtual - vía plataforma de internet google meet: <https://meet.google.com/skp-zvsf-ato>, con el fin de optar el Título Profesional de Ingeniero Químico, luego de la sustentación, los miembros del Jurado de sustentación formularon las respectivas preguntas, las mismas que fueron absueltas.

Terminada la sustentación, el Jurado de Sustentación de Tesis luego de deliberar, acuerda:

APROBAR con la escala de calificación cualitativa **MUY BUENO** y calificación cuantitativa **DIECISÉIS (16)** la presente tesis titulada **“DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA PAPAÍNA CRUDA A PARTIR DEL LÁTEX DE PAPAYA (*Carica papaya L.*)”**, conforme a lo dispuesto en el REGLAMENTO DE GRADOS Y TÍTULOS de la Universidad Nacional del Callao aprobado mediante Resolución de Consejo Universitario N° 245-2018- CU de fecha 30 de octubre de 2018.

Se eleva la presente acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, a fin de que se declare **APTO** para conferir el Título Profesional de Ingeniería Química.

Se extiende la presente acta, a las **14:52** horas del mismo día.

DEDICATORIA

A Dios, porque todas las cosas proceden de él y existen por él y para él, por renovar mis fuerzas cada mañana y por seguir dándome la victoria en el trayecto de mi vida.

A mis padres Javier y Ana por los valores inculcados y dedicación, mis hermanos Cynthia, Samanda y Alonso, por su coraje valentía y apoyo incondicional, por sus consejos y no dejarme rendir para lograr alcanzar cada meta trazada en este camino llamado vida.

ALICIA MILAGROS VITE CODARLUPO

A Dios y a la Virgen María, por acompañar y bendecir mis días y la de mi familia y hacer posible todos los logros obtenidos.

A mis padres Elvia y Jorge, por darme siempre su apoyo incondicional y el empuje que necesito a diario para lograr mis metas trazadas, mis hermanos Deisi, Percy y Heiser por su apoyo y empuje siempre en cada paso que doy, y por darme el valor de seguir adelante.

JAQUELYNE, PÉREZ DÍAZ

A Estela Toledo, quien creyó y apostó por esta investigación, y nos dio los mejores consejos para seguir adelante en momentos difíciles respecto al avance del mismo.

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater, la Universidad Nacional Del Callao y a nuestra facultad de Ingeniería Química, por formarnos profesionalmente y por facilitarnos sus instalaciones, haciendo posible la culminación de nuestra investigación.

A nuestro asesor Ing. Pablo Belizario Díaz Bravo, por brindarnos su entrega, tiempo y paciencia en el desarrollo de esta investigación.

A los docentes: Dr. Néstor Marcial Alvarado Bravo, MSc. Ing. Leonardo Félix Machaca Gonzales y MSc. Ing. César Gutiérrez Cuba, por guiarnos en nuestro proceso de investigación.

A todos los involucrados en concretar esta investigación.

ÍNDICE

TABLAS DE CONTENIDO	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.1. Descripción de la realidad problemática	11
1.2. Formulación del problema.....	16
1.2.1. Problema General.....	16
1.2.2. Problemas específicos.....	16
1.3. Objetivos.....	16
1.3.1. Objetivo General	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	16
1.4. Limitantes de la investigación	16
1.4.1. Teórico	16
1.4.2. Temporal	17
1.4.3. Espacial.....	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Antecedentes.....	18
2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	18

2.1.2.	Antecedentes Nacionales.....	20
2.2.	Bases teóricas	26
2.2.1.	Papaya.....	26
2.2.2.	Producción de papaya en el Perú	26
2.2.3.	Látex.....	27
2.2.4.	Clasificación de enzimas	29
2.2.5.	La papaína	30
2.2.6.	Microencapsulación.....	38
2.2.7.	Goma arábica	40
2.2.8.	Propiedades de la goma arábica.....	41
2.2.9.	Centrifugación.....	41
2.2.10.	Secado.....	42
2.2.11.	Actividad enzimática.....	43
2.2.12.	Factores que afectan la actividad enzimática	43
2.2.13.	Medición de la actividad enzimática	45
2.3.	Conceptual	47
2.4.	Definición de términos básicos	48
III.	HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	51
3.1.	Hipótesis.....	51
3.1.1.	Hipótesis General.	51
3.1.2.	Hipótesis Específicas.....	51

3.2.	Definición conceptual de variables.....	51
3.2.1.	Operacionalización de variables.....	53
IV.	DISEÑO METODOLÓGICO	54
4.1.	Tipo y diseño de investigación.....	54
4.1.1.	Tipo de investigación.....	54
4.1.2.	Diseño de investigación.....	54
4.2.	Método de investigación.....	55
4.3.	Población y muestra.	55
4.3.1.	Población.....	55
4.3.2.	Muestra.....	55
4.4.	Lugar de estudio y periodo desarrollado.....	55
4.5.	Técnicas e instrumentos para la recolección de la información.....	55
4.5.1.	Técnicas.....	55
4.6.	Análisis y procesamiento de datos.....	56
4.6.1.	Diseño Experimental	56
4.6.2.	Procedimiento experimental.....	56
V.	RESULTADOS	68
5.1.	Resultados descriptivos.....	68
5.2.	Resultados inferenciales.....	71
5.3.	Otro tipo de resultados estadísticos de acuerdo a la naturaleza del problema y la Hipótesis.....	77

VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
6.1.	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.	78
6.2.	Contrastación de los resultados con otros estudios similares.....	79
6.3.	Responsabilidad de ética de acuerdo a los reglamentos vigentes.....	82
	CONCLUSIONES.....	83
	RECOMENDACIONES	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
	ANEXOS.....	91
	ANEXO A. Matriz de Consistencia	91
	ANEXO B. Método analítico de la unidad de tirosina (TU).....	92
	ANEXO C. Equipos de laboratorio utilizados.....	99
	ANEXO D. Evidencia fotográfica de la experimentación	103

TABLAS DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Composición del látex de papaya</i>	28
Tabla 2 <i>Propiedades Físicas de la Papaína</i>	32
Tabla 3 <i>Composición de la Papaína</i>	33
Tabla 4 <i>Usos y consumos de papaína en el mundo</i>	36
Tabla 5 <i>Operacionalización de Variables</i>	53
Tabla 6 <i>Variables y niveles para el diseño experimental</i>	61
Tabla 7 <i>Diseño experimental $2^3=8$</i>	61
Tabla 8 <i>Peso de látex obtenido por cada fruto de papaya</i>	65
Tabla 9 <i>Agentes acondicionantes agregados a la muestra</i>	65
Tabla 10 <i>Relación Peso/ Volumen (agente encapsulante/muestra)</i>	66
Tabla 11 <i>Distribución y medida de variables</i>	67
Tabla 12 <i>Lectura de absorbancias</i>	68
Tabla 13 <i>Curva de Tirosina (Curva Patrón)</i>	69
Tabla 14 <i>Actividad proteolítica</i>	70
Tabla 15 <i>Coeficientes codificados</i>	71
Tabla 16 <i>Resumen de modelo</i>	71
Tabla 17 <i>Análisis de varianza</i>	72
Tabla 18 <i>Estructura de alias</i>	73
Tabla 19 <i>Contrastación de resultados con trabajos anteriores</i>	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Caracterización del Problema</i>	12
Figura 2 <i>Propuesta Técnica: Diagrama de Proceso</i>	14
Figura 3 <i>Látex Exudado de Papaya</i>	28
Figura 4 <i>Estructura tridimensional de la papaína</i>	31
Figura 5 <i>Estructura de papaína refinada a 1,65 A de resolución</i>	35
Figura 6 <i>Partes de una micro cápsula</i>	39
Figura 7 <i>Estructura general de una Microcápsula</i>	39
Figura 8 <i>Lavado, desinfección del fruto y extracción del látex</i>	57
Figura 9 <i>Acondicionamiento</i>	58
Figura 10 <i>Centrifugación</i>	59
Figura 11 <i>Diseño factorial</i>	62
Figura 12 <i>Diseño experimental</i>	64
Figura 13 <i>Curva de Tirosina (Curva Patrón)</i>	69
Figura 14 <i>Gráfica normal de efectos estandarizados</i>	73
Figura 15 <i>Diagrama de Pareto de efectos estandarizados</i>	74
Figura 16 <i>Gráfico de contorno 1</i>	74
Figura 17 <i>Gráfico de contorno 2</i>	75
Figura 18 <i>Gráfico de contorno 3</i>	75
Figura 19 <i>Gráfico de contorno 4</i>	76
Figura 20 <i>Gráfico de contorno 5</i>	76
Figura 21 <i>Gráfico de contorno 6</i>	77
Figura 22 <i>Equipo de centrifugación JANETZKI T25</i>	99
Figura 23 <i>Estufa marca MEMMER UF260</i>	99

Figura 24 <i>Baño termostático marca LAUDA AQUALINE AL 25</i>	100
Figura 25 <i>Balanza analítica de precisión marca SARTORIUS</i>	100
Figura 26 <i>Agitador magnético auto mixer, marca FISHERSCIENTIFIC</i>	101
Figura 27 <i>Potenciómetro, marca ORION</i>	101
Figura 28 <i>Espectrofotómetro UV, marca ORIÓN AQUAMATE 8000</i>	102
Figura 29 <i>Lavado de materia prima</i>	103
Figura 30 <i>Exudado y recolección de látex</i>	103
Figura 31 <i>Solución de látex acondicionada</i>	104
Figura 32 <i>Muestras acondicionadas con agente micro encapsulante</i>	104
Figura 33 <i>Centrifugación de muestras</i>	104
Figura 34 <i>Muestras listas para ingresar a la estufa en la etapa de secado</i>	104
Figura 35 <i>Muestras para lecturas de absorbancia</i>	104

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar las variables óptimas del proceso para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya, es decir, la concentración adecuada de agente micro encapsulante, el tiempo preciso de centrifugación y el tiempo óptimo de secado para obtener papaína cruda con alta actividad proteolítica.

En la investigación se trabajó con frutos verdes de papaya de la variedad criolla, de la cual se extrajeron cantidades significativas de látex en placas Petri y para su adecuada conservación se agregaron: citrato de sodio, bisulfito de sodio, benzoato de sodio y EDTA, que actúan como amortiguadores de pH, agente antimicrobiano y antioxidante, preservante y agente quelante, respectivamente, manteniendo la muestra a una temperatura de 4°C. Una vez acondicionado el látex, se sometió a micro encapsulación seguido de centrifugación y secado. Se utilizaron concentraciones de 10/90 y 30/70 w/v de agente micro encapsulante/látex, con tiempos de centrifugado de 50 y 70 min, y el secado a 60°C durante 3 y 4 horas para cada muestra. Para medir la efectividad de la actividad proteolítica de la papaína se utilizó el método analítico de la unidad de tirosina (TU). Los resultados muestran que las variables óptimas de operación con mayor actividad proteolítica de 868.36 TU/mg fueron: concentración de 10/90 w/v de agente encapsulante, tiempo de centrifugación de 50 minutos, y con 4 horas de secado. Esto significa que hidrolizó mayor concentración de cisteína en Tirosina, por tanto, la obtención de papaína es la de mejor calidad.

Palabras claves: Látex, papaína, micro encapsulación, actividad proteolítica.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to determine the optimal variables of the process to obtain papain from papaya latex, that is, the appropriate concentration of micro encapsulating agent, the precise centrifugation time and the optimal drying time to obtain raw papain with high proteolytic activity.

The research worked with green papaya fruits of the Creole variety, from which significant amounts of latex were extracted in Petri dishes and for their proper conservation were added: sodium citrate, sodium bisulfite, sodium benzoate and EDTA, which act as pH buffers, antimicrobial and antioxidant agent, preservative and chelating agent, respectively, keeping the sample at a temperature of 4 ° C. Once the latex was conditioned, it was subjected to micro encapsulation followed by centrifugation and drying. Concentrations of 10/90 and 30/70 w / v of micro encapsulating agent/latex were used, with centrifugation times of 50 and 70 min, and drying at 60 ° C for 3 and 4 hours for each sample. To measure the effectiveness of the proteolytic activity of papain, the analytical method of the tyrosine unit (TU) was used. The results show that the optimal operating variables with the highest proteolytic activity of 868.36 TU / mg were: concentration of 10/90 w / v of encapsulating agent, centrifugation time of 50 minutes, and with 4 hours of drying. This means that it hydrolyzed a higher concentration of cysteine in Tyrosine, therefore, obtaining papain is the best quality.

Keywords: Latex, papain, micro encapsulation, proteolytic activity

INTRODUCCIÓN

La Papaína es una enzima proteolítica que se encuentra en el látex de la papaya (El látex se encuentra en mayor proporción en el fruto y en menor proporción en las hojas y el tallo); esta enzima tiene el poder de digerir proteínas o los elementos proteicos como la carne, clara de huevo, leche, etc. Su acción es semejante a las dos enzimas del jugo gástrico del hombre: pepsina y tripsina, y es por ello que posee una gran cantidad de aplicaciones en la industria tales como: cervecera, cárnica, farmacéutica, láctea, panificación, laboratorios bacteriológicos, industria del papel, etc. (García, 2005, p. 12).

La extracción de enzimas a nivel industrial, es poco explorada, generalmente no existen empresas dedicadas a esta actividad, por el poco avance tecnológico, limitado interés y bajo conocimiento de tecnologías. Debido a ello, desde el punto de vista de la Ingeniería existen alternativas para uso de la papaya verde como materia prima para la obtención de diversos derivados como es el producto de enzima denominado papaína.

Para esta investigación se trabajó seleccionando frutos verdes de papaya de la variedad criolla, se realizó la extracción del látex con los instrumentos adecuados para evitar contaminar las muestras, seguidamente se acondicionó las mismas y se procedió a determinar las variables óptimas (tiempo de centrifugación del látex, concentración de agente encapsulante y tiempo de secado en estufa) para la obtención de la papaína cruda. La medición de la efectividad de la actividad proteolítica se realizó mediante el método analítico de la unidad de tirosina (TU).

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

En el Perú existe gran producción de papaya (*Carica papaya* L.) perteneciente a la familia de las caricáceas, el cual es uno de los cultivos con mayor tradición a nivel nacional con importante demanda comercial, por lo que favorece el desarrollo del sector agrario, pero para la producción nacional presenta retos importantes en cuanto al aprovechamiento completo de las propiedades que sus cultivos puedan tener ya que gran parte de la producción se encuentra destinada para su consumo de forma directa por sus características organolépticas o por sus propiedades funcionales ya conocidas.

En nuestro país la disponibilidad de papayas es abundante, existen diversas regiones como Huánuco, Amazonas, Ucayali, donde las condiciones climatológicas favorecen el cultivo de la papaya. La necesidad de recolección del látex propicia la demanda de mano de obra, lo que crea más fuentes de trabajo para la población (Quino et al., 2008, p. 206).

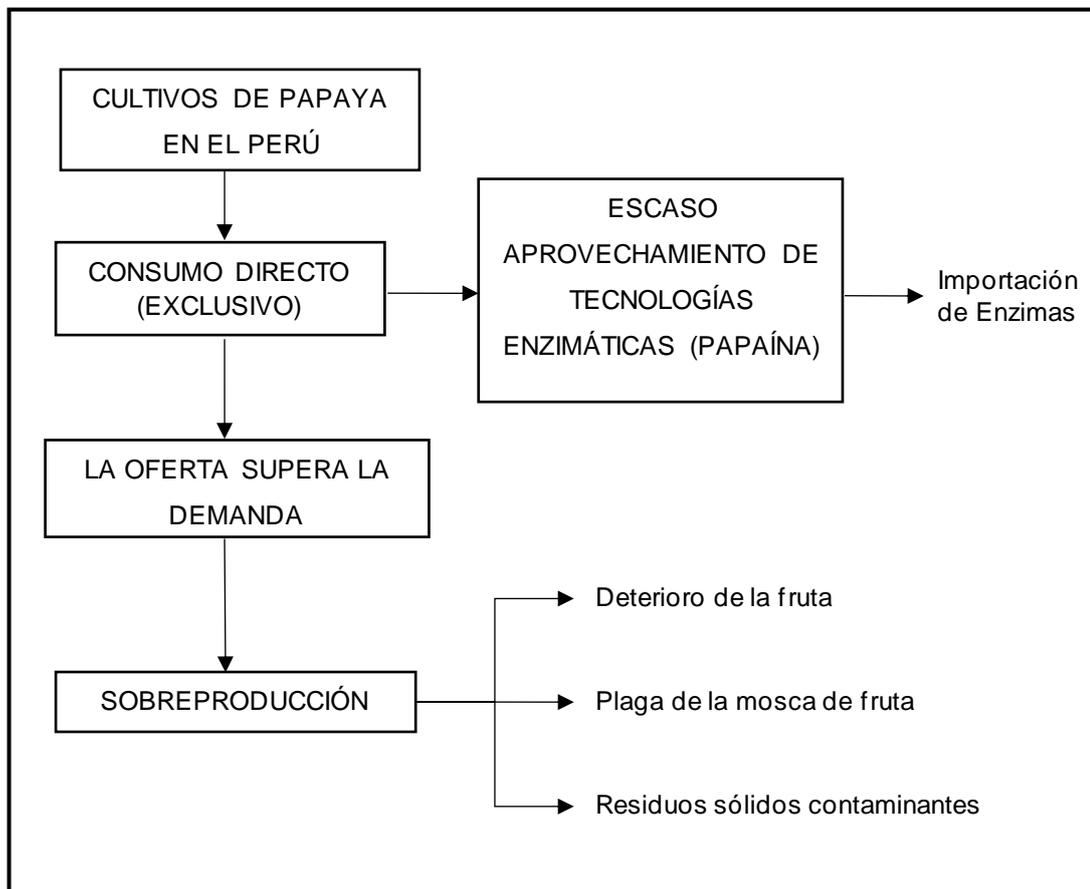
Por otro lado, la extracción de enzimas a nivel industrial, es poco explorada, pues en su gran mayoría no existen empresas dedicadas a esta actividad, por el poco avance tecnológico, limitado interés y bajo conocimiento de tecnologías en la aplicación de extracción de enzimas naturales como la papaína a partir del látex de papaya verde, tanto de empresa como agricultor.

Por ende cabe indicar que debido a su estacionalidad en los meses de cosecha (Enero - Mayo y de Octubre - Diciembre), y que mayormente se

deriva a consumo directo, la oferta rebasa la demanda generando sobreproducción trayendo como consecuencia el deterioro de la fruta, acarreando plagas como la mosca de la fruta, residuos sólidos contaminantes (contaminación ambiental), trayendo así inconvenientes para el campo, que las industria que requiere el uso de enzimas, importen dicha materia prima, tal como se indica en la figura 1.

Figura 1

Caracterización del Problema



De no adoptarse medidas correctivas es decir mantener la situación actual, la sobreproducción no se controlaría, generando plaga de mosca de la fruta,

residuos sólidos contaminantes, lo cual provocaría diversas enfermedades; y por otro lado la industria peruana importaría más papaína.

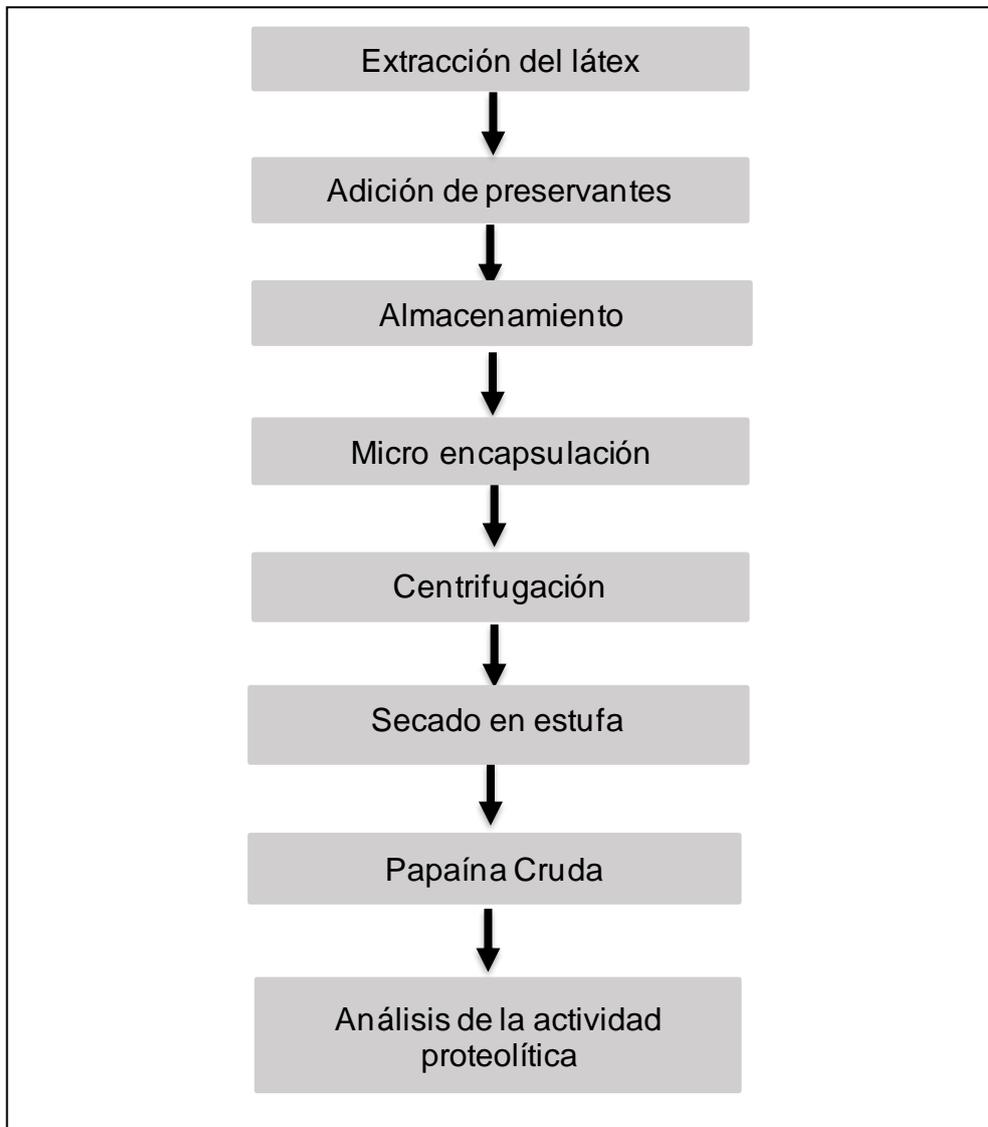
Desde el punto de vista de la ingeniería existen alternativas para uso de la papaya verde como materia prima para la obtención de la enzima denominada papaína. Si bien en el Perú no se produce dicha enzima, sin embargo, la información bibliográfica revisada indica que es posible la producción de papaína a partir del látex de papaya con múltiples aplicaciones y en algunos países sirve como insumo de enzima en:

- ✓ Ablandamiento de carnes
- ✓ Clarificación de la cerveza
- ✓ Productos farmacéuticos

En el presente trabajo de investigación el propósito fue determinar las condiciones de operación para la obtención de la papaína a partir de la materia prima nacional cuyos contenidos y propiedades fisicoquímicas no difieren necesariamente al de otros países. Por tanto, las condiciones de operación son diferentes de las condiciones obtenidas en otros espacios, de esta manera el proyecto es original en la medida que no es una réplica de trabajos ya realizados. El proceso para la obtención de la papaína se ilustra en la figura 2.

Figura 2

Propuesta Técnica: Diagrama de Proceso



Como se aprecia el insumo principal es el látex proveniente del fruto de la papaya verde por lo que se va caracterizar dicho insumo en diferentes etapas:

- ✓ Extracción del látex
- ✓ Adición de preservantes
- ✓ Almacenamiento
- ✓ Microencapsulación
- ✓ Centrifugado
- ✓ Secado
- ✓ Papaína cruda
- ✓ Análisis de la actividad proteolítica

Que permite obtener las condiciones adecuadas para obtener papaína cruda que actúa como enzima para diversos usos.

Por lo tanto, para el presente proyecto la variable independiente corresponde a la determinación de las condiciones adecuadas de la obtención de la papaína a partir del látex de papaya (tiempo de centrifugación y concentración del agente micro encapsulante), y la variable dependiente es el producto, la papaína.

Los componentes principales de las condiciones adecuadas de operación son las siguientes:

- ✓ Definir las condiciones de extracción del látex.
- ✓ Definir las condiciones de operación (tiempo de centrifugación y concentración agente encapsulante)
- ✓ Caracterizar el producto (papaína).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema General

¿Cuáles son las variables óptimas para la obtención de papaína a partir del látex de papaya?

1.2.2. Problemas específicos

¿Cuál es el tiempo de centrifugado óptimo para el látex de papaya?

¿Cuál es la concentración del agente encapsulante óptimo para la obtención de la papaína?

¿Cuál sería el tiempo de secado adecuado para la obtención de papaína cruda?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Determinar las variables óptimas del proceso para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el tiempo de centrifugado óptimo para el látex de papaya.
- Determinar la concentración del agente encapsulante óptimo para la obtención de papaína.
- Determinar el tiempo de secado adecuado para la obtención de papaína cruda.

1.4. Limitantes de la investigación

1.4.1. Teórico

Es un tema novedoso, poco explorado industrialmente y brinda una gran cantidad de conocimientos científicos, los cuales son fáciles de comprender y desarrollar, es absolutamente factible puesto que existe el material

bibliográfico necesario que es una guía para la experimentación y análisis de los resultados, por lo que no es limitante para la investigación realizada.

1.4.2. Temporal

La investigación se dio inicio en el año 2019 y se ha ido retroalimentando durante este período, ha representado un reto realizar la investigación en condiciones adversas, sin embargo, se han ido superando.

1.4.3. Espacial

El trabajo de investigación se realizó con éxito a nivel laboratorio, utilizando la papaya verde de producción nacional como materia prima para la obtención de la papaína. La investigación es tecnológica porque se puede escalar la producción a nivel industrial.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes Internacionales

Kure y Yugcha (2012). En la tesis “Estudio del proceso de secado del látex de papaya, deshidratado por aspersion”. Estudiaron el deshidratado del látex de papaya, midiendo temperaturas óptimas, con la finalidad de obtener papaína cruda con elevada actividad proteolítica, para la cual usaron el proceso de secado por aspersion, teniendo en cuenta la influencia de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la enzima. Para facilitar la etapa del secado los autores realizaron un encapsulado con una solución de goma arábica a una temperatura de 120 °C los cuales dieron como resultado una elevada actividad proteolítica.

Arana y Quijano (2012). En la tesis, “Extracción, caracterización y comparación del látex obtenido en secado por aspersion, de tres variedades de papaya”, cuyo objetivo fue comparar la papaína cruda obtenida en diferentes variedades de papaya cultivadas en el Ecuador, con el fin de proponer la mejor materia prima para su extracción a nivel comercial, usaron el método de caracterización y determinación de rendimiento de látex obtenido de las variedades de papaya. En la investigación encontraron diferencias significativas en el rendimiento del látex en cuanto a variedad de papaya, siendo el látex de la variedad Criolla el de mayor rendimiento, mientras que la variedad de Golden presentó

valores muy bajos, resultados que permitió a los investigadores determinar con qué variedad de papaya trabajar.

García y Roldán (2005). En la tesis, “Ensayo de actividad de la enzima papaína inmovilizada y su aplicación en aguas residuales en la industria alimenticia”, estudiaron la elaboración de ensayos en la cual inmovilizaron la papaína utilizando como soporte agar, permitiendo que la mezcla sea gelatinosa e insoluble en agua, utilizándose luego en la aplicación de aguas residuales; para lo cual realizaron mediciones de la actividad proteolítica tanto de la enzima inmovilizada como la enzima libre, mediante el método modificado de Kunitz, en dicho ensayo determinaron que el inmovilizado, es una técnica que permitió aumentar la estabilidad de la enzima, permitiendo una fácil recuperación de la enzima y así ser reutilizada, lo cual permitió una distribución uniforme en el reactor.

Villavicencio (2011). En su tesis “Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya (carica papaya)”, el autor plasmó el estudio de la extracción de la enzima papaína, tomando en cuenta, parámetros de grado de maduración de la fruta, temperatura de secado, parámetros que son necesarios para obtener papaína con mayor grado de actividad enzimática; para lograr resultados probó el efecto de 3 grados de maduración de la papaya: verde, pintona y madura, y la evaluación de la actividad enzimática, lo efectuó mediante determinaciones de viscosidad del látex obtenido. Finalmente, los análisis

estadísticos demostraron que la muestra extraída de papaya verde, fue la más óptima.

Garzón et al. (2012). En el artículo, “Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (*Carica papaya* L), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina”, los autores relataron la extracción de la papaína mediante microondas, dicho método es realizado con la finalidad de mejorar la eficiencia de la enzima, para su posterior uso en el ablandamiento de la carne bovina; verificando su efectividad mediante el análisis de perfil de textura (TPA) a distintos tiempos.

2.1.2. Antecedentes Nacionales

Cuchupoma y Orozco (2020). En la tesis, “Efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualaongo (*Vasconcellea pubescences*)”, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualaongo (*Vasconcellea pubescences*), la metodología se encontró orientado al proceso de extracción de papaína empleando solvente etanol a diferentes concentraciones (76°GL, 86°GL y 96°GL) , para luego deshidratar y triturar el extracto, los valores que obtuvieron fueron evaluados estadísticamente (rendimiento), obteniendo como resultado que la concentración de etanol con 96°GL presentó el mayor rendimiento 6,29%; además lograron caracterizar el concentrado enzimático, del cual a

partir de los siguientes resultados lograron concluir : 6,82% de humedad y 93,18% de materia seca lo que les indicó que es posible emplear al etanol como solvente para la extracción de papaína del gualacongo.

Rodríguez (2019). En su tesis, “Inmovilización enzimática de Papaína en soporte esferular de quitosano y determinación comparativa de su actividad enzimática sobre la caseína”, estudió comparativamente la actividad enzimática en soportes semisólidos de quitosano, respecto de la actividad enzimática en sistemas en solución, el cual desarrolló una metodología de preparación de esférulas de quitosano en las que inmovilizó la enzima papaína, teniendo como conclusión que aun cuando las concentraciones de papaína inmovilizada son menores respecto de las concentraciones en solución, la actividad enzimática inmovilizada es menor en 10 PU/mg.

Altamirano (2019). En su tesis, “Efecto in vitro del gel de papaína e hipoclorito de sodio sobre la fuerza de adhesión de brackets metálicos cementados en esmalte dental humano”, comparó el efecto in vitro del gel de papaína e hipoclorito de sodio al 5% sobre la fuerza de adhesión de brackets metálicos cementados en esmalte dental humano, en dicho estudio la autora acondicionó 3 muestras, muestra A sin ningún acondicionamiento, muestra B pre-acondicionado con hipoclorito de sodio al 5% , muestra C preacondicionado con gel de papaína Brix 3000 , para medir los resultados utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y luego el test de Duncan, éstas pruebas dieron como resultado que el gel de

papaína Brix 3000 aumentó en mayor medida la fuerza de adhesión que el hipoclorito de sodio al 5%.

García (2019). En la tesis, “Evaluación del contenido de papaína, determinación del sexo y metodología para la propagación in vitro de tres especies de Carica”, tuvo como objetivo determinar la cantidad de papaína usando la técnica de micropropagación in vitro de carica papaya, carica pubescens, carica pentágona y contenido de fenoles totales en plantas de carica papaya como indicador del sexo, como parte del proceso el látex fue extraído a partir de 12 frutos inmaduros de cada una de las especies en estudio, García obtuvo papaína cruda y papaína pura. Como resultado obtuvo 16,50 g de papaína pura de carica papaya; 13,40 y 8,90 para carica pubescens y carica pentágona, respectivamente; si bien difieren cuantitativamente en el contenido de este metabolito secundario, ambas son buenas portadoras.

Chauca (2018). En su tesis, “Mejoramiento de la textura de la carne de vacuno con el uso de la enzima proteolítica (Papaína)”, tuvo como objetivo demostrar si existen diferencias significativas respecto al factor de calidad, esto es dureza de la carne de vacuno en el corte asado de pejerrey; para cumplir con el objetivo elaboró un sazonador-ablandador en base a papaína el cual es aplicado espolvoreado al corte asado de pejerrey y manteniendo en reposo por 30 minutos para posteriormente someterlo a cocción, así mismo preparó otra muestra de carne con el mismo corte y el

mismo procedimiento pero sin el sazónador preparado; el resultado fue medido por la percepción sensorial de un determinado número de personas de Lima Metropolitana, en la que arrojó un valor de significancia del 5% en cuanto a dureza de la carne donde la carne sazonada con papaína presentó mejores resultados y aceptabilidad de los consumidores.

Chávez (2018), En su tesis, "Efecto del látex de papaya a diferentes concentraciones en el reblandecimiento del cálculo supragingival de pacientes de la consulta privada. Arequipa, 2016", determinó el efecto del látex de papaya sobre el cálculo supragingival o tártaro dental, extrajo el látex de papaya de frutos verdes entre 1 a 3 meses de edad, esto lo llevó a diluir a diferentes concentraciones 2%, 4%, 6%, 8%, además una concentración de látex puro, lo cual lo distribuyó en cinco grupos de 15 muestras cada uno, el tamaño de los grupos fue determinado mediante fórmula específica para el tipo de estudio, para los cuales agregó 0,08 g de tártaro dental. Los resultados determinaron que el látex de papaya al 2% produjo un promedio de reblandecimiento parcial de los cálculos a los 9':59'' y un reblandecimiento total de los mismos a los 19':06''; el látex de papaya al 4% un promedio de reblandecimiento parcial a los 5':19'' y un reblandecimiento total a los 9':73''. El látex de papaya al 6% un promedio de reblandecimiento parcial a los 3':23'' y un reblandecimiento total a los 7':10. El látex de papaya al 8% un promedio de reblandecimiento parcial a los 2':52'' y un reblandecimiento total a los 6':99''. El efecto del látex puro

de papaya un promedio de reblandecimiento parcial a los 7':77'' y un reblandecimiento total a los 15':81''.

Pintado y Salvatierra (2017). En la tesis, "Efecto de la concentración de la papaína sobre la dureza de la carne de alpaca (vicugna pacos)", evaluaron el efecto de la concentración de la papaína sobre la dureza de la carne de alpaca (vicugna pacos), para tal estudio utilizaron dos métodos, inmersión e inyección, a temperaturas de 23°, 35° y 40°, utilizando como instrumento un penetrómetro; los autores utilizaron distintas muestras de carne y papaína a diferentes concentraciones (0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%) para los resultados analizaron la varianza simple para la fuerza de penetración y comparan los valores medios de la fuerza de penetración para las diferentes concentraciones aplicadas de papaína teniendo como resultado que el mejor método fue el de inyección a una concentración de 0.2% a una temperatura de 35°C con una fuerza de penetración de 0.464kg.m/s².

Herrera y Ruiz (2014). En la tesis, "Efecto del tiempo de congelación y temperatura de liofilizado de látex del fruto papayita de monte (Carica Pubescens) sobre su actividad proteolítica en leche de vaca", emplearon un experimento factorial del tipo 3A x 3B bajo un DCA con dos repeticiones para determinar la mayor cantidad de UTP (Unidades tríplicas de Papaína), las cuales efectuaron el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple TUKEY al 95% de confianza, donde la mayor cantidad de UTP (0.0149 UTP/g muestra-min) del látex del fruto papayita

de monte que obtuvieron empleando una temperatura de liofilizado a 55°C y 12 h de tiempo de congelado con éstas condiciones, el tiempo de secado fue en 3h 40 minutos.

Porras (2012). En su tesis “Microencapsulación de pulpa de carambola (*Averrhoa carambola* L.) mediante secado por liofilización”, presentó como objetivo caracterizar la materia prima utilizada para la obtención de un producto liofilizado en polvo, estudió el efecto de la temperatura de congelación en las variables de calidad de un polvo de carambola, el cual logró micro encapsular la pulpa de carambola mediante secado por liofilización y medir la efectividad de dos agentes micro encapsulantes (goma arábica y maltodextrina), obteniendo como resultado que la goma arábica y la maltodextrina disminuyó la higroscopicidad de los productos, también evitó el oscurecimiento de las microcápsulas durante el almacenamiento, la menor variación total de color corresponde a las microcápsulas con goma arábica 21,00 unidades.

Quino et al. (2008). En el artículo de investigación, “Diseño para un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada”, la metodología les permitió describir el diseño de un proceso tecnológico para la obtención de papaína refinada y purificada a partir del látex fresco del fruto verde de carga papaya. En la que el látex fresco del fruto es re-suspendida en buffer con agentes protectores de la actividad de la enzima, cuya concentración y condiciones de aplicación fueron halladas de manera experimental, el

extracto fue centrifugado para separar materia insoluble y la solución clarificada fue sometida a precipitación con sulfato de amonio para obtener enzima insoluble. En el estudio concluyen que el proceso permitió recuperar el 80% de la proteína y el 65% de la actividad original y que el producto obtenido fue un polvo blanco refinado y muy soluble en agua.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Papaya

La papaya pertenece a la familia de las Caricáceas y al género y especie *Carica papaya* L. Es una planta herbácea originaria de América Central, que se ha introducido en todos los países de clima cálido del mundo. Puede permanecer en producción durante muchos años, aunque en la práctica no se mantiene más de tres o cuatro años. Es muy cultivada por su fruto comestible y por ser fuente de un producto industrial como lo es la papaína, enzima que se encuentra en su látex (Kure y Yugcha, 2012, p.3).

2.2.2. Producción de papaya en el Perú

Según la revista Agencia Agraria de Noticias, el 100% de la producción se destinará al mercado interno, siendo Lima el principal destino, con el 60% del total (Agraria.pe). Este año (2015), la producción nacional de papaya ascendería a 480 mil toneladas (12 mil hectáreas (Ha) cuyo rendimiento promedio es de 40 toneladas por Ha), informó el especialista en frutales y consultor agrario, Ing. William Daga Ávalos; Detalló que del total de hectáreas que existen en Perú, el 80% de los cultivos se ubican en Ucayali

(Aguaytía y Pucallpa), mientras que el resto están instalados en Cusco y la sierra de Ayacucho, asimismo, dijo que el 100% de la producción se destinará al mercado interno, siendo Lima el principal destino, con el 60% del total, además señaló que la principal variedad de papaya cultivada en nuestro país es la denominada “criolla”(León, 2015, p.1).

2.2.3. Látex

El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene en suspensión o en solución, una mezcla compleja de componentes. Los botánicos designan el látex como el citoplasma de los laticíferos (las células vivas especializadas que lo contienen) por lo tanto, éste presenta una variedad de organelas celulares, como núcleos, mitocondrias, ribosomas, plastidios, vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático y moléculas orgánicas como enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres. Los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, por lo cual, una incisión sobre éstos, resulta en una rápida emisión del látex hacia el exterior, tal como muestra la figura 3 (Arana y Quíjano, 2012, pp.20-21).

Figura 3

Látex Exudado de Papaya



Fuente: Arana y Quijano (2012)

Según Mejía y Vega (2010), el látex de la papaya contiene una mezcla de enzimas: Quimiopapaína, Papaína y Lisozima en las composiciones que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Composición del látex de papaya

ENZIMA PRESENTE EN EL LÁTEX	CONCENTRACIÓN
Papaína	10%
Quimiopapaína	45%
Lisozima	20%

Fuente: Mejía y Vega (2010)

2.2.4. Clasificación de enzimas

En 1956, la IUBMB (International Union of Biochemistry) brindó recomendaciones sobre la denominación y clasificación de enzimas. Esto consiste en nombrar e identificar la enzima sistemáticamente con un número EC; este código es una descripción de cuatro niveles que se utiliza para clasificar las enzimas en función de la transformación química general de los sustratos en productos. El primer nivel corresponde a seis clases diferentes según el tipo de reacción química que se efectúe, estas son:

- a. **EC 1 Oxidorreductasas**, que catalizan reacciones en las que el sustrato dona uno o más electrones a un aceptor de electrones, oxidándose en el proceso.
- b. **EC 2 Transferasas**, catalizan las reacciones en las que un grupo químico se transfiere de un sustrato donante hacia un sustrato aceptor.
- c. **EC 3 Hidrolasas**, catalizan reacciones en las que un enlace en un sustrato se hidroliza para producir dos fragmentos.
- d. **EC 4 Liasas**, catalizan reacciones no hidrolíticas en las que se elimina un grupo químico de un sustrato que deja un enlace.
- e. **EC 5 Isomerasas**, catalizan reacciones de un producto de un solo sustrato que pueden considerarse como reacciones de isomerización.
- f. **EC 6 Ligasas**, que permiten catalizar la unión de dos o más moléculas acopladas a la hidrólisis de ATP o una molécula análoga.

Estas enzimas también se denominan sintetetasas, un nombre que ya estaba en uso antes de la creación de la Comisión de Enzimas (EC). Estas clases EC se dividen en subclases y sub-subclases (segundo y tercer nivel, respectivamente) de acuerdo con una variedad de criterios, como el enlace químico formado, el centro de reacción, el grupo químico transferido y el cofactor utilizado para la catálisis. El nivel final de clasificación define la especificidad sobre el sustrato. Por ejemplo, la papaína es una hidrolasa (EC 3), en particular una peptidasa (EC 3.4) que actúa sobre el aminoácido (EC 3.4.22) cisteína (EC 3.4.22.2) (Rodríguez, 2019).

2.2.5. La papaína

La papaína es una proteasa sulfhídrica (tiol proteasa) que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos donde los residuos de aminoácidos aromáticos del grupo carbonil son: arginina, lisina o glutamina. Es análoga en funciones a la pepsina la cual es una enzima que se encuentra en el estómago humano y descompone las proteínas (Kimmel y Smith, 1954).

Es una enzima proteolítica que se encuentra en el látex de la papaya, la cual tiene el poder de digerir los elementos proteicos y es por ello que posee una gran cantidad de aplicaciones en la industria. La papaína está clasificada como una enzima hidrolasa y proteasa tiólica y existe como un monómero consistente de 212 aminoácidos, en donde están presentes todos los aminoácidos comunes excepto la metionina (Mejía y Vega, 2010).

La papaína degrada o hidroliza las proteínas hasta aminoácidos. Su actividad enzimática óptima a pH 5-8 se ha estudiado sobre diversos sustratos, siendo de los más accesibles experimentalmente los relacionados con la caseína 37. Además, es una enzima termoestable, ya que las proteínas presentes en el látex seco protegen la papaína de la desnaturalización por el calor (Rodríguez, 2019, p. 22), en la figura 4 se muestra la estructura de la papaína.

Figura 4

Estructura tridimensional de la papaína



Fuente: Cuchupoma y Orozco (2020)

a. Propiedades de la papaína

Es un polvo blanco o blanco-grisáceo, tiene un olor ácido pungente y algo agresivo, es ligeramente higroscópico moderadamente soluble en agua y glicerol y prácticamente insoluble en la mayoría

de los solventes orgánicos; su temperatura óptima es de 65°C y su rango de pH óptimo está entre 5-7. Tiene un punto isoeléctrico de 9.6 (Kimmel y Smith 1954), en la tabla 2 se muestra las propiedades físicas de la papaína.

Tabla 2

Propiedades Físicas de la Papaína

Propiedad	Valor
Punto Isoeléctrico	pH 8.75
Constante de sedimentación	2.42+0.04 seg.
Constante de difusión	10.27+0.13x10 ⁷ cm ² seg ⁻¹
Peso Molecular	23,350 Daltons
Coefficiente de Extinción	25.0
Rotación Óptica (pH 5.7, 25°C)	-66.7

Fuente: Mejía y Vega (2010)

b. Composición de la papaína

La papaína existe como un monómero consistente de 212 aminoácidos, es una proteína simple conteniendo solamente aminoácidos y desprovista de carbohidratos. Todos los aminoácidos usuales están presentes excepto de la metionina (Mejía y Vega, 2010), tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3*Composición de la Papaína.*

Aminoácido	% de Proteína
Ácido Aspártico	11.32
Treonina	3.89
Serina	5.91
Ácido Glutámico	12.43
Prolina	5.11
Glicina	8.60
Alanina	6.08
Valina	8.43
Isoleucina	6.05
Leucina	6.10
Tirosina	14.71
Fenilamina	3.16
Histidina	0.85
Lisina	5.67
Arginina	7.75
Triptófano	4.68

Fuente: Mejía y Vega (2010)

c. Tipos de papaína

Papaína cruda. - Es aquella papaína que ha sido obtenida luego de pasar proceso de acondicionamiento, secado y caracterización, la cual está constituida por una mezcla de enzimas proteolíticas, papaína propiamente dicha, quimopapaína y en menor proporción papaya proteinasa (Quino et al., 2008).

La papaína cruda es exportada de distintos países a Estados Unidos, en donde es sometida a procesos de purificación con la finalidad de aumentar su actividad, remover impurezas, estandarizada y aplicada a procesos industriales, el látex (papaína cruda) es cotizado con un valor promedio aproximado de US\$35/kg, mientras que la papaína purificada puede llegar a costar US\$160/100 g o más para las preparaciones muy purificadas (Quino et al., 2008).

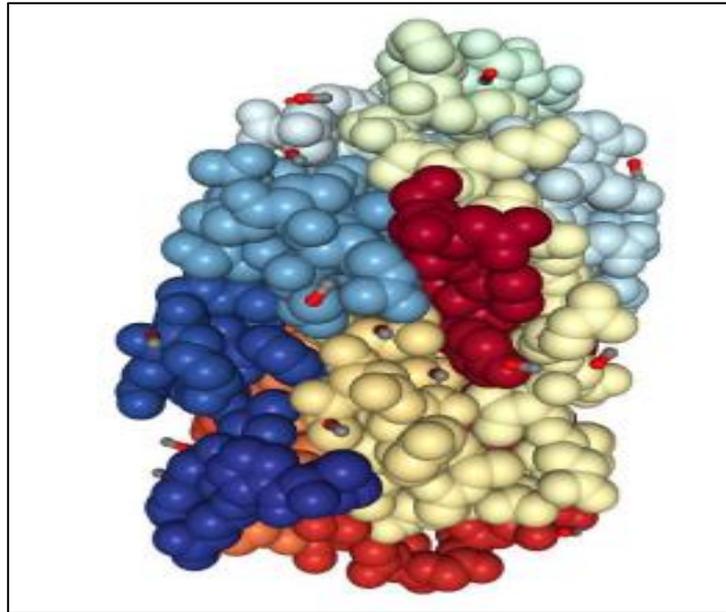
Papaína refinada. - Este producto es biológicamente estable y completamente libre de materia extraña, y tiene una actividad proteolítica más alta que las anteriores (800-1000 unidades tirosina/mg y más).

Generalmente es obtenida a través de un proceso de secado por aspersion al vacío (método de Boudart); a grandes rasgos la secuencia de operaciones que sigue este látex es: homogeneización, clarificación, filtración sobre placas clarificantes, concentración, filtración esterilizante y atomización. La relación de látex fresco a papaína que se vende refinada es de 6:1 o 7:1. Es la papaína más purificada que se vende actualmente en el mercado

internacional (Mejía y Vega, 2010), en la figura 5 se puede apreciar la estructura de la papaína refinada.

Figura 5

Estructura de papaína refinada a 1,65 Å de resolución



Fuente: Rodríguez (2019)

d. Usos de la papaína

La industria de la papaína se encuentra en la etapa de crecimiento rápido ya que se le están encontrando nuevos usos cada día, los cuales amplían el mercado que este producto posee, aunque no existen datos de la tasa de crecimiento del mercado, podemos decir que principalmente en el área alimenticia es donde se han producido los mayores aumentos de la demanda de papaína, tal como se muestra en la tabla 4. No podemos dejar el lado del área

farmacéutica, que es donde se le ha encontrado los nuevos usos que está aumentando el tamaño de mercado (Fernández, 2005).

Tabla 4

Usos y consumos de papaína en el mundo

LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	USOS	CONSUMO (TON)
Europa	Clarificador de cerveza	120
	Industria de punta	20
	Otros usos	20
USA	Clarificador de cerveza	180
	Ablandador de carnes	160
	Industria de punta	30
	Otros usos	30
Japón	Clarificador de cerveza	80
	Industria de punta	40
	Otros usos	20
Latinoamérica y otros países	Clarificador de cerveza	100
	Ablandador de carnes	100
	Otros usos	20

Fuente: Fernández (2005)

Fernández (2005), describió que los distintos tipos de mercados son los siguientes:

Bebidas alcohólicas: Las bebidas alcohólicas generalmente son enfriadas antes de su uso, esto tiende a tener el aspecto turbio debido a la formación de fenoles proteicos-polihídricos complejos

durante la elaboración de la cerveza y el enfriamiento. La dificultad es superada debido al empleo de papaína, que degrada estos complejos a pequeñas partículas que son demasiado pequeñas para enturbiar la cerveza. En USA el 80% de las cervezas son hechas con propiedades anticongelantes a través del uso de papaína.

Industria de la carne: La papaína se usa para tenderizar la carne en diferentes procesos.

Industria Fotográfica: La papaína se usa en preparativos para la recuperación de plata de películas gastadas en laboratorios de tratamiento fotográficos.

Industria Láctea: Es consumida en la fabricación de queso, con la que se obtienen productos de excelente calidad y cremosos.

Industria Dermatológica: Se usa en ciertas cremas faciales, limpiadoras y de lifting y también se usa en pasta de dientes.

Industria del Curtido de Cueros: La papaína se usa para alisar los cueros y para la remoción del pelo.

Industria de Cereales: Se usa para enriquecer las proteínas de los cereales y de alimentos con alto contenido proteico. (p.16)

2.2.6. Microencapsulación

Es una de las formas de acondicionar la muestra para facilitar la operación del secado por aspersion, es por tal motivo que a continuación se detalla mejor acerca de esta técnica.

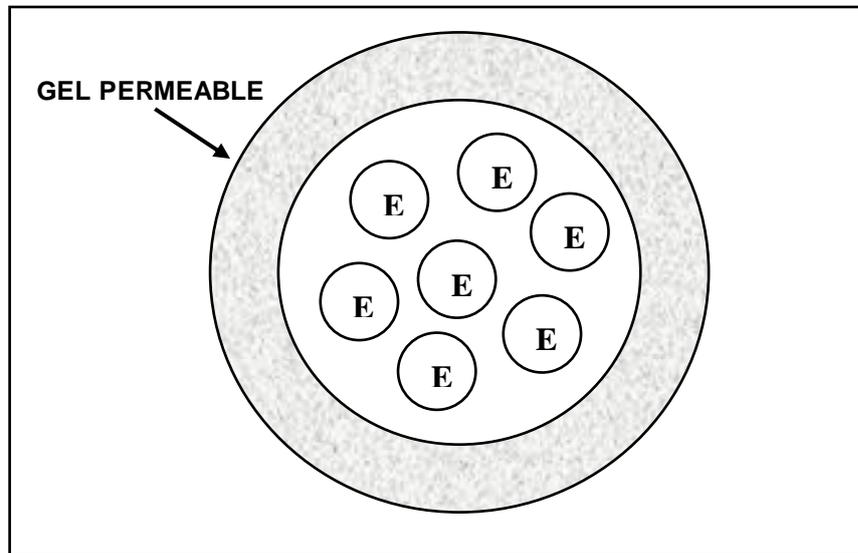
La microencapsulación es un método de inmovilización mediante retención física, que permite atrapar sustancias tales como enzimas, células o biomoléculas en una matriz o sistema de pared (Kure y Yugcha, 2012, p.22).

La tecnología de microencapsulación de embalaje corresponde al que se aplica a capas delgadas de polímero en las gotas de sólidos, líquidos o materiales gaseosos, las partículas de forma que se llama microesferas que pueden liberar su contenido bajo condiciones específicas y la velocidad (Porras, 2012, p.9).

Las microcápsulas están compuestas por dos partes: el núcleo o centro activo y por la corteza que lo envuelve. La corteza es una membrana semipermeable, delgada y fuerte alrededor de su centro (Kure y Yugcha, 2012, p.22), ver figura 6.

Figura 6

Partes de una micro cápsula

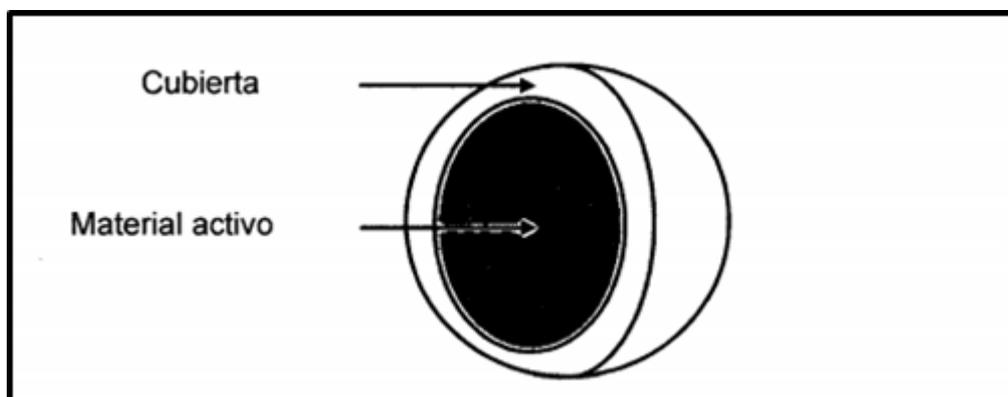


Fuente: Kure y Yugcha (2012)

El material encapsulado puede ser conocido como núcleo, fase interna o de relleno, mientras que el encapsulante se puede llamar Shell, revestimiento, material de la pared o membrana (Porras, 2012, p.9), ver figura 7.

Figura 7

Estructura general de una Microcápsula



Fuente: Porras (2012)

a. Métodos de encapsulación

La elección del método de encapsulación depende de una serie de factores como el tamaño de partícula requerido, las propiedades físicas y químicas del núcleo y la pared, la aplicación del producto final deseado, mecanismos de liberación, la escala y el costo de producción (Porrás, 2012, pp. 11-12).

Varios métodos se emplean para encapsular, entre los que destacan:

Métodos físicos: Secado por aspersion, extrusión estacionaria, boquilla sumergida, extrusión centrífuga, boquillas vibrantes, bandeja de recubrimiento, liofilización, enfriamiento tras aspersion, recubrimiento con lecho fluidizado, entre otras.

Métodos químicos: Polimerización interfacial, inclusión molecular, polimerización en situ.

Métodos fisicoquímicos: Coacervación simple, coacervación compleja, atrapamiento en liposomas, lipoesferas, evaporación de solvente.

2.2.7. Goma arábica

La goma arábica (GA) es un biopolímero obtenido del exudado del árbol acacia, de la familia Leguminosae, originaria de Egipto, es extraída y pulverizada con procesos limpios, a partir de diversas especies de acacia, predominando las especies Senegal y Seyal. La estructura química de la GA corresponde a un complejo polisacárido que contiene pequeñas cantidades de material nitrogenado. La GA o complejo proteico-

arabinogalactano, por sus características estructurales presenta un carácter anfílico, lo que le permite absorber en superficies lipofílicas, actuar como coloide protector, por ende, como un buen agente formador de películas; adicionalmente, presenta baja viscosidad y comportamiento newtoniano a concentraciones inferiores al 35% (Porrás, 2012, pp.31-32).

2.2.8. Propiedades de la goma arábica

La goma arábica, se ha utilizado principalmente como agente encapsulante para la microencapsulación en el secado por atomización debido a su excelente capacidad emulsificante y baja viscosidad en soluciones acuosas, contribuye a la estabilidad de alimentos deshidratados. El alto peso molecular de la goma arábica, en comparación con el de los solutos presentes en las frutas, hace que su incorporación aumente el peso molecular promedio del sistema, lo que se puede relacionar con un aumento en la temperatura de transición vítrea del producto de fruta en polvo, mejorando su estabilidad. Además, proporciona buena retención de sustancias volátiles y confiere protección efectiva frente a la oxidación. Sin embargo, su aplicación en la industria alimentaria es limitada en comparación con las maltodextrinas debido a que es menos soluble a temperatura ambiente (Porrás, 2012, p.32).

2.2.9. Centrifugación

La centrifugación es un método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza centrífuga. Una

centrífuga es un aparato que aplica una fuerza centrífuga sostenida (esto es, una fuerza producida por rotación). Las centrifugas son instrumentos que permiten someter a las muestras a intensas fuerzas que producen la sedimentación en poco tiempo de las partículas que tienen una densidad mayor que la del medio que las rodea. La base física de la separación es la acción de la fuerza centrífuga sobre las partículas en rotación, que aumenta con el radio del campo rotacional y con la velocidad de rotación (Mercado, 2017, párr. 1).

2.2.10. Secado

El secado es una operación unitaria física regida por la transferencia simultánea. Su objetivo es reducir el contenido de agua. En algunas ocasiones es el punto final para conseguir un producto listo para el envasado. El término secado indica la disminución de la humedad del producto a secarse (Villavicencio, 2011, párr.1).

Según la revista información tecnológica, volumen 9 de 1998, el látex mantenido en frasco cerrado en refrigerador a una temperatura de 5°C pierde actividad en más de un 20% después de dos días de su recolección y al cabo de una semana se contamina. Es por ese motivo que una de las mejores técnicas recomendadas para su conservación luego de la extracción es el secado (Kure y Yugcha, 2012, p.17).

2.2.11. Actividad enzimática

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma. La actividad enzimática se expresa habitualmente en micro moles (μmol) de sustrato convertido en producto por minuto, en determinadas condiciones de ensayo especificadas. Una unidad estándar de actividad enzimática (U) es aquella actividad que cataliza la transformación de $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de sustrato. La actividad específica de una preparación enzimática se define como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ o U/mg de proteína) (Arana y Quijano, pp. 41-42).

2.2.12. Factores que afectan la actividad enzimática

Existen diferentes causas por las que la actividad enzimática de la papaína se ve afectada, las cuales pueden provenir tanto del medio en el que se encuentra como de las características de su propia constitución, estas pueden ser:

- a) Oxidación química:** La presencia de agentes oxidantes como: yodo, oxígeno, peróxido de hidrógeno y metales pesados inactivan la enzima. Esto se debe a que los sulfhidrilos que participan en la acción catalítica de la enzima, se activan en estado reducido y se inactivan al oxidarse. Existen otros reactivos que retardan la oxidación que son el sulfito de sodio o de potasio, el dióxido de azufre, el bisulfito de sodio, potasio o amonio, el ácido tioglicólico y el ácido ascórbico.

También para evitar la oxidación química del látex es recomendable que las incisiones se realicen con materiales no corrosivos: acero inoxidable, vidrio, plástico y que los recipientes de recolección sean de plástico o lona.

- b)** Coagulación: Por ser de origen proteico y por la presencia de peptona y albuminoides en el látex fresco, este se coagula después de su extracción.
- c)** Cambios de pH: La papaína conserva su actividad proteolítica en un margen que abarca desde pH 3 hasta pH 12, mostrando un óptimo de actividad entre pH 5 y 6. Existen diversos amortiguadores utilizados en la manipulación del látex los más comunes son: el citrato de sodio y potasio, fosfato de sodio y potasio.
- d)** Oxidación por luz: La papaína presenta sensibilidad a la luz ultravioleta, y se potencia su oxidación cuando es combinada con presencia de oxígeno.
- e)** Desarrollo microbiano: Por ser de origen proteico y la dificultad de su recolección, existe la posibilidad de que sufra una contaminación microbiana que produzca deterioro del látex. Se suelen utilizar agentes que retardan el desarrollo de microorganismos como son los sulfitos y bisulfitos de sodio y potasio, el fenol, el paranitrofenol, los benzoatos, el resorcinol, y el etilfenol.
- f)** Hora de recolección: La recolección del látex debe de realizarse en las primeras horas de la mañana, ya que es en esta etapa del día cuando menor acción de la luz se aprecia, lo cual evita que el látex sufra

deterioros por causa de la acción de la luz ultravioleta. No obstante, no existe diferencia significativa en la actividad proteolítica de la papaína, al realizarse las extracciones del látex entre 5:30 y las 14 horas del día.

2.2.13. Medición de la actividad enzimática

El parámetro de control de calidad de la papaína es la medición de su actividad proteolítica; se expresa como el incremento en la velocidad de reacción de la conversión de un sustrato en producto por intervención del enzima. Esta acción catalítica se la puede medir también en referencia a la digestión de un péptido o proteína y la extensión de tal digestión es medida de diferentes formas; existen tres:

- ✓ Métodos que se encargan de la medición de los residuos de un péptido no digerido por el enzima.
- ✓ Métodos que miden los grupos amino liberados en la catálisis.
- ✓ Métodos que miden la rotación óptica de los residuos digeridos, el tiempo de coagulación de una muestra de leche, el color producido por un reactivo en los residuos digeridos y el aumento de los sólidos solubles en el medio de reacción.

Dentro de este contexto, se detallarán los resultados de un estudio realizado por G. Glibota en el cual trabaja con algunos sustratos y concluye lo siguiente:

- a) Método colorimétrico. - Consiste en la hidrólisis del sustrato sintético BAPA (benzoil arginina p-nitro anilina) hasta obtener el producto p - nitro anilina que tiene coloración amarilla. El cambio de color y su intensidad

están en función de la actividad proteolítica de la enzima. Los digeridos se miden en un espectrofotómetro a 410nm. El tiempo de reacción es de 6 horas a 25°C. Este método dio resultados muy bajos y se recomienda esta técnica para un ensayo con tripsina –enzima proteolítica- pues con esta enzima los resultados son más confiables.

- b)** Método título métrico. - Esta técnica utiliza otro sustrato sintético: BAEE (N- α -benzoil-L-arginina etil éster). Se titula con NaOH 0.015N, al producto de reacción a pH constante de 6.2 y temperatura de 25°C. Este método permitió obtener resultados proporcionales a la concentración de enzima, así como un ajuste regresional en la gráfica de calibración de la actividad es exacto, sin embargo, su costo es elevado.
- c)** Método de hidrólisis con caseína. - Se lleva a cabo una reacción con caseína y al final de la misma se hace precipitar con ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Luego se realizan las lecturas del sobrenadante formado en el espectrofotómetro a 280nm. Este método no permitió obtener una curva aceptable salvo a bajas concentraciones.
- d)** Método analítico de la unidad de tirosina. - El método de medición de la unidad de tirosina fue desarrollado por la empresa estadounidense Enzyme Development Corporation. Está basado en la facultad que tiene la papaína para hidrolizar la cisteína, y formar como productos aminoácidos de tirosina, basándose en las condiciones especiales de pH y temperatura para efectuar la reacción (Kure y Yugcha, 2012, p.63).

2.3. Conceptual

Se conocen tres variedades de papaya cultivadas en Perú éstas son: Criolla normal, Maragol y Tingo María. La variedad criolla tiene un mayor rendimiento de látex que la variedad maragol en un 47.13% aproximadamente. (Arana y Quijano, 2012, p.135). En la selección de la papaya, se debe considerar la edad, comprendida entre 2 y 3 meses de plantación y su color tiene que ser verde oscuro. La papaya pertenece a un grupo de especies de plantas laticíferas, estas contienen células ramificadas e interconectadas que forman una matriz de tubos complejos dispersos en los tejidos de las plantas, que secretan una sustancia conocida como "látex".

Existen diversos métodos para la extracción del látex de papaya, normalmente se recomienda implementar prototipos de fácil y rápida recolección de manera más óptima, sin afectar las propiedades del látex a extraer.

Para la incisión de la fruta debe utilizarse materiales como navajas inoxidables o materiales de plástico, y la recolección debe realizarse por la mañana (entre 5 am y 9 am) con incisiones verticales, para evitar oxidación del látex por la luz UV; el látex exudado debe recogerse con un embudo grande y recolectarse en recipientes de plástico, es importante que para todo el proceso de recolección se realice con el uso de guantes de látex, ello debido a la naturaleza ácida de la materia prima.

La papaína es un compuesto fácilmente alterable por agentes tales como: el oxígeno, la luz solar, la temperatura; debido a esto se debe conservar el látex añadiendo preservantes como citrato de sodio, bisulfito de sodio, benzoato de

sodio, cisteína y EDTA y mantener la muestra a 4°C. (Arana y Quijano, 2012, p.136).

Los pasos siguientes para la obtención de papaína es la centrifugación de la muestra obteniendo dos fases, en donde en la fase sobrenadante se encuentra la enzima papaína, la cual se inmovilizada por retención física, inclusión de membranas y micro encapsulación con goma arábica a dos concentraciones diferentes.

La micro encapsulación es un método de inmovilización mediante retención física, que permite atrapar sustancias tales como enzimas, células o biomoléculas en una matriz o sistema de pared (Kure y Yugcha, 2012, p.22) con el fin de evaluar la efectividad de la enzima mediante el método analítico de la unidad de tirosina (TU) esto indica la cantidad de tirosina liberada partiendo de un sustrato de caseína.

2.4. Definición de términos básicos

Actividad enzimática: La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma.

Análisis químico: Determinación de la composición química de una sustancia.

La centrifugación: Es un conocido método físico de separación, por la cual la fuerza de gravedad se sustituye por una fuerza de conducción más alta, mediante la aplicación de fuerza centrífuga.

Enzimas: Son biocatalizadores, agentes de origen biológico que aceleran la velocidad a la cual ocurren las reacciones químicas al disminuir los requerimientos de energía de activación necesaria para dichas reacciones (Cornish-Bowden, 1995).

Las enzimas digestivas: son todas aquellas enzimas que participan del proceso digestivo realizando la degradación de los polímeros orgánicos en monómeros para su posterior absorción.

Látex: El látex es un líquido espeso, generalmente blanco que circula dentro de ciertos vegetales. Se produce en los tubos laticíferos, que son células o grupos de ellas especializadas y muy alargadas, ubicados por debajo de la epidermis (Jiménez, 2002).

Las proteasas: Son enzimas que provocan la hidrólisis o digestión de otras proteínas en fragmentos más pequeños y en ciertas condiciones pueden ser usadas para la síntesis de nuevos Compuestos de interés farmacéutico (Chaiwut, Kanasawud et al., 2007).

Papaína: La papaína es una enzima proteolítica que se extrae del látex del fruto llamado papaya.

Papaya: Fruto del papayo, generalmente de forma oblonga, hueco y que encierra las semillas en su concavidad, conocido por su elevada composición proteico.

Preservantes: Son sustancias que se utilizan para conservar propiedades iniciales de alimentos y evitar su deterioro.

Proteínas: Son moléculas formadas por una o varias cadenas de aminoácidos.

Secado: Es un método físico que permite extraer la humedad o hacer que se evapore de un cuerpo mojado mediante acción del aire o calor que se le aplica.

Variable: Es una característica, atributo, propiedad o cualidad que puede estar o no presente en los individuos, grupos o sociedades; puede presentarse en matices o modalidades diferentes o en grados, magnitudes o medidas distintas.

Optimo: Se refiere a características muy buenas, que no puede ser mejor.

Determinación: Acción y efecto de determinar o determinarse, referido a algo que debe encontrarse.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis.

Para la presente investigación se consideró que las variables dependientes son una función de la determinación de las condiciones adecuadas para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya.

3.1.1. Hipótesis General.

Las variables óptimas para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya son tiempo de centrifugado, concentración del agente encapsulante y tiempo de secado; las cuales son significativas para el proceso.

3.1.2. Hipótesis Específicas.

- El tiempo de centrifugado óptimo varía entre (50-70) min para la separación del líquido sobrenadante del látex.
- La concentración del agente encapsulante óptimo, varía entre (10/90, 30/70) p/v para la obtención de la papaína.
- El tiempo de secado óptimo varía entre (3-4) horas para la obtención de la papaína.

3.2. Definición conceptual de variables.

Variables óptimas para la obtención de papaína cruda a partir del látex de papaya.

- ✓ Tiempo de centrifugación medido en minutos.
- ✓ Concentración del agente encapsulante respecto al látex, expresado en W/V.

- ✓ Tiempo de secado del látex medido en horas.
- ✓ X1= Tiempo de centrifugación medido en minutos.
- ✓ X2= Concentración del agente encapsulante expresado en W/V.
- ✓ X3= Tiempo de secado medido en horas.

A. Variables dependientes

F(x) = Papaína cruda a partir del látex de papaya.

B. Variables independientes

X1= Tiempo de centrifugación.

X2= Concentración del agente encapsulante.

X3= Tiempo de secado

3.2.1. Operacionalización de variables.

La tabla 5 muestra la operacionalización de variables.

Tabla 5

Operacionalización de Variables

VARIABLES	INDICADORES	MÉTODO	DIMENSIONES
Dependiente:			
Y1 = Papaína cruda a partir del látex de papaya.	Efectividad de la papaína (Unidades de Tirosina TU)	Método analítico de la unidad de Tirosina (TU)	TU/mg
Independiente:			
X1 = Tiempo de centrifugación.	tiempo	Cronómetro	minutos
X2 = Concentración del agente encapsulante.	concentración	Balanza analítica	W/V
X3 = Tiempo de secado.	tiempo	Cronómetro	horas

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo y diseño de investigación.

4.1.1. Tipo de investigación.

El presente trabajo de investigación es experimental y explicativa y se encuentra ubicado en la línea de investigación prioritaria en el área de Ingeniería y Tecnología en la sub área Biotecnología Industrial y en la línea de investigación de Biotecnología Industrial por cuanto trata de interpretar el fenómeno, buscando los efectos y las causales que lo originan.

4.1.2. Diseño de investigación.

El presente trabajo de investigación según el propósito de estudio es experimental y por lo tanto de acuerdo a la cronología de las observaciones es prospectivo porque, se tiene control de las variables independientes para ver su efecto en la variable dependiente. Además, según el número de mediciones es longitudinal.

El método de investigación sigue la secuencia:

1. Investigación bibliográfica sobre la obtención de la papaína, la cual se ha recopilado, revisado, seleccionado, disgregado, analizado y criticado las informaciones sobre la obtención de la papaína.
2. Análisis del proceso de obtención o la tecnología, la investigación experimental de acuerdo al tipo y diseño de investigación, en donde se caracterizó las variables independientes donde se realiza una variación en la concentración en peso y volumen del agente encapsulante en la

micro encapsulación en la toma de dos tiempos de centrifugación en dos tiempos de secado en estufa.

4.2. Método de investigación.

Debido al enfoque y a la necesidad de contar con datos estadísticos que provienen de la población bajo estudio el campo es experimental, deductivo, observacional, analítico puesto que plantea una hipótesis y busca darle respuesta a través de sucesos experimentales.

4.3. Población y muestra.

4.3.1. Población

No aplica para tal investigación.

4.3.2. Muestra

En la presente investigación se usó 19mL de muestra el látex de papaya verde como unidad de análisis.

4.4. Lugar de estudio y periodo desarrollado.

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio Green Lab ubicado en el distrito de los Olivos, Lima, durante el 01 de abril del 2020 al 05 de abril del 2021.

4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información.

4.5.1. Técnicas.

El presente trabajo de investigación utilizó la técnica deductivo, observacional y cuantitativo de evaluación y determinación del látex de papaya utilizando instrumentos de medición adecuado.

Técnica experimental y observacional para la determinación de los parámetros del proceso de obtención de la papaína a nivel de laboratorio utilizando secado por estufa.

4.6. Análisis y procesamiento de datos.

4.6.1. Diseño Experimental

Se rige de acuerdo al diseño experimental puro, donde se caracterizan por un alto grado de control de las variables que pueden intervenir en la validez interna de la hipótesis de investigación y porque efectúan asignación aleatoria de los sujetos a los grupos (experimental y control) participantes en la investigación.

4.6.2. Procedimiento experimental

A continuación, se describe el procedimiento experimental:

Extracción de látex:

El fruto debe tener entre 2 y 3 meses de plantación y debe ser de color verde oscuro. Previamente desinfectar la superficie del fruto con solución de 5ppm de hipoclorito de sodio y secar con papel toalla para evitar contaminar las muestras a extraer, manipular con guantes al realizar incisiones verticales con una profundidad entre 2 y 3 mm, con materiales no corrosivos (acero inoxidable, vidrio, plástico); y colectarlo en envases oscuros o ámbar de plástico, almacenar a una temperatura de 4°C, ver figura 8.

Figura 8

Lavado, desinfección del fruto y extracción del látex



Adición de preservantes:

Pesar 23.4077 g de muestra de látex de papaya y adicionar 0.4% de bisulfito de sodio (agente antioxidante o retardante de la oxidación química y agente microbiano) a temperatura ambiente, también adicionamos 4% de citrato de sodio (amortiguador de pH), y por último EDTA 0.2% (agente quelante), en esta etapa es importante no exponer por tiempos prolongados la muestra para evitar la contaminación de la misma. Se obtuvo un volumen de 152mL.

Almacenamiento:

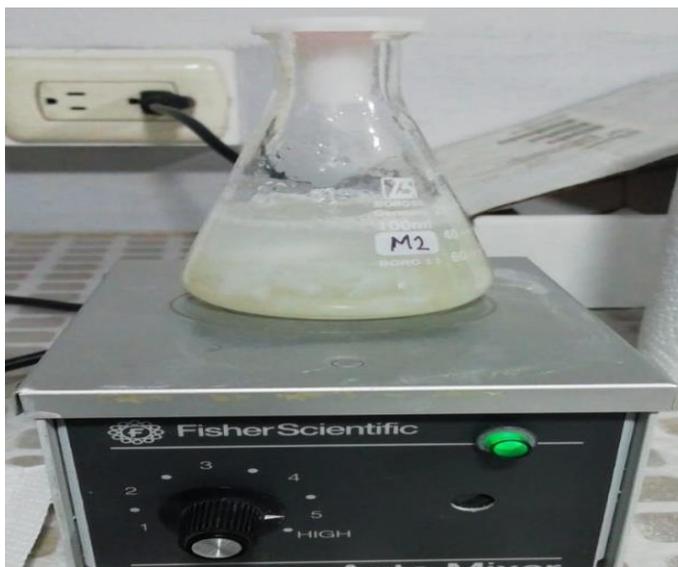
La muestra se mantuvo refrigerada a una temperatura de 4°C en un recipiente oscuro o ámbar totalmente cerrado para evitar la oxidación de la muestra.

Micro encapsulación:

Aplicamos la siguiente técnica: usamos como agente encapsulante la goma arábica (solución diluida con agua destilada a 70°C con un agitador magnético) para solución de látex centrifugado con una proporción de 10/90 y 30/70 expresadas en w/v, como se muestra en la figura 9; realizamos esta experiencia para cada tiempo de centrifugado respectivamente.

Figura 9

Acondicionamiento.



Centrifugación:

Se realizó 8 experiencias de 40 mL cada muestra, centrifugamos a 2000 rpm para 50 y 70 minutos, luego se procedió a filtrar la muestra y separar el sobrenadante (citosol, se concentra la mayor cantidad de papaína). Ver figura 10.

Figura 10

Centrifugación



Secado en estufa:

Una vez realizado el paso anterior, se procedió a secar la muestra usando una estufa a 60°C para tiempos de 3h y 4h para cada experiencia obtenida en el paso anterior, logrando obtener así 8 experiencias.

El producto en polvo obtenido es la papaína cruda, se pesan almacenándolas en un lugar en refrigeración y protegidos de la luz.

Análisis de actividad proteolítica:

Se deben realizar los siguientes pasos para determinar la actividad proteolítica. Ver anexo 2. La exactitud de los parámetros de prueba son las siguientes:

- Rango: Las lecturas de absorbancia después de la corrección con el blanco deben ser de entre 0.150 y 0.700 y pueden usarse para encontrar la actividad aproximada de muestras

desconocidas. Sin embargo, la prueba final debe caer dentro del rango de 0.200 a 0.500.

- Pruebas duplicadas a diferentes niveles de enzimas no deberán variar por más del 3%.

A. Bases de diseño

Estudiar la obtención de la papaína a partir del látex de papaya en forma experimental. Las variables cuantitativas a controlar son tiempo de centrifugación, concentración del agente encapsulante y tiempo de secado.

Para este caso se usará el diseño factorial 2^n , donde 2^n es el número de experiencias que deben realizarse para distintos valores de las "n" variables. Por lo tanto, se tiene un diseño de dos variables con modelo $2^3 = 8$ experiencias que deben realizarse para obtener las variables de la obtención de la papaína, tal como se observa en la tabla 6 y tabla 7.

Tabla 6*Variables y niveles para el diseño experimental*

Variables	Niveles	
	-	+
Tiempo de centrifugación (min)	50	70
Concentración del agente encapsulante (w/v)	10-90	30-70
Tiempo de secado, (h)	3	4

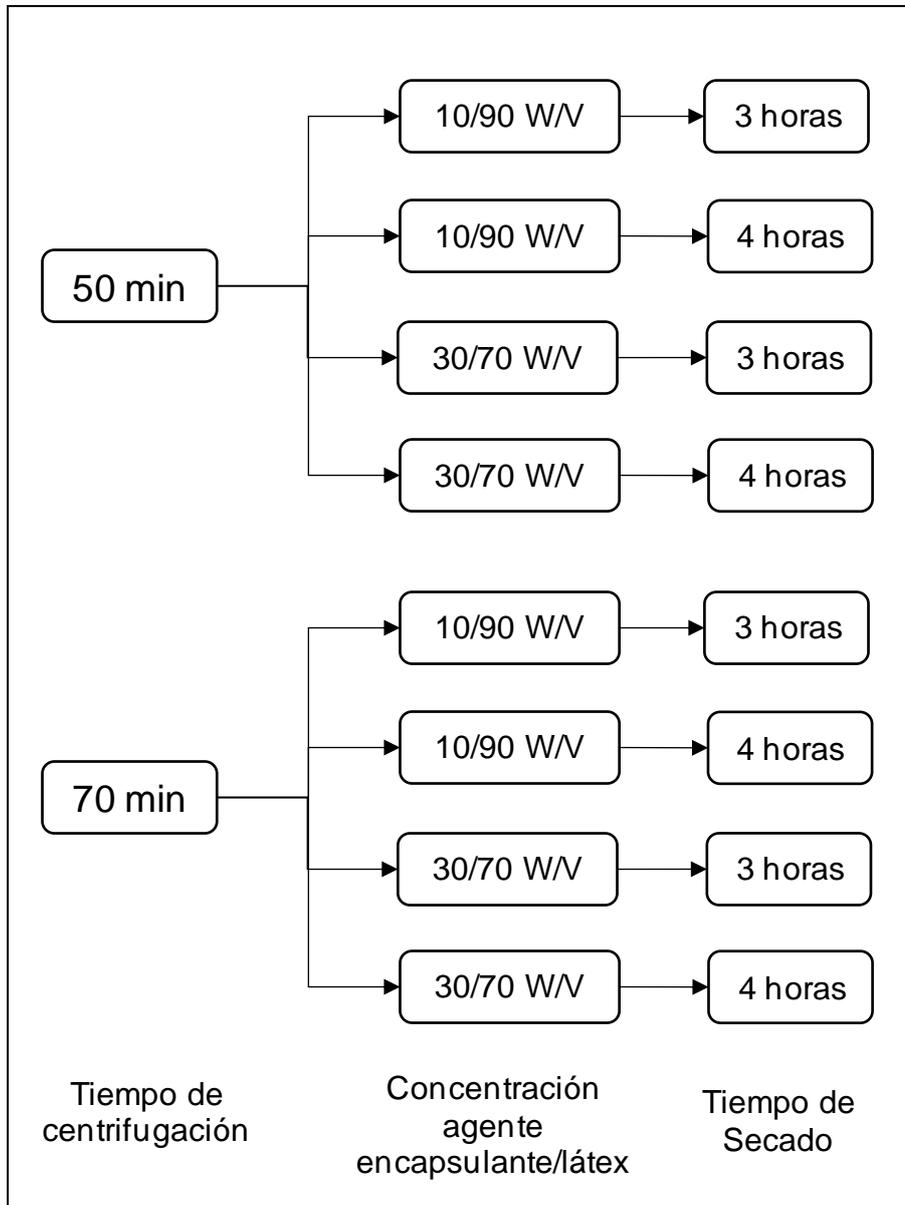
Tabla 7*Diseño experimental $2^3=8$*

Número de experiencias	Notación de variables	Vector de Respuestas
		Actividad Proteolítica
1	- +	
2	- +	
3	- -	
4	- -	
5	+ -	
6	+ -	
7	+ +	
8	+ +	

En la figura 11, se muestra el diseño factorial de las experiencias realizadas.

Figura 11

Diseño factorial



B. Equipo de laboratorio empleado en la Investigación

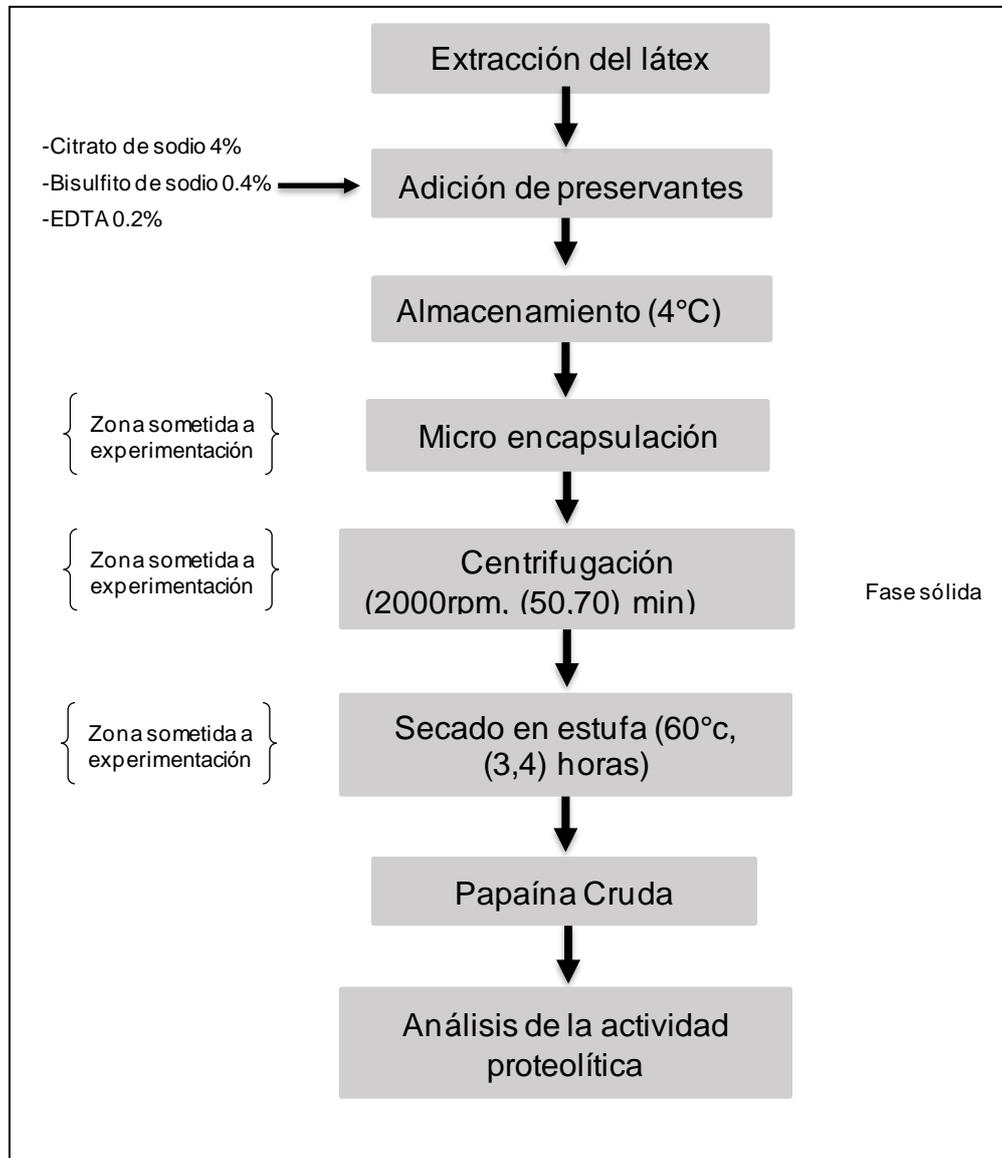
Los equipos usados en la investigación fueron:

- Equipo de centrifugación marca *JANETZKI T25* (Ver Anexo 3 - Figura 22)
- Estufa marca *MEMMER UF260* (Ver Anexo 3 - Figura 23)
- Baño termostático marca *LAUDA AQUALINE AL 25* (Ver Anexo 3 - Figura 24)
- Balanza Analítica de precisión marca *Sartorius* (Ver Anexo 3 - Figura 25)
- Agitador magnético auto mixer, marca *FISHERSCIENTIFIC* (Ver Anexo 3 - Figura 26).
- Potenciómetro, marca *ORION* (Ver Anexo 3 - Figura 27)
- Espectrofotómetro UV, marca *ORIÓN* (Ver Anexo 3 - Figura 28)

En la figura 12 se muestra las etapas del proceso experimental.

Figura 12

Diseño experimental



C. Control de prueba (las condiciones de operación)

Se realizó la recolección de los frutos de papayas verdes. En la tabla 8 se muestra los pesos de cada uno y el látex obtenido de cada uno de ellos.

Tabla 8*Peso de látex obtenido por cada fruto de papaya*

N°	Peso Frutos de papaya (kg)	Peso látex obtenido (g)
1	1.7	19.232
2	0.83	9.521
3	0.79	6.324
4	1.15	12.988

Luego de la recolección del látex, se procedió al acondicionamiento de las muestras, agentes acondicionantes con sus respectivos pesos, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9*Agentes acondicionantes agregados a la muestra*

Agentes acondicionantes	Peso (g)
Peso muestra de látex (g)	48.0650
Peso EDTA (0,2% muestra)	0.0961
Peso Bisulfito (0,4% muestra)	0.1923
Peso Citrato (4% muestra)	1.9226

La distribución de muestras se realizó para 8 experiencias de la siguiente manera:

$$Peso\ total\ de\ la\ muestra\ (g) = MT + MA$$

$$\text{Peso total de la muestra} = 50.276 + 101.644 = 151.92 \text{ g}$$

Donde:

- MT: Muestra acondicionada (látex+ agentes Acondicionantes)
- MA: Masa de agua adicionada para la dilución

$$\text{Peso por cada muestra (g)} = \frac{\text{Peso total muestra (g)}}{N^{\circ} \text{ muestras}}$$

$$\text{Peso por cada muestra (g)} = \frac{151.92}{8} = 18.99 \cong 19.00$$

A continuación, se muestra la relación Peso/ volumen del agente encapsulante por volumen de solución, ver en la tabla 10.

Tabla 10

Relación Peso/ Volumen (agente encapsulante/muestra)

PROPORCIÓN W/V	AGENTE ENCAPSULANTE (g)	MUESTRA ACONDICIONADA (ml)
10/90	2.11	18.99
30/70	8.14	18.99

En la tabla 11 se muestra la distribución y medida de variables

Tabla 11*Distribución y medida de variables*

MUESTRAS	Concentración de agente (W/V)	Peso agente encapsulante (g)	Tiempo centrifugado (min)	Tiempo de secado (hr)
M1	10/90	2.11	50	3
M2	10/90	2.11	50	4
M3	30/70	8.14	50	3
M4	30/70	8.14	50	4
M5	10/90	2.11	70	3
M6	10/90	2.11	70	4
M7	30/70	8.14	70	3
M8	30/70	8.14	70	4

V. RESULTADOS

5.1. Resultados descriptivos.

Se midió las absorbancias de las 8 muestras, en el laboratorio Green Lab con el equipo espectrofotómetro UV marca ORIÓN los cuales se muestran en la tabla 12 (según número de muestra).

Tabla 12

Lectura de absorbancias

N° MUESTRAS	ABSORBANCIA		
	BLANCO	MUESTRA	DELTA
M1	2.699	3.337	0.638
M2	2.455	3.174	0.719
M3	2.604	3.189	0.585
M4	2.466	3.128	0.662
M5	2.527	3.065	0.538
M6	2.435	3.071	0.636
M7	2.537	3.062	0.525
M8	2.400	3.019	0.619

Curva Patrón de Tirosina

Para determinar la actividad enzimática se realiza una curva patrón de Tirosina, los valores obtenidos de absorbancia de acuerdo a las diferentes concentraciones de tirosina se muestran a continuación en la tabla 13.

Tabla 13

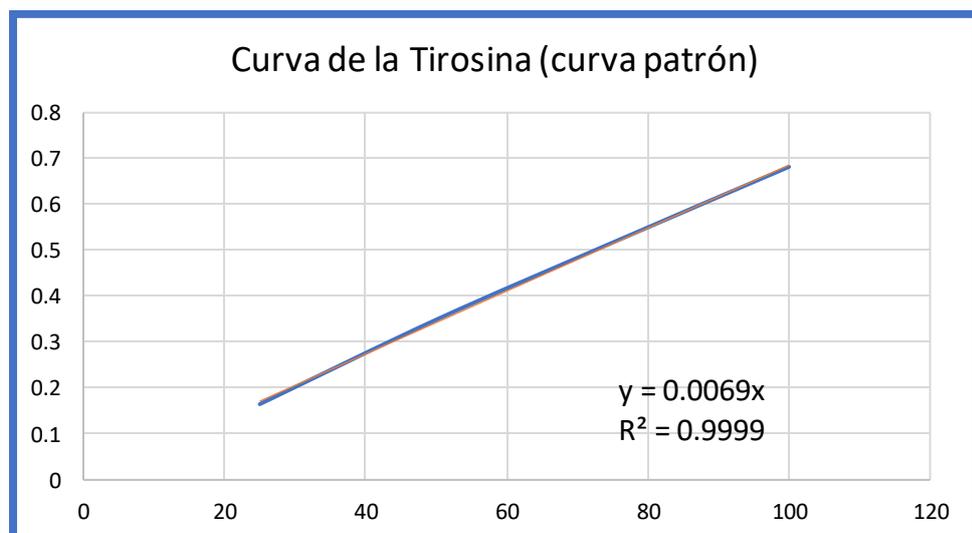
Curva de Tirosina (Curva Patrón)

Curva de Tirosina (Curva Patrón)		
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia leída (A)	Absorbancia corregida (A)
Blanco	0.515	0
25	0.68	0.165
50	0.864	0.349
75	1.032	0.517
100	1.197	0.682

Graficamos los datos de las absorbancias obtenidas respecto a las concentraciones de Tirosina ($\mu\text{g/ml}$), realizamos un ajuste de datos para obtener la ecuación de recta, que mostramos en la figura 13:

Figura 13

Curva de Tirosina (Curva Patrón)



En el trabajo de investigación se obtuvieron resultados experimentales los cuales serán mencionados en la tabla 14:

A continuación, se presenta un ejemplo del cálculo de la actividad proteolítica para cada muestra, usando la siguiente formula:

$$\frac{TU}{mg} = O.D \times \frac{D.F}{4} \times \frac{20}{60} \times \frac{1}{pendiente}$$

$$\frac{TU}{mg} = 0.638 \times \frac{1}{0.01 \times 4} \times \frac{20}{60} \times \frac{1}{0.0069}$$

$$\frac{TU}{mg} = 770.53$$

Tabla 14

Actividad proteolítica

N° MUESTRAS	ABSORBANCIA = DELTA corregida	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA (TU/mg)
M1	0.638	0.638	770.53
M2	0.719	0.719	868.36
M3	0.585	0.585	706.52
M4	0.662	0.662	799.52
M5	0.538	0.538	649.76
M6	0.636	0.636	768.12
M7	0.525	0.525	634.06
M8	0.619	0.619	747.58

5.2. Resultados inferenciales.

Utilizamos el programa MINITAB en donde se trataron los valores de actividad proteolítica y las variables obteniendo las siguientes tablas y figuras.

Tabla 15

Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef.	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		743.06	6.59	112.78	0.000	
Tiempo secado	105.68	52.84	6.59	8.02	0.001	1.00
Tiempo centrifugado	-86.35	-43.18	6.59	-6.55	0.003	1.00
Concentración agente	-42.27	-21.14	6.59	-3.21	0.033	1.00

Tabla 16

Resumen de modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred.)
18.6347	96.71%	94.24%	86.84%

Tabla 17*Análisis de varianza*

	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	40823	13607.6	39.19	0.002
Lineal	3	40823	13607.6	39.19	0.002
Tiempo secado	1	22335	22335.5	64.32	0.001
Tiempo centrifugado	1	14914	14913.5	42.95	0.003
Concentración agente	1	3574	3573.9	10.29	0.033
Error	4	1389	347.3		
Total	7	42212			

Según las tablas mostradas anteriormente obtenemos la siguiente ecuación:

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$ACT. PROTEOLÍTICA = 668,2 + 105,7 Ts - 4,318 Tc - 7,01 Ca$$

Donde:

- ✓ Ts: Tiempo de secado
- ✓ Tc: Tiempo de centrifugado
- ✓ Ca: Concentración agente encapsulante

Tabla 18

Estructura de alias

Factor	Nombre
A	Tiempo secado
B	Tiempo centrifugado
C	Concentración agente

Alias

I
A
B
C

Figura 14

Gráfica normal de efectos estandarizados

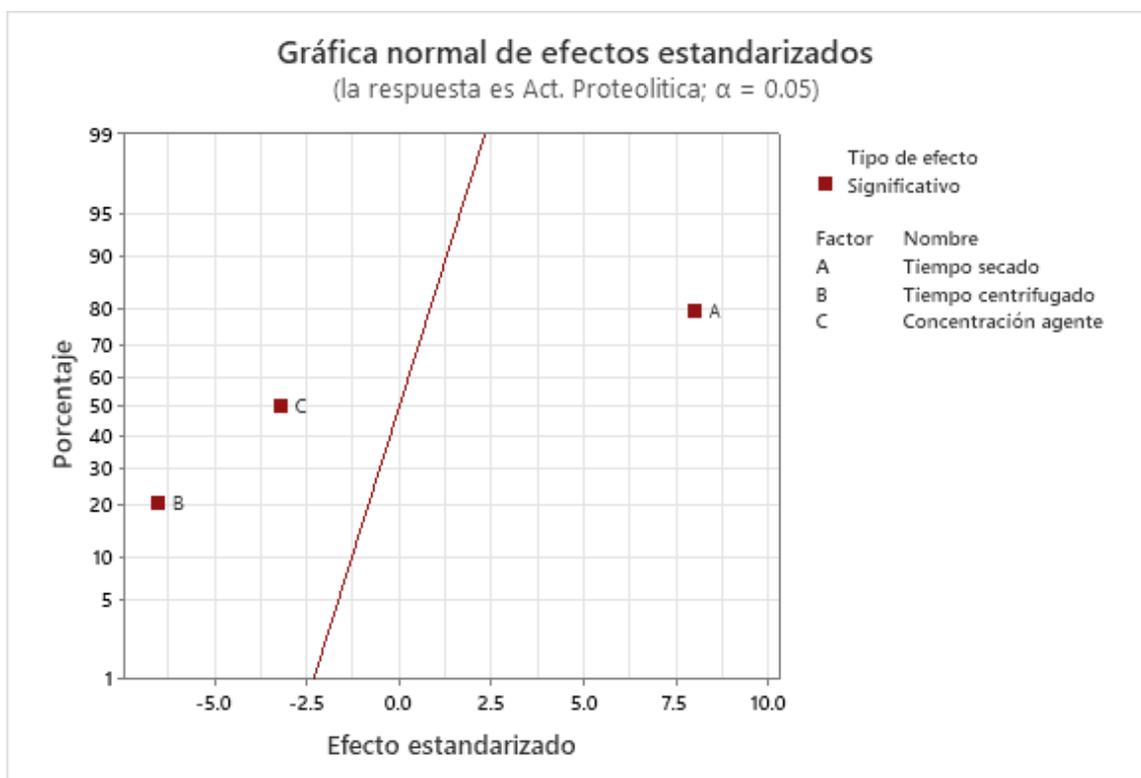


Figura 15

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados

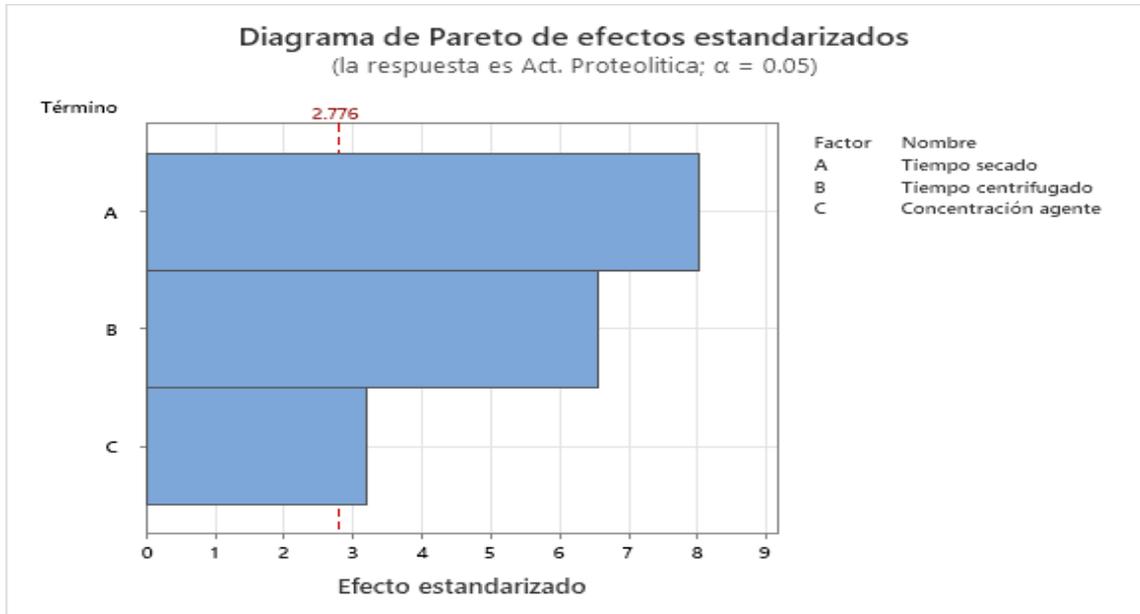


Figura16

Gráfico de contorno 1

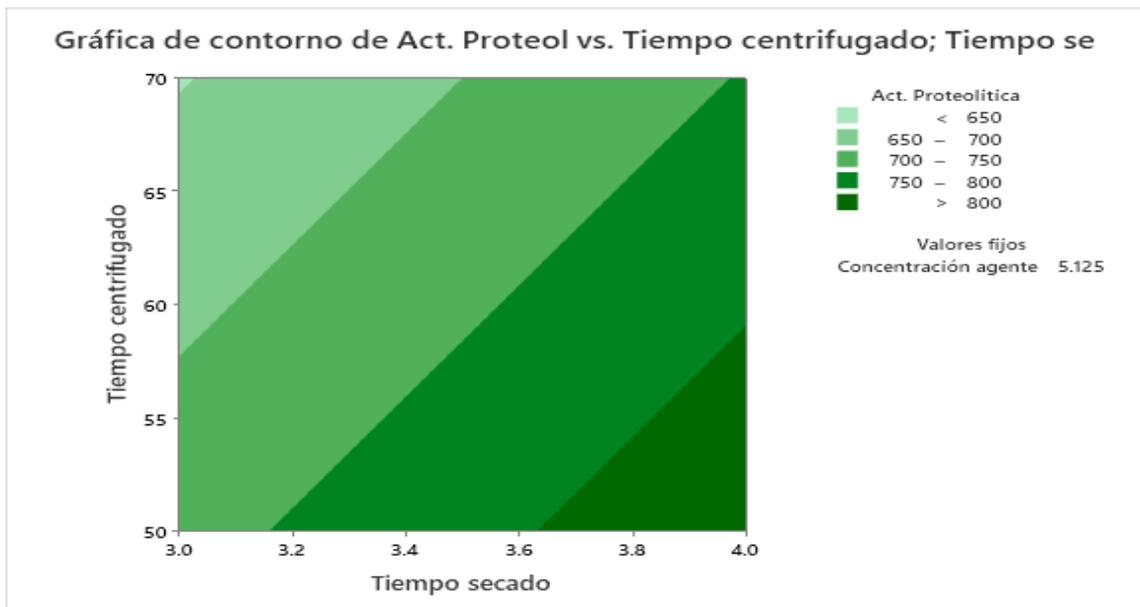


Figura 17

Gráfico de contorno 2

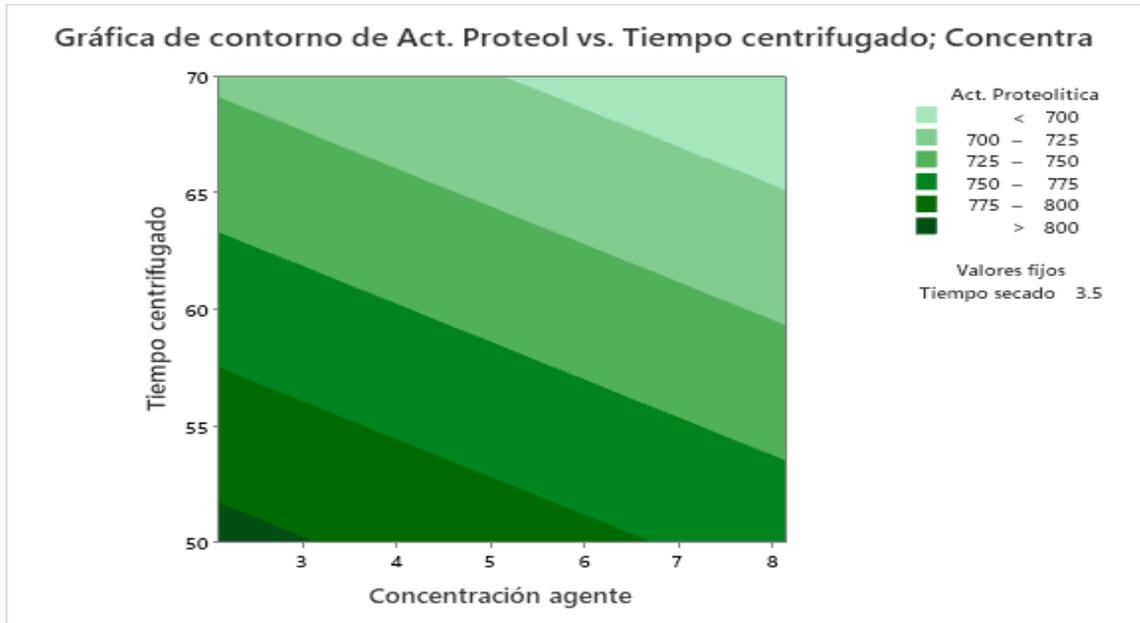


Figura 18

Gráfico de contorno 3

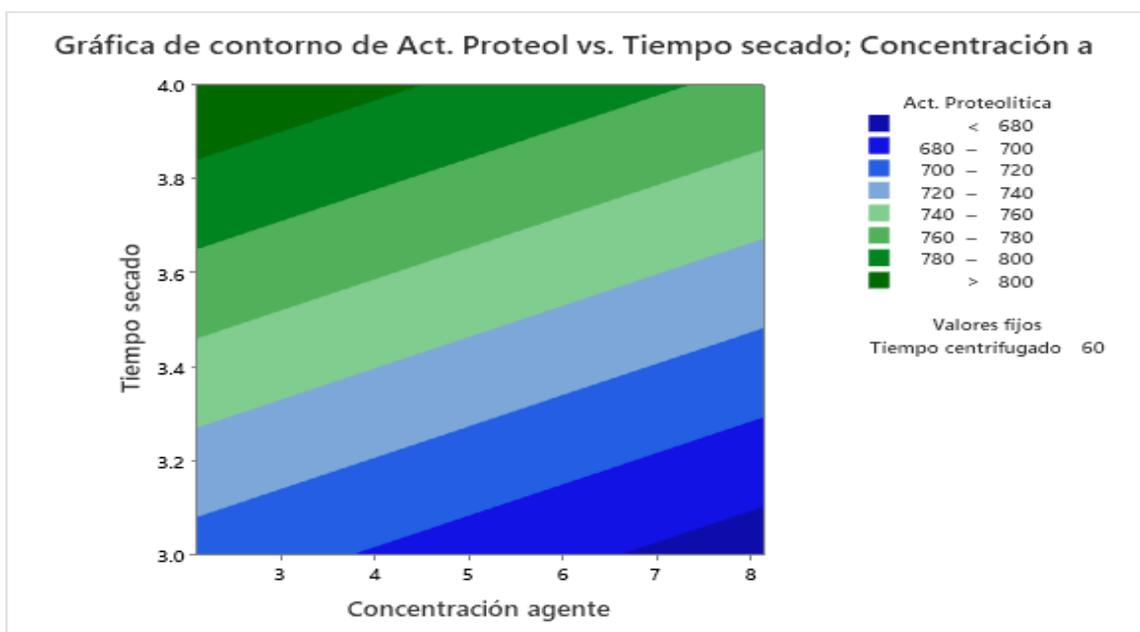


Figura 19

Gráfico de contorno 4

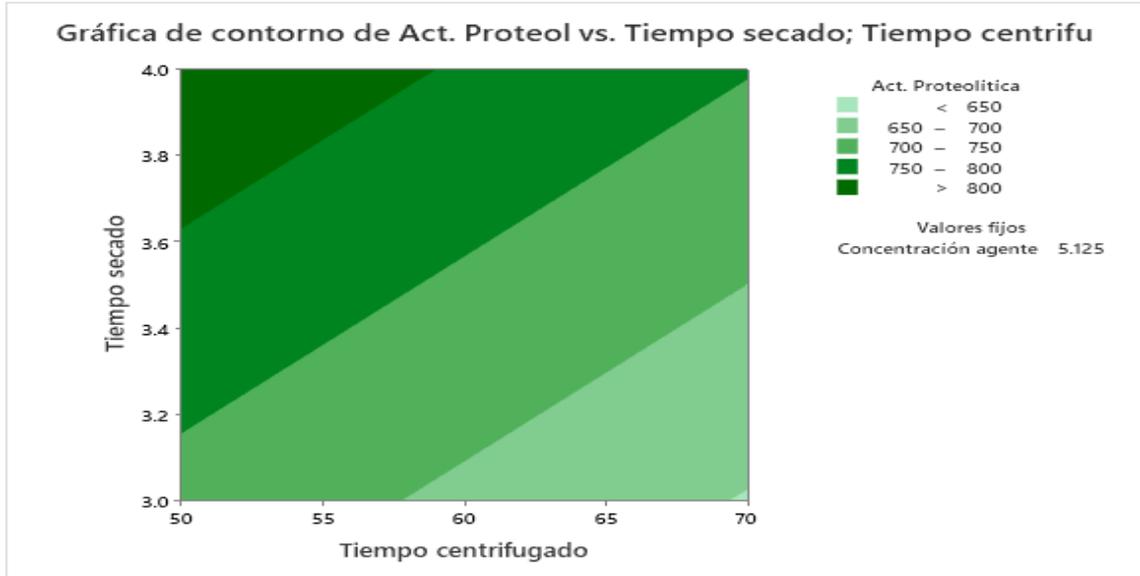


Figura 20

Gráfico de contorno 5

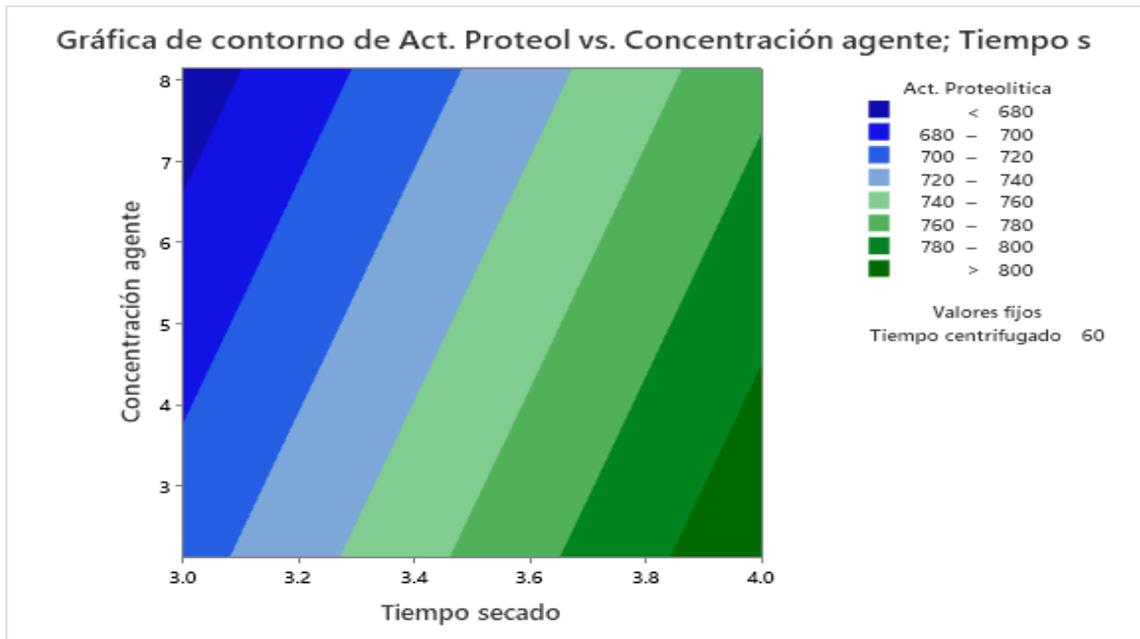
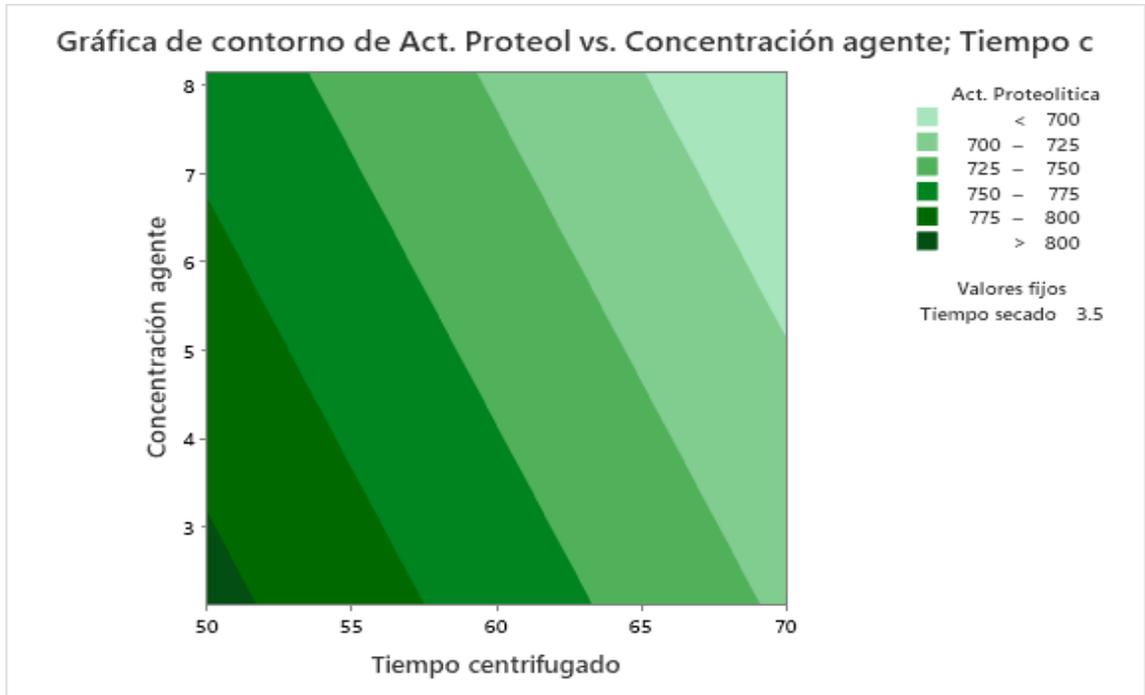


Figura 21

Gráfico de contorno 6



5.3. Otro tipo de resultados estadísticos de acuerdo a la naturaleza del problema y la Hipótesis.

No es el caso de aplicación al presente trabajo porque las variables se han determinado de manera experimental y no mediante la recurrencia de simulación de modelos matemáticos.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.

- ✓ Hipótesis Específicas:

Obtenemos superficies de contorno, se obtiene mayor rendimiento de actividad proteolítica cuando el tiempo de centrifugado se acerca más al valor de 50min y el tiempo de secado se acerca más al valor de 4 horas como se puede ver en el FIGURA 15, 16, 17, 18, 19 y 20 de acuerdo a estos resultados obtenidos realizamos las pruebas de hipótesis planteadas.

- ✓ En referencia a los coeficientes

H_0 : Todos los coeficientes son igual a cero.

H_i : Algún coeficiente es diferente de cero

Realizando el análisis de coeficientes codificados (TABLA 15) se observa que los valores de P de todos los coeficientes son menores a 0.05 de esta manera rechazamos H_0 y aceptamos la H_i , esto es los coeficientes del modelo son significativos.

Para reforzar esta conclusión también se puede ver que en la TABLA 16, El valor del R^2 ajustado y el valor del R^2 predictivo tiene valores de 96.71% y 94.24% respectivamente.

Nos permite concluir que existe un buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo calculado por el software MINITAB, de esta manera podemos tener confianza en su capacidad predictiva.

- ✓ La validez del modelo es representada en el valor P igual a 0.002 corresponde a la tabla de Análisis de varianza (TABLA 17) ANOVA
El valor “R” del modelo 0,9671 indica una correlación significativa entre los factores y la respuesta. El modelo es útil para realizar predicciones, a un nivel de significancia es 0.05.
- ✓ Hipótesis General:
De acuerdo al modelo obtenido y el diagrama de Pareto que muestra en la figura 14 la variable de tiempo de secado, ha sido la más significativa, seguido del tiempo de centrifugación y finalmente la concentración de agente encapsulante.

6.2. Contrastación de los resultados con otros estudios similares.

Al revisar la información, se pudo verificar que los parámetros usados en otras tesis, fueron de gran ayuda ya que permitió tener un mayor análisis de las variables.

- En la tesis de Kure y Yugcha, acondicionaron las muestras con agente encapsulante (goma arábiga) a una concentración de 25% P/V, parámetro que tomamos de referencia para realizar variaciones en nuestra investigación de 10% P/V (10/90) y 30% (30/70), los autores en su investigación, variando temperatura de secado, obtuvieron una actividad proteolítica de 672.92 ± 32.54 TU/mg, mientras que en la nuestra se obtuvo una actividad proteolítica de 868.36 TU/mg.
- En la tesis de Arana y Quijano, comparan la papaína cruda obtenida de diferentes variedades de papaya como maradol, criolla y Golden donde la

variedad criolla es la de mayor rendimiento con 2.036 ± 0.69 g de látex/ kg fruta lo cual tomamos como referencia para escoger la variedad criolla en nuestra investigación con el objetivo de obtener una alta actividad proteolítica, Arana y Quijano en su investigación, usaron el secado por aspersion, en la cual obtuvieron una actividad proteolítica de 531.30 ± 27.3 TU/mg.

En la tabla 19 mostramos la contrastación de los parámetros usados en las investigaciones descritas líneas arriba, como primer ítem se encuentra la tesis de nuestra autoría siguiendo con las otras investigaciones.

Tabla 19*Contrastación de resultados con trabajos anteriores*

TESIS	AUTORES	PARÁMETROS USADOS						
		T° SECADO	TIEMPO DE SECADO	MÉTODO DE SECADO	TIEMPO DE CENTRIFUGADO	CONCENTRACIÓN AGENTE	AGENTE ENCAPSULANTE	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA OBTENIDA
“Determinación de las variables óptimas para la obtención de la papaína cruda a partir del látex de papaya (carica papaya l.)”	VITE Y PÉREZ (2021)	60 °C	4 horas	Secado por estufa	50 min	10/90 W/V (agente/muestra)	Goma arábica	838.36 TU/mg
“Extracción, caracterización y comparación de látex obtenido, en secado por aspersión de tres variedades de papaya (carica papaya l.)”	ARANA Y QUIJANO (2012)	130 °C (entrada aire) 30 °C (entrada de muestra)	No se indica	Secado por aspersión	60 min	25/75 W/V (agente/muestra)	Goma arábica	531.30 ± 27.3 TU/mg
“Estudio del proceso de secado del látex de papaya (carica papaya l.) deshidratado por aspersión”	KURE Y YUGCHA (2012)	120 °C (entrada aire)		Secado por aspersión	No indica	25/75 W/V (agente/muestra)	Goma arábica	672.92 ± 32.54 TU7mg

6.3. Responsabilidad de ética de acuerdo a los reglamentos vigentes.

A efectos de cumplir con los criterios de evaluación de la experiencia curricular de desarrollo de tesis, nosotras Bach. Jaquelyne Pérez Díaz y Bach. Alicia Milagros Vite Codarlupo, nos responsabilizamos por la información emitida en el presente informe final de investigación, de acuerdo al Código de Ética de la Investigación de la UNAC, emitido en la resolución de Consejo Universitario N° 260-2019-CU.

CONCLUSIONES

- ✓ Las variables óptimas para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya son: tiempo de centrifugado, concentración del agente encapsulante y tiempo de secado, las cuales mediante tratamiento de datos en el programa MINITAB se demostró que, si son significativas para el proceso, obteniendo una actividad proteolítica de 868.36TU/mg.
- ✓ En la etapa de centrifugación del látex, el tiempo de centrifugado óptimo es cercano a 50mín para la separación del líquido sobrenadante del látex.
- ✓ En la etapa de micro encapsulación, la concentración del agente encapsulante óptimo es cercano al valor de 10/90 W/V (2.11 g agente) para la obtención de la papaína.
- ✓ En la etapa de secado, el tiempo de secado óptimo es el que se aproxima más al valor de 4horas para la obtención de la papaína.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda no exponer el látex a los rayos solares, ya que podría oxidarse y perdería sus propiedades fundamentales para obtener una papaína con alta actividad proteolítica.
- ✓ Se propone realizar un estudio utilizando el secado por liofilización de la enzima, para la obtención de papaína refinada, en un rango más reducido a las variables optimas obtenidas, para la comparación de la actividad proteolítica.
- ✓ Realizar un estudio para la implementación de una planta piloto de procesadora de papaína cruda, con fin de lograr la producción a escala comercial ahorrando divisas y la generación de puestos de trabajos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, E. y Castillo, P. (2000) Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto toronche (*carica stipulata*) y de la papaya (*carica papaya*) y su aplicación en la industria alimenticia. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del litoral.

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/7532/1/Extraccion%20y%20Estudio%20Comparativo%20de%20las%20Enzimas%20Proteol%C3%ADticas.pdf>

Altamirano, M. (2019) Efecto in vitro del gel de papaína e hipoclorito de sodio sobre la fuerza de adhesión de brackets metálicos cementados en esmalte dental humano. Trujillo. Universidad Católica de los Ángeles Chimbote.

<http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/18633>

Arana, P. y Quijano, M. (2012) Extracción, caracterización y comparación de látex obtenido, en secado por aspersion, de tres variedades de papaya (*Carica papaya* L.). Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del litoral.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31016>

Ayala, A. (2018) Efecto de la velocidad y tiempo de centrifugación en los sólidos solubles de zumo de naranja valencia (*citrus sinensis*) crioconcentrado. Huancayo: Universidad Nacional del centro del Perú.

<http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/4367>

Cornish, B. (1995) Análisis de datos cinéticos enzimáticos. Reino Unido: Oxford University Press.

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0307-4412\(95\)90181-7](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0307-4412(95)90181-7)

Chaiwut, P. y Kanasawud, P. (2007) Síntesis de péptidos de sólido mediante glicil endopeptidasa. Tecnología enzimática y microbiana.

<https://www.sciencedirect.com/>

Chauca, Z. (2018) Mejoramiento de la textura de la carne de vacuno con el uso de la enzima proteolítica (Papaína). Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina.

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3682>

Chavéz, J. (2018) Efecto del látex de papaya a diferentes concentraciones en el reblandecimiento del cálculo supragingival de pacientes de la consulta privada. Arequipa. Universidad Católica de Santa María.

<http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/7676>

Cuchupoma, L. y Orozco, A. (2020) Efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*). Lambayeque. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

<http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/8957>

Fernández, J. (2005) Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región. Chile. Universidad de Talca.

<http://dspace.otalca.cl/retrieve/2978/JFernandezD.pdf>

García, B. (2019) Evaluación del contenido de papaína, determinación del sexo y metodología para la propagación in vitro de tres especies de carica. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca.

<http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/3370>

García, V. y Roldan, E. (2005) Ensayo de actividad de la enzima papaína inmovilizada y su aplicación en aguas residuales de la industria alimenticia. San Salvador: Universidad de El Salvador.

<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5208>

Garzón, M. y Bedoya, V. y Millán, L.J. y Benavides, Y. (2012) Papaína extraída a partir de la cáscara de la papayuela perteneciente a la especie (carica papaya L), por medio de microondas con aplicación en el ablandamiento de la carne bovina”: Artículo Journal of Engineering and Technology; Volumen 1(1)

<http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jet/article/view/200>

Guevara, L.I. (2006) Estudio sobre la extracción y la falta de uso de la papaína obtenida de la papaya (carica papaya L.) para ser usada en el ablandamiento de carne. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3368>

Herrera, E. y Ruiz, L. (2014) Efecto del tiempo de congelación y temperatura de liofilizado de látex del fruto papayita de monte (*Carica Pubescens*) sobre su actividad proteolítica en leche de vaca. Chachapoyas: Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

<http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/553>

Kimmel, R. y Smith, G. (1954) Papaína cristalina: I Preparación, especificidad y activación. Utah: Universidad de Utah.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818656698>

Kure, J.L. y Yugcha, A. (2012) Estudio del proceso de secado del látex de papaya (carica papaya L.), deshidratado por aspersion. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del litoral.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/31152/D-79689.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

León, J. (2015) "Perú producirá 480 mil toneladas de papaya este año". Agencia agraria de noticias, AGRARIA.pe

<https://agraria.pe/noticias/peru-produciria-480-mil-toneladas-de-papaya-este-ano-8048#:~:text=%C3%97>

[,PER%C3%9A%20PRODUCIR%C3%8DA%20480%20MIL%20TONELADAS%20DE%20PAPAYA%20ESTE%20A%C3%91O,frutales%20y%20consultor%20agrario%2C%20Ing.](https://agraria.pe/noticias/peru-produciria-480-mil-toneladas-de-papaya-este-ano-8048#:~:text=%C3%97)

Mejía, R. y Vega, C. (2010) Medición de la actividad proteolítica de la enzima papaína natural extraída del látex de papayo (carica papaya) e inmovilizada en el gel de agar. San Salvador: Universidad de El Salvador.

<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2516>

Mercado, A. (2017). Centrifugación. Arequipa: Universidad Nacional de Arequipa.

<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4190>

Minera Chañar Blanco S.A (1997) Escalamiento a nivel planta piloto del proceso de obtención de Papaína. La Serena: FONTEC.

<https://www.opia.cl/601/w3-article-6406.html>

Pintado, V. y Salvatierra, L. (2012) Efecto de la concentración de papaína sobre la dureza de la carne de alpaca (vicugna pacos). Lambayeque. Universidad Señor de Sipán.

<https://hdl.handle.net/20.500.12802/1804>

Porras, F. (2012) Microencapsulación de pulpa de carambola (Averrhoa carambola L.) mediante secado por liofilización. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva.

<http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/320>

Quino, J. y Bernal, N. y Yácono, J.C. (2011) Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada. Red de Revistas Científicas de

América Latina, el Caribe, España y Portugal. Universidad de Lima. Lima
Perú.

www.redalyc.org/articulo.oa?id=337428492011

Real Academia Española. (2019). Diccionario de la lengua española (23a ed.)

<https://www.casadellibro.com/libro-diccionario-de-la-lengua-espanola-23-ed/9788467041897/2347353>

Rodríguez, A. (2019) Inmovilización enzimática de papaína en soporte esferular de Quitosano y determinación comparativa de su actividad enzimática sobre la caseína. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

<https://hdl.handle.net/20.500.12672/10824>

Villavicencio, M. (2011) Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya (carica papaya). Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

<http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/5226>

ANEXOS

ANEXO A. Matriz de Consistencia

DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA PAPAÍNA CRUDA A PARTIR DEL LÁTEX DE PAPAÑA (<i>Carica papaya L.</i>)						
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	MÉTODO	DIMENSIONES
<p>General</p> <p>¿Cuáles son las variables óptimas para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya?</p>	<p>General</p> <p>Determinar las variables óptimas del proceso para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya.</p>	<p>General</p> <p>Las variables óptimas para la obtención de la papaína a partir del látex de papaya son tiempo de centrifugado, concentración del agente encapsulante y tiempo de secado; las cuales son significativas para el proceso.</p>	<p>Dependiente</p> <p>Obtención de papaína cruda a partir del látex de papaya.</p>	<p>Y1: Efectividad de la papaína (Unidades de Tirosina TU)</p>	<p>Método analítico de la unidad de Tirosina (TU)</p>	<p>TU/mg</p>
<p>Específico</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el tiempo de centrifugado óptimo para el látex? • ¿Cuál es la concentración del agente encapsulante óptimo para la obtención de la papaína? • ¿Cuál sería el tiempo de secado adecuado para la obtención de papaína cruda? 	<p>Específico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el tiempo de centrifugado óptimo para el látex. • Determinar la concentración del agente encapsulante óptimo para la obtención de papaína. • Determinar el tiempo de secado adecuado para la obtención de papaína cruda. 	<p>Específico</p> <ul style="list-style-type: none"> • El tiempo de centrifugado óptimo varía entre (50 - 70) min para la separación del líquido sobrenadante del látex. • La concentración del agente encapsulante óptimo varía entre (10/90, 30/70) p/v para la obtención de la papaína. • El tiempo de secado óptimo varía entre (3-4) horas para la obtención de la papaína. 	<p>Independiente</p> <ul style="list-style-type: none"> * Tiempo de centrifugación del látex. * Concentración del agente encapsulante (goma arábica). * Tiempo de secado 	<p>X1: Tiempo</p> <p>X2: Concentración</p> <p>X3: Tiempo</p>	<p>-Cronómetro</p> <p>-Relación W/V</p> <p>-Cronómetro</p>	<p>Minutos</p> <p>W/V</p> <p>Horas</p>

ANEXO B. Método analítico de la unidad de tirosina (TU)

MÉTODO ANALÍTICO DE LA UNIDAD DE TIROSINA (TU)

Para efectos de mejor comprensión se ha considerado realizar una división de las diferentes etapas, las cuales corresponden a las siguientes: Preparación de los reactivos y ejecución del análisis:

I. Preparación de reactivos:

1.1. Sustrato de caseína

- 1) Añadir aproximadamente 800ml de agua en un vaso de 2000ml y hervir en una placa con agitación magnética.
- 2) En un vaso precipitado colocar 1.775 g de fosfato disódico anhídrido con 100ml de agua destilada y agitar hasta disolver, luego trasvasar a un matraz aforado de 250 ml disolver y enrazar en agua destilada.
- 3) En un vaso de precipitado de 400 ml. Agregar 2.5 g de caseína Sigma aldrich en 125 ml de la solución de fosfato disódico previamente preparada. Usar una barra agitadora y un mezclador.
- 4) Cubrir la solución con papel aluminio.
- 5) Colocar el sustrato de caseína en un baño de agua hirviendo y agitar de manera constante por 30 minutos. Asegurarse que el agua no alcance el borde del vaso. Procurar colocar la cantidad suficiente de agua para que el vaso este estable y no derrame su contenido.

- 6) Quitar el vaso de precipitado del agua hirviendo y enfriar a temperatura ambiente en un baño de agua fría con agitación constante.
- 7) En un vaso precipitado disolver 1.05 g de ácido cítrico monohidratado en 50ml de agua destilada transferir a un matraz aforado de 100 ml y enrazar en agua destilada.
- 8) Ajustar el pH de la solución de caseína (el pH original debe ser cerca de 7.2) a 6.0 con la solución de ácido cítrico, agregándolo lentamente para evitar la destrucción de las proteínas (usar aproximadamente 35 ml de ácido).
- 9) Transferir la caseína a un matraz aforado de 250 ml y enrazar con agua destilada.

1.2. Solución búfer de Cisteína-Versene:

El siguiente procedimiento muestra el método de preparación para dos litros de búfer, volumen que variará según las cantidades a utilizar.

- 1) Colocar en un agitador magnético un vaso de precipitado de 1000 ml o más.
- 2) Añadir aproximadamente 400 ml de agua destilada.
- 3) Agregar cuantitativamente: 3,55 g de fosfato de sodio dibásico anhídrido 3,05 g de L-cisteína 7,00 g de EDTA.
- 4) Agitar todos los ingredientes hasta disolverlos.
- 5) Ajustar el pH del búfer a 6.0 con ácido cítrico monohidratado previamente preparado.

- 6) Transferir el búfer a un matraz aforado de 500 ml y enrazar en agua destilada.
- 7) Repetir el procedimiento anterior si necesita más búfer.

1.3. Solución de terminación (TCA): Ácido tricloroacético (30%)

Se requieren 18 ml para cada muestra.

- 1) Disolver 30 g de ácido tricloroacético en un vaso de precipitación en 50 ml agua destilada, agitar y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Diluir en más agua.

II. Análisis de la actividad enzimática

2.1. Preparación de la enzima

- 1) Disolver una cantidad apropiada de la enzima en la solución búfer de Cisteína-Versene.
- 2) Usar el mismo búfer si requiere diluciones seriadas. La enzima diluida debe ser usada en un lapso de 30 minutos.
- 3) La concentración de la dilución final deberá corresponder a una absorbancia de aproximadamente 0.2600 y a una concentración de entre 2.5 y 6.5 TU/ml (se recomienda utilizar concentraciones del orden de 0.0005g/ml de búfer para realizar el análisis de papaína).
- 4) Cálculo para la preparación de la enzima: La Ec. 1 nos indica como calcular la cantidad de enzima en gramos.

$$\text{Peso de la muestra (g)} = \frac{0.2600 \times \text{curva de tirosina}}{\text{TU/g (objetivo)}} \dots \text{EC.1}$$

2.2. Evaluación de la enzima:

Cada juego de pruebas consiste de 2 pruebas de enzimas y un blanco.

Proceda de la siguiente forma:

- 1) Transferir 10.0 ml del sustrato de caseína en 3 tubos de 25 ml etiquetados, dos para cada enzima y uno para el blanco.
- 2) Equilibrar los tubos a 40° C por aproximadamente 10 minutos.
- 3) Al tiempo cero iniciar el cronómetro y añadir 4.0 ml de la solución de la enzima al primer tubo. Cerrar el tubo e invertir suavemente varias veces. Poner el tubo en un baño de agua a 40° C. Continuar la adición de la enzima a cada tubo, excepto al blanco, a intervalos suficientes (se recomienda 1 minuto).
- 4) Después de exactamente 60 minutos añadir rápidamente a cada tubo con la preparación de la enzima 6.0 ml de la solución TCA. Agitar vigorosamente y regresar los tubos al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
- 5) Para preparar el blanco añadir 6.0 ml de solución TCA al sustrato de caseína seguido por 4.0 ml de enzima. Agitar vigorosamente y regresar el tubo al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
- 6) Al final de los 30 minutos remover cada tubo del baño de agua y permitir que se enfríen a temperatura ambiente.
- 7) Una vez fríos filtrar a través de papel filtro Whatman #1 o equivalente (los tubos pueden ser agitados antes de filtrarlos para despegar la proteína precipitada). Filtrar de nuevo a través del mismo papel filtro.

- 8) Leer la absorbancia de los filtrados en una cubeta de 1 cm a 280 nm usando aire para iniciar el espectrofotómetro en cero. Corregir el valor de A280 de cada enzima sustrayendo la lectura del blanco de cada muestra.

2.3. La curva de tirosina

- 1) Disolver 100 mg de L-tirosina en ácido clorhídrico 0.10 N (HCL) luego ahí que diluir a 1 L en un matraz aforado.
- 2) Preparar las siguientes soluciones usando HCl 0.10N como diluyente. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de tirosina para preparar las soluciones a diferentes concentraciones:

Concentración Final ($\mu\text{g/ml}$)	Dilución de la Solución Madre de Tirosina (ml/ml)
25	25/100
50	50/100
75	75/100

- 3) Determinar espectrofotométricamente a 280 nm en una cubeta de 1cm la absorbancia de las soluciones de tirosina a 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0 μg de tirosina por ml. Use HCl 0.1N para iniciar el instrumento en cero.
- 4) Graficar la absorbancia contra la concentración de tirosina.
- 5) Determinar la pendiente en términos de absorbancia por μg de tirosina (la pendiente debe caer entre 0.0064 y 0.0076).

2.4. Cálculos

Definición de unidad: Una unidad de potencia puede ser definida como la unidad que al actuar sobre el sustrato de caseína bajo las

condiciones específicas produce un microgramo de tirosina por minuto. El número de TU/g en una mezcla de digestión o contenida en la cantidad preparada de enzima se calcula como se indica en la Ec.2:

$$\frac{TU}{mg} = O.D \times \frac{D.F}{4} \times \frac{20}{60} \times \frac{1}{pendiente} \dots \quad Ec. 2$$

$$D.F = \frac{1}{Concentración\ final\ de\ la\ enzima\ (mg/ml)} \dots \quad Ec. 3$$

Donde:

- ✓ O.D. = Densidad óptica de la prueba menos la densidad óptica del blanco
- ✓ D.F. = Factor de dilución de la solución de enzima (1/concentración final de la enzima)
- ✓ 4 = Volumen de la solución de enzima inyectada
- ✓ 20 = Volumen total del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA)
- ✓ 60 = Duración de la hidrólisis en minutos
- ✓ Pendiente = Pendiente obtenida de la curva de tirosina (ver la curva de tirosina).

El número de TU por gramo de una preparación de enzima es la actividad TU de la preparación.

Por lo tanto:

$$Actividad\ UT = \frac{Absorbancia \times factor\ de\ la\ curva\ de\ tirosina}{Concentración\ final\ de\ la\ enzima\ (mg/ml)} \quad Ec \dots 4$$

2.5. Exactitud de los parámetros de prueba:

Rango: Las lecturas de absorbancia después de la corrección con el blanco deben ser de entre 0.150 y 0.700 y pueden usarse para encontrar la actividad aproximada de muestras desconocidas. Sin embargo, la prueba final debe caer dentro del rango de 0.200 a 0.500. Pruebas duplicadas a diferentes niveles de enzimas no deberán variar por más del 3%.

ANEXOC. Equipos de laboratorio utilizados

Figura 22

Equipo de centrifugación JANETZKI T25



Figura 23

Estufa marca MEMMER UF260



Figura 24

Baño termostático marca LAUDA AQUALINE AL 25



Figura 25

Balanza analítica de precisión marca SARTORIUS



Figura 26

Agitador magnético auto mixer, marca FISHERSCIENTIFIC



Figura 27

Potenciómetro, marca ORION



Figura 28

Espectrofotómetro UV, marca ORIÓN AQUAMATE



ANEXOD. Evidencia fotográfica de la experimentación

Figura 29

Lavado de materia prima



Figura 30

Exudado y recolección de látex

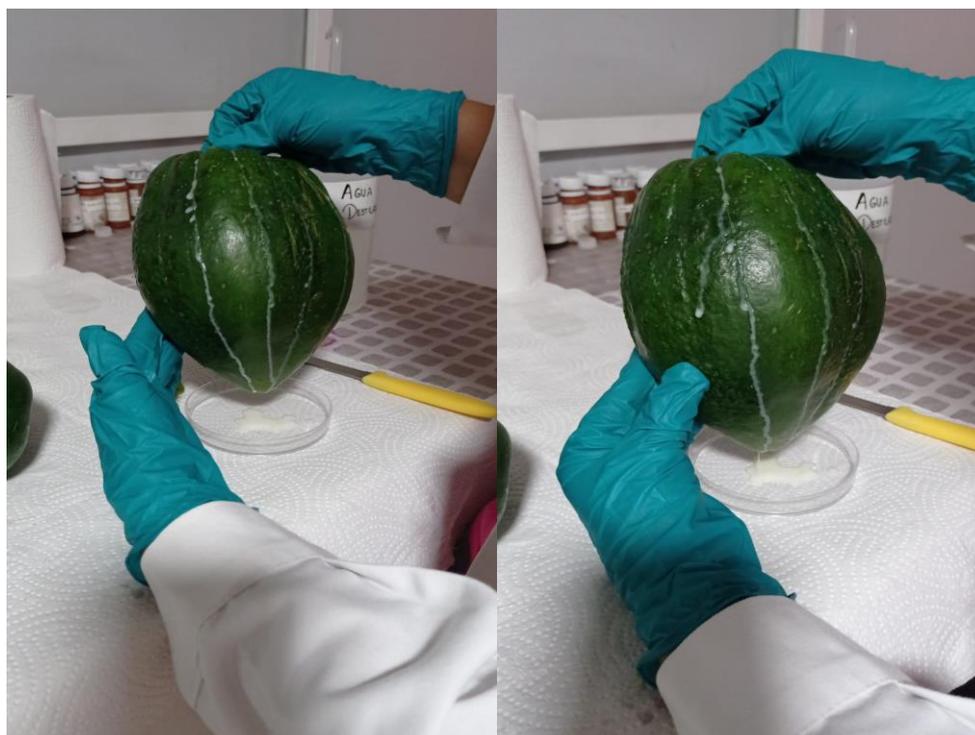


Figura 31

Solución de látex acondicionada



Figura 32

Muestras acondicionadas con agente micro encapsulante

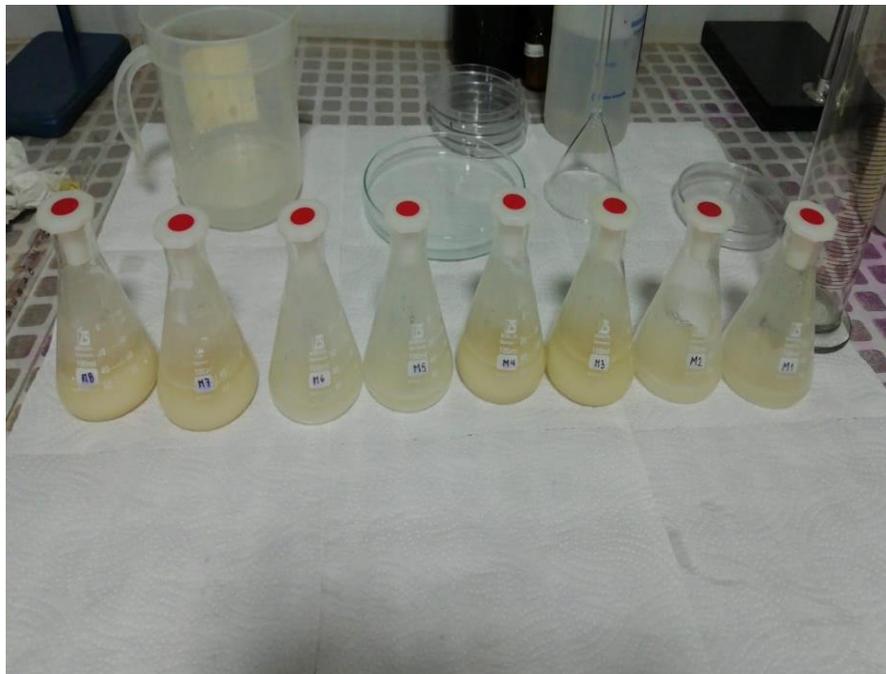


Figura 33

Centrifugación de muestras



Figura 34

Muestras listas para ingresar a la estufa en la etapa de secado



Figura 35

Muestras para lecturas de absorbancia

