



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

**“Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, obtenida de la papaya (*Carica papaya*), medida en soluciones proteínicas”**

---

Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Seminario de Graduación. Presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**AUTOR:** Cristina Lorena Chimborazo López

**TUTOR:** Ing. Juan de Dios Alvarado. M. Sc

**Ambato – Ecuador**

**2012**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: **“Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, obtenida de la papaya (*Carica papaya*), medida en soluciones proteínicas”**, de la estudiante: Cristina Lorena Chimborazo López alumna de la Carrera de Ingeniería Bioquímica considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado.

Ambato, Septiembre 2012

EL TUTOR

.....

Ing. Juan de Dios Alvarado. M. Sc

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación “**Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, obtenida de la papaya (*Carica papaya*), medida en soluciones proteínicas**”, corresponden exclusivamente a mi persona como ejecutora de este trabajo de investigación.

Ambato, Septiembre 2012

EL AUTOR

.....  
Cristina Lorena Chimborazo López

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **“Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, obtenida de la papaya (*Carica papaya*), medida en soluciones proteínicas”**, de la estudiante: Cristina Lorena Chimborazo López.

Ambato, Septiembre 2012

Para constancia firman:

.....  
Ing. Luis Anda  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....  
Ing. Juan Ramos  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....  
Ing. MBA Romel Rivera  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado primeramente a Dios por ser aquel que guía mi camino en cada momento y me colma de bendiciones.

A mis padres por brindarme su apoyo incondicional y sus sabios consejos, y a mi hermano por alentarme siempre en la realización del proyecto.

A toda mi familia que siempre me han ayudado a seguir para cumplir con mis metas y no decaer.

## **AGRADECIMIENTO**

A los Docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos mi agradecimiento por brindarnos sus saberes de una manera desinteresada y permitirnos enriquecer nuestro conocimiento.

Mi más sincero agradecimiento al Ing. Juan De Dios Alvarado M. Sc, por confiarme el desarrollo del tema, por su orientación y colaboración en la ejecución del proyecto.

A mis amigos incondicionales que me han acompañado en el trayecto de mi vida estudiantil.

# ÍNDICE

## PÁGINAS PRELIMINARES

Tema:.....	i
Aprobación del tutor.....	ii
Autoría.....	iii
Aprobación del tribunal de grado.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice.....	vii
Índice de Tablas y Figuras.....	xii
Resumen.....	xvii

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	2
<b>EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	2
1.1 Tema de Investigación.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.2.1 Contextualización.....	3
1.2.1.1 Macro.....	3
1.2.1.2 Meso.....	4
1.2.1.3 Micro.....	5
1.2.2 Análisis Crítico.....	6
1.2.2.1 Árbol de Problemas.....	7
1.2.3 Prognosis.....	8
1.2.4 Formulación del Problema.....	8

1.2.5	Preguntas Directrices .....	9
1.2.6	Delimitación .....	9
1.3	Justificación .....	9
1.4	Objetivos .....	11
1.4.1	General.....	11
1.4.2	Específicos.....	11
<b>CAPÍTULO II</b>	.....	<b>12</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	.....	<b>12</b>
2.1	Antecedentes Investigativos .....	12
2.2	Fundamentación Filosófica .....	20
2.3	Fundamentación Legal.....	20
2.4	Categorías Fundamentales.....	22
2.4.1	Marco Teórico de la Variable Independiente .....	23
2.4.2	Marco Teórico de la Variable Dependiente.....	29
2.5	Hipótesis .....	33
2.5.1	Hipótesis Nula .....	33
2.5.2	Hipótesis Alternativa.....	33
2.6	Señalamiento de Variables .....	33
<b>CAPITULO III</b>	.....	<b>34</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	.....	<b>34</b>
3.1	Enfoque.....	34
3.2	Modalidad Básica de la Investigación .....	34
3.3	Nivel o Tipo de Investigación .....	35
3.4	Población y Muestra.....	36
3.4.1	Población.....	36
3.4.2	Muestra.....	36
3.5	Operacionalización de las Variables .....	37
3.6	Recolección de la Información .....	38
3.6.1	Materiales y Métodos .....	38
3.6.1.1	Fraccionamiento de la muestra.....	38



3.6.1.2	Fase de extracción usando un solvente orgánico y una solución salina .....	38
3.6.1.2.1	Proceso de concentración .....	39
3.6.1.3	Método para cuantificar la actividad enzimática.....	39
3.6.1.3.1	Cálculo de la constante del viscosímetro de Cannon – Fenske .....	39
3.6.1.3.2	Medición de la densidad de los sustratos .....	40
3.6.1.3.3	Determinación de viscosidad en leche con concentrado proteínico .....	41
3.6.1.3.4	Proceso para determinación de viscosidad en carne con concentrado proteínico.....	42
3.6.2	Factores en Estudio.....	44
3.6.3	Diseño Experimental .....	44
3.6.3.1	Diseño Factorial 2 <sup>n</sup> .....	44
3.6.3.1.1	Tratamientos.....	45
3.6.3.1.2	Número de repeticiones.....	45
3.6.3.1.3	Total de unidades experimentales .....	45
3.6.3.1.2	Diseño de bloques completos .....	45
3.6.3.1.2.1	Tratamientos .....	45
3.6.3.1.2.2	Número de repeticiones .....	46
3.6.3.1.2.3	Total de unidades experimentales.....	46
3.6.4	Tipos de análisis estadísticos .....	46
3.6.5	Parámetros y criterios de evaluación.....	46
3.7	Procesamiento y Análisis .....	46
	<b>CAPITULO IV</b> .....	47
	<b>ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	47
4.1	Análisis de los Resultados .....	47
4.1.2	Caracterización del concentrado proteínico en polvo .....	47
4.1.3	Determinación de la viscosidad .....	47
4.1.3.1	Constante (k) del viscosímetro Cannon – Fenske. ....	47
4.1.3.2	Densidad de leche y jugo de carne .....	48

4.1.3.3	Viscosidad de leche y jugo de carne.....	48
4.1.3.3.1	Sin adición del concentrado enzimático.....	48
4.1.3.3.2	Con concentrado proteínico que contiene papaína extraído con etanol y NaCl.....	48
4.1.3.3.3	Con enzima papaína comercial .....	49
4.1.4	Cuantificación de la Actividad Enzimática .....	49
4.2	Interpretación de Datos.....	51
4.2.1	Materia Prima .....	51
4.2.2	Extracción de las muestras con etanol y NaCl .....	51
4.2.2.1	Concentrado proteínico en polvo .....	52
4.2.3	Viscosidad .....	52
4.2.3.2	Densidad de leche y jugo de carne .....	53
4.2.3.3	Viscosidad de leche y jugo de carne.....	53
4.2.3.3.1	Sin adición del concentrado enzimático.....	53
4.2.3.3.2	Con concentrado proteínico que contiene papaína extraído con etanol y NaCl.....	54
4.2.3.3.3	Con enzima papaína grado reactivo .....	55
4.2.4	Actividad Enzimática .....	56
4.3	Verificación de la Hipótesis .....	59
	<b>CAPITULO V</b> .....	60
	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	60
5.1	Conclusiones.....	60
5.2	Recomendaciones .....	62
	<b>CAPITULO VI</b> .....	64
	<b>PROPUESTA</b> .....	64
6.1	Datos Informativos .....	64
6.2	Antecedentes de la propuesta .....	64
6.3	Justificación .....	65
6.4	Objetivos .....	66
6.5	Análisis de Factibilidad.....	67
6.6	Fundamentación .....	68

6.7	Metodología .....	70
6.8	Administración.....	70
6.9	Previsión de la Evaluación.....	72
	<b>MATERIALES DE REFERENCIA .....</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Costos de la propuesta de investigación.....	67
<b>Tabla 2.</b>	Modelo Operativo (Plan de acción). ....	70
<b>Tabla 3.</b>	Administración de la propuesta. ....	71
<b>Tabla 4.</b>	Previsión de la Evaluación.....	72

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Árbol de Problemas.....	7
<b>Figura 2.</b>	Niveles estructurales de una proteína.....	24
<b>Figura 3.</b>	Estructura de la enzima papaína con un residuo de cisteína e histidina .....	27
<b>Figura 4.</b>	Esquema complejo enzima – sustrato.....	30
<b>Figura 5.</b>	Representación del centro activo de la enzima.....	31

### ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ec. 1:</b>	Fórmula para determinar el % de humedad.....	39
<b>Ec. 2:</b>	Fórmula para determinar el % de Materia seca.....	39
<b>Ec. 3:</b>	Constante del viscosímetro de Cannon – Fenske.....	40
<b>Ec. 4:</b>	Cálculo de densidad.....	41
<b>Ec. 5:</b>	Determinación de viscosidad.....	43

## ANEXOS

### ANEXO A. TABLA DE RESULTADOS

- Tabla A-1.** Caracterización del concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante Etanol y NaCl.
- Tabla A-2.** Constante  $k$  para la medida de viscosidad en los viscosímetros de Cannon - Fenske.
- Tabla A-3.** Densidad y viscosidad para ambos sustratos a la temperatura de experimentación.
- Tabla A-4.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante etanol.
- Tabla A-5.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante NaCl.
- Tabla A-6.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante etanol.
- Tabla A-7.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante NaCl.
- Tabla A-8.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con enzima papaína grado reactivo adquirida.
- Tabla A-9.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con enzima papaína grado reactivo adquirida.

### ANEXO B. GRÁFICAS

- Gráfico B-1.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante etanol en leche, con la correspondiente regresión lineal.

- Gráfico B-2.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante NaCl en leche, con la correspondiente regresión lineal.
- Gráfico B-3.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante etanol en jugo de carne, con la correspondiente regresión lineal.
- Gráfico B-4.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante NaCl en jugo de carne, con la correspondiente regresión lineal.
- Gráfico B-5.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de enzima papaína grado reactivo en leche, con la correspondiente regresión lineal.
- Gráfico B-6.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de enzima papaína grado reactivo en jugo de carne con la correspondiente regresión lineal.
- Gráfico B-7.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante etanol en leche, con la correspondiente regresión polinómica.
- Gráfico B-8.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante NaCl en leche, con la correspondiente regresión polinómica.
- Gráfico B-9.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante etanol en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.
- Gráfico B-10.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante NaCl en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.

**Gráfico B-11.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de enzima papaína grado reactivo en leche, con la correspondiente regresión polinómica.

**Gráfico B-12.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de enzima papaína grado reactivo en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.

## **ANEXO C. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Tabla C-1.** Valores de actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo para cada sustrato con la solución extractora.

**Tabla C-2.** Valores de actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo para cada sustrato con enzima papaína grado reactivo adquirida.

**Tabla C-3.** Optimización del diseño factorial  $2^2$ .

**Tabla C-4.** Cuadro de análisis de varianza para el diseño  $2^2$ .

**Tabla C-5.** Análisis de varianza para el diseño de bloques para ambos testigos.

**Tabla C-6.** Prueba de comparación múltiple Tukey al 5 %.

**Tabla C-7.** Cuadro de análisis de varianza para el diseño de bloques corregido.

**Gráfico C-1.** Factores utilizados para la determinación de la actividad enzimática.

**Gráfico C-2.** Respuesta de superficie para ambos factores.

**Gráfico C-3.** Prueba de Tukey para los diferentes tratamientos.

## **ANEXO D. FOTOGRAFÍAS**

**Fotografía D-1.** Materia Prima: Papayas Verdes.

**Fotografía D-2.** Trituración en el extractor.

- Fotografía D-3.** Muestra filtrada.
- Fotografía D-4.** Extracción con etanol al 96% y NaCl al 10%.
- Fotografía D-5.** Refrigeración a -10°C por 7 días.
- Fotografía D-6.** Proceso de centrifugación a 4500 rpm durante 20 min.
- Fotografía D-7.** Muestras precipitadas.
- Fotografía D-8.** Secado a 40 °C por 48 horas.
- Fotografía D-9.** Papaína extraída con etanol - Almacenado a 5 °C.
- Fotografía D-10.** Papaína extraída mediante NaCl - Almacenado a 5 °C.
- Fotografía D-11.** Preparación del baño termostático a 20° C.
- Fotografía D-12.** Medición del peso de leche en polvo.
- Fotografía D-13.** Preparación de la solución de leche en polvo.
- Fotografía D-14.** Medición de densidad de la leche en el densímetro.
- Fotografía D-15.** Medición de la densidad del líquido de la carne en el densímetro.
- Fotografía D-16.** Solución de leche y concentrado proteínico en vinagre.
- Fotografía D-17.** Baño crioscópico a -5° C.
- Fotografía D-18.** Determinación de viscosidad en leche en el viscosímetro de Cannon – Fenske.
- Fotografía D-19.** Molienda de la carne.
- Fotografía D-20.** Filtración y regulación de la temperatura a 20°C.
- Fotografía D-21.** Determinación de viscosidad en jugo de carne en el viscosímetro de Cannon – Fenske.



## RESUMEN

La Papaya (*Carica papaya*), es un árbol frutal de la familia de *caricaceaes*, cultivado en muchos países tropicales. En Ecuador ésta fruta es cultivada en cantidades considerables, por sus características es usada a nivel industrial.

En el presente trabajo se realizó la obtención del concentrado con papaína a partir de la pulpa de la fruta de papaya (*Carica papaya*); se trabajó con 4 papayas verdes en total y se ejecutó los análisis por duplicado, obteniéndose 8 muestras. Para la obtención del concentrado se efectuó el proceso de extracción utilizando el solvente orgánico etanol y cloruro de sodio por separado. Para el proceso de concentración las muestras se secaron en la estufa a 40°C por 48 horas y el polvo obtenido se almacenó a 5 °C. Para verificar la funcionalidad del concentrado se cuantificó la actividad enzimática en dos sustratos proteínicos, solución de leche en polvo y en jugo de carne.

Se pesó 15,5 g de leche en polvo y se mezcló con 108 ml de agua, por otro lado se disolvió en 100 ml de vinagre 0,1g de concentrado proteínico con papaína obtenido de cada solución extractora, luego se añadió 10 ml de la solución de vinagre en la solución de leche, las muestras se colocaron en un baño crioscópico y se tomó 10 ml de la solución final cada 2 minutos, se procedió a registrar los tiempos de escurrido de las muestras en el viscosímetro de Cannon – Fenske. Para la obtención del jugo de carne, ésta se trituró en un molino y se exprimó en un lienzo, el jugo de carne recolectado se filtró; el concentrado proteínico con papaína obtenido de cada solución previamente disuelto en vinagre se colocó en el líquido de la carne y se siguió el mismo procedimiento anterior para la determinación de la actividad enzimática. Se efectuó un análisis de regresión lineal a las respuestas experimentales y mediante el análisis estadístico se concluyó que el etanol permitió una extracción más eficaz en comparación con el cloruro de sodio, mientras que en el jugo de carne usado como sustrato se obtuvieron los mejores resultados.

La metodología aplicada permitió la obtención de un concentrado con papaína a bajo costo y con un grado aceptable de actividad enzimática.

## INTRODUCCIÓN

Durante cientos de años las plantas han sido fuente importante del suministro de alimentos y de compuestos medicinales e industriales para el bienestar humano. A pesar de los avances en la síntesis química de compuestos orgánicos, las plantas son todavía las mejores fábricas de estos compuestos en el mundo, porque producen una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios y diversos compuestos de interés industrial.

Debido a la importancia que las enzimas han adquirido desde hace ya mucho tiempo y a las múltiples aplicaciones en que pueden ser empleadas, el proceso de purificación de estas se ha convertido en un tema de investigación constante. A través del tiempo los métodos de purificación se han ido perfeccionando tratando de cubrir aspectos importantes en la obtención de las enzimas como la concentración obtenida y el mantenimiento de la actividad enzimática.

Las proteasas más utilizadas en la historia han sido las derivadas de plantas y animales. La mayoría de las enzimas proteolíticas de origen vegetal son de tipo cisteínico, como la papaína utilizadas en numerosas industrias.

Las enzimas son catalizadores de las reacciones químicas en los seres vivos, es decir, son sustancias que sin consumirse en una reacción, incrementan notablemente su velocidad de reacción.

La enzima vegetal de uso más difundido es la papaína la cual presenta gran actividad enzimática así como diferentes aplicaciones principalmente en la industria alimentaria, textil, farmacéutica entre otras.

La importancia actual de las enzimas en la tecnología alimentaría queda de manifiesto por el hecho de que, del volumen del mercado mundial de las enzimas, las dos terceras partes son consumidas para la elaboración y el control de los alimentos.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Tema de Investigación

“Determinación de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína obtenida de la papaya (*Carica papaya*), medida en soluciones proteínicas”.

### 1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad en Ecuador no existen muchas investigaciones sobre enzimas vegetales debido a la falta de recursos tanto humanos como materiales para el desarrollo de proyectos sobre esta temática.

Por el contrario la tecnología enzimática en otros países se encuentra muy avanzada y las investigaciones continúan a pasos acelerados obteniéndose nuevos productos o mejorando los ya existentes. Con esta investigación se trata de obtener un concentrado que contiene la enzima vegetal papaína, mediante una nueva metodología de extracción, que pueda ser evidenciada por la cuantificación de la actividad enzimática del concentrado en dos sustratos proteínicos.

La papaína es una enzima proteolítica utilizada a nivel industrial, son diversos sus usos, tanto así, que en otros países su cultivo se destina exclusivamente para la extracción de la enzima.

Por sus propiedades y funciones se la emplea en la industria alimenticia, farmacéutica, textil, cervecera, en panadería, detergentes, cosmetología entre otras; siendo de esta manera una alternativa biotecnológica que permita la obtención de un concentrado proteínico con la enzima, beneficiando a los sectores industriales con una investigación más profunda permitiendo el desarrollo del país en el área de enzimología.

## **1.2.1 Contextualización**

### **1.2.1.1 Macro**

La biotecnología es un conjunto de poderosas herramientas que utiliza organismos vivos (o parte de estos organismos) para obtener o modificar productos, mejorar especies de plantas y animales o desarrollar microorganismos para determinados usos. La moderna industria biotecnológica se planteó como objetivo el uso de enzimas. Hace siglos que éstas se utilizan, en particular para la producción de alimentos, y representan una de las formas más antiguas de la biotecnología (CAR/PL, 2003).

Los nuevos campos que se están abriendo con los adelantos biotecnológicos, parecen no tener fin a la hora de crear nuevas aplicaciones para toda clase de elementos. Ahora es el turno de la papaya, de la cual se está obteniendo una sustancia conocida como papaína, que se extrae del látex de la papaya verde, se procesa y se comercializa como polvo blanco o grisáceo, que entre otras aplicaciones, puede ablandar la carne, aclarar la cerveza y también se usa en la industria farmacéutica (Fernández J, 2005).

La papaya es originaria de las regiones tropicales de Centroamérica y Sudamérica; aunque actualmente se encuentra distribuida en los trópicos y subtrópicos del mundo (Guananga, 2009).

Según FAOSTAT (2007), citado por Ríos (2010), la papaya es una de las frutas tropicales que se producen a nivel mundial, concentrándose el 68% de la producción total de este fruto en cuatro países principalmente: Brasil, México, Nigeria e Indonesia con 1.8, 0.9, 0.7 y 0.6 millones de toneladas respectivamente, lo que representa el 30% para Brasil, el 15% para México el 13% para Nigeria y el 10% para Indonesia del total mundial.

La papaína presenta un mercado mundial creciente de alrededor de 600 toneladas anuales (100 millones de dólares), cuyo incremento está asociado a nuevas aplicaciones descubiertas en la industria alimenticia, textil, farmacéutica y pesquera (Agrogest, 2009).

Los principales productores de papaína en el mundo son: Zaire, India, Sri Lanka, Taiwán, Uganda y Ghana. Entre los países que la exportan se encuentran Chile, Tanzania, Uganda, el Congo, Sri Lanka, Tailandia y la India; y además Colombia que es un país con muchas expectativas para la producción y exportación de la enzima, por su ubicación geográfica y por la economía que maneja.

Según Todafruta (2001), citado por Valle y Alvarado (2003), indica que los países importadores son: Japón, Bélgica, Francia, Reino Unido, entre otros y los Estados Unidos, estos países importan papaína cruda y la purifican mediante sofisticados procesos de laboratorio, luego reexportan el producto acabado a un precio más alto.

#### **1.2.1.2 Meso**

La papaya es una fruta destinada en particular a satisfacer la demanda interna; sin embargo una parte de la producción se dirige a los mercados internacionales.

La papaya del Ecuador se destinan principalmente a satisfacer la demanda de Alemania con el 31%, seguido por España con el 27%, Holanda 23% y Canadá 16% es decir, básicamente la papaya está siendo exportada a Europa.

En el 2008 la Provincia del Guayas tuvo una producción 320 has actualmente se encuentran sembradas 450 has aproximadamente. En la Provincia de Santa Elena tuvo una producción total de 120 has de las cuales 84 has (70%) fueron destinadas para la exportación y el otro 30% fueron destinadas para el consumo local.

Las principales zonas de cultivo de papaya en Ecuador se encuentran en: Manabí, Guayas, Santa Elena, Santo Domingo, Los Ríos, El Oro, Esmeraldas (Guananga, 2009).

A nivel de Ecuador se han realizado pocas investigaciones sobre la temática entre ellas: “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” (Aguirre y Castillo, 2009).

Estudio sobre “Cuantificación del contenido de papaína y su actividad enzimática en seis especies del género *Vasconcellea*, nativas del sur del Ecuador” (Viñamagua y otros, s.f).

### **1.2.1.3 Micro**

En la provincia de Tungurahua se ha realizado investigación sobre el tema, en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos se efectuó el estudio “Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya” (Villavicencio, 2011).

Se pretende lograr la obtención de un concentrado que contiene papaína (*Carica papaya*) a partir de la pulpa de la fruta, mediante una nueva metodología de extracción y realizar la cuantificación de la actividad enzimática

en los sustratos solución de leche y en el líquido de la carne mediante un método viscosimétrico; con el estudio optar por el título de ingeniera bioquímica y continuar con la investigación sobre enzimas vegetales que pueda aportar resultados válidos para futuras investigaciones.

### **1.2.2 Análisis Crítico**

### 1.2.2.1 Árbol de Problemas

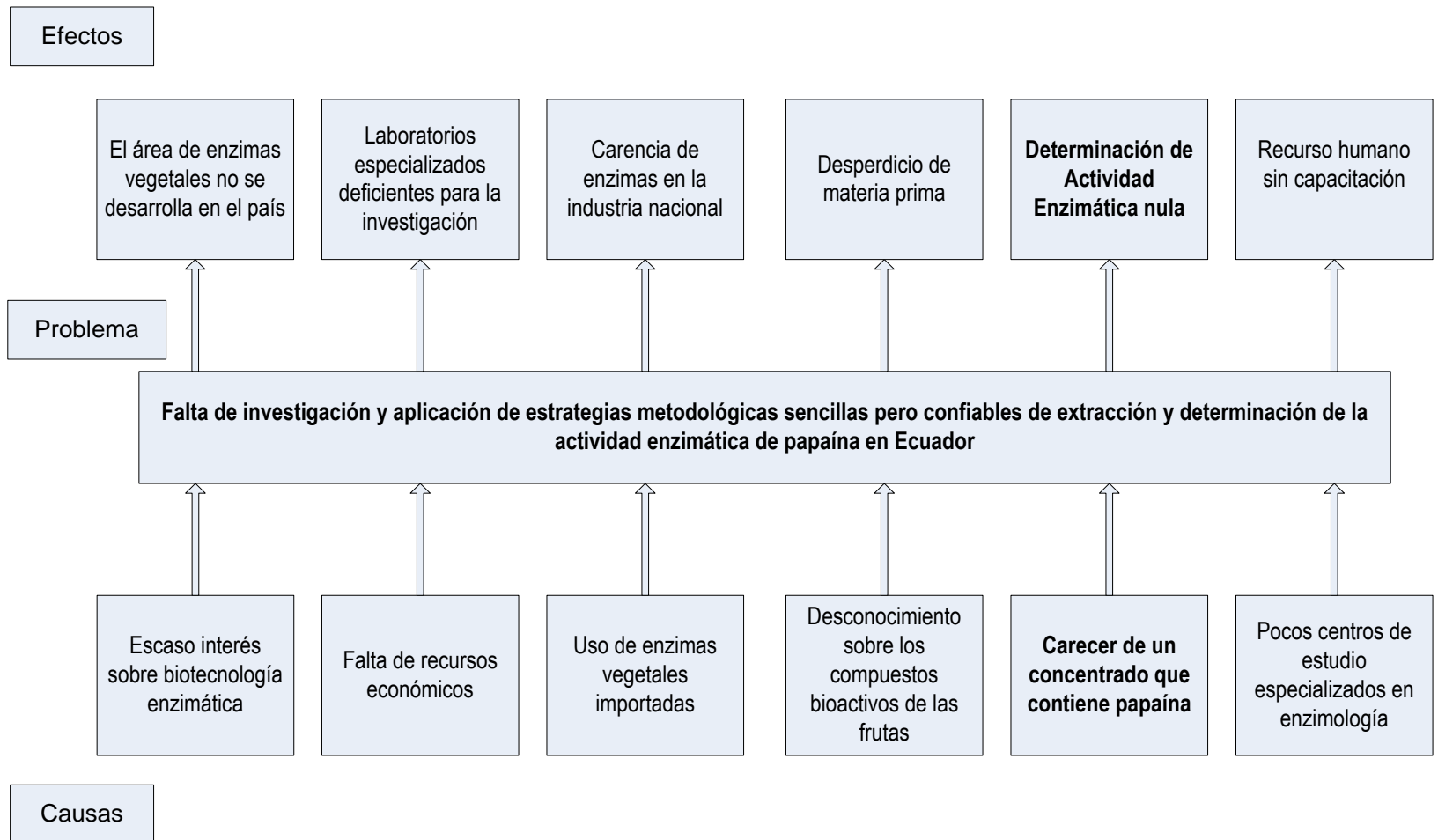


Figura 1. Árbol de Problemas

Elaborado por: Cristina Chimborazo



### **1.2.3 Prognosis**

En la actualidad las enzimas vegetales son de gran interés por sus propiedades y funciones específicas, debido a ello son de gran utilidad en diferentes procesos industriales y su mercado global crece firmemente.

Al no realizarse esta investigación no se podrá evaluar una nueva metodología de extracción y obtención de un concentrado que contiene papaína, que presente una actividad enzimática óptima para el cumplimiento de su función, ni contribuir al desarrollo del campo de la enzimología.

Debido a esto no se contaría con datos válidos y confiables sobre actividad enzimática; así como las condiciones precisas para la obtención de un concentrado con papaína; que permita ser una fuente bibliográfica para continuar con futuras investigaciones en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

### **1.2.4 Formulación del Problema**

En Ecuador existen muy pocas investigaciones sobre enzimas vegetales, específicamente sobre papaína, por tal motivo es importante incursionar en esta área y contribuir de esta manera con el desarrollo del país afianzando la biotecnología como una ciencia en la que falta mucho por descubrir.

La papaya al ser una fruta ampliamente producida en Ecuador constituye la materia prima de fácil obtención para el estudio.

La presente investigación pretende adaptar una nueva metodología de extracción y concentración, ya que la enzima totalmente purificada no se la puede obtener por falta de ciertos reactivos, equipos; y evaluar la actividad enzimática en sustratos proteínicos de tal manera que el proyecto está

enfocado principalmente a la industria de los alimentos; incursionando así en la búsqueda de proteasas vegetales de gran interés en la actualidad.

### **1.2.5 Preguntas Directrices**

¿De qué forma se puede realizar la extracción de un concentrado con papaína?

¿Qué método se puede aplicar para la concentración de la enzima?

¿De qué modo se puede cuantificar la actividad enzimática de un concentrado con papaína mediante viscosidad?

¿De qué manera se puede comparar la funcionalidad del concentrado proteínico que actúe en ambos sustratos?

### **1.2.6 Delimitación**

**Área:** Biotecnología

**Sub – Área:** Ingeniería de las Enzimas

**Sector:** Enzimas Vegetales

**Sub – Sector:** Proteasas

**Delimitación Espacial:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.

**Delimitación Temporal:** El trabajo de investigación se realizó desde Noviembre 2011 – Junio 2012.

### **1.3 Justificación**

La papaya es una fruta tropical que por sus características organolépticas se produce en importantes cantidades en Ecuador, tiene gran demanda a nivel

mundial debido principalmente a que muy pocos países tienen condiciones adecuadas para su cultivo.

En el proyecto se pretende realizar la extracción y obtención de un concentrado con papaína, una proteasa que se extrae de la papaya verde; este cultivo por sus ventajas agroclimáticas se produce durante todo el año en Ecuador.

El estudio es de gran interés debido a que la enzima es empleada en distintas áreas como en la alimentaria, farmacéutica y textil, entre otras; ya que gracias a sus diferentes propiedades es utilizada por las industrias quienes aprovechan al máximo sus cualidades para la elaboración de una gama de productos de alto consumo por la sociedad.

Con la investigación de enzimas vegetales surge la búsqueda y diseño de nuevas estrategias metodológicas que permitan la identificación, aislamiento y concentración de papaína con procesos de obtención de costos no elevados, permitiendo obtener un grado de actividad enzimática aceptable.

El proyecto es factible de realizarse ya que se cuenta con material bibliográfico para el desarrollo de la experimentación, aunque los recursos son limitados y no se pueda lograr la obtención de una enzima altamente purificada, ya que no se cuenta con un laboratorio específico para enzimas ni equipos necesarios para el desarrollo del estudio, se adaptó los recursos disponibles para la realización de una investigación elemental; con la obtención de un concentrado con papaína, aportando con una investigación fundamental que no se ha realizado en la provincia de Tungurahua.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 General**

- Evaluar la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína obtenida de la papaya (*Carica papaya*) medida en soluciones proteínicas.

### **1.4.2 Específicos**

- Realizar el proceso de extracción usando un solvente orgánico y una solución salina.
- Efectuar la concentración de la enzima mediante un proceso de secado.
- Cuantificar la actividad enzimática de un concentrado con papaína a través de la viscosidad.
- Comparar la eficiencia del concentrado proteínico que actúa en ambos sustratos.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes Investigativos**

Se han efectuado algunas investigaciones a nivel internacional dentro de las que se destacan:

“Obtención y Determinación de la Actividad Proteolítica de las enzimas de la papaya *Carica papaya* (Linné)”; licuaron la fruta, el filtrado obtenido se regula a pH 6, añadieron sulfato de amonio y se centrifuga, para purificar adicionaron Sulfato de Amonio y disuelto en cianuro de sodio; se precipita con 3 volúmenes de acetona; el precipitado se deseca el vacío a temperatura ambiente. Para determinar la actividad proteolítica utilizaron como sustrato caseína, después de la incubación con ácido tricloroacético y con el sustrato se obtuvo una actividad enzimática máxima, a una concentración de 0.125 mg/ml para el testigo y para el problema una concentración de 0.5 mg/ml. En la determinación de la actividad agregando primero el ácido tricloroacético y luego el sustrato, se obtuvo un valor máximo a una concentración de 0.025 mg/ml para el testigo y 0.5 mg/ml para el problema. Obtuvieron mayor actividad proteolítica de la enzima que las enzimas comerciales (Ferrao y Jácome, 1977).

Ortiz (1978), en el proyecto “Estudios sobre la Actividad Proteolítica y Secado del Látex de la Papaya (*Carica papaya* L.)”, investigaron los factores que afectan la actividad proteolítica final: edad y sexo del fruto, hora de recolección, actividad proteolítica del látex fluido y el que coagula, distintos tiempos post – recolección, pre – secado de látex, la adición de agentes químicos (secuestrante, reductor, anticoagulante, e inhibidor de crecimiento microbiano) y

distintas temperatura de secado, utilizando un secador diseñado para el propósito. La actividad de papaína fue mayor para la obtenida de frutos femeninos; no existe diferencia de actividad entre la papaína obtenida del látex fluido y del que coagula.

Utilizaron EDTA y bisulfito de sodio, en combinación tienen un efecto protector sobre la actividad del látex. El uso de cloruro de sodio (menos de 50% de p/p) disminuye la actividad final de la papaína, debido a cambio de pH. El cloruro de sodio tiene un efecto anticoagulante sobre el látex y afecta la curva de secado. Concluyeron que la temperatura óptima para el secado está entre 50° y 55°C; a 60°C se produce mayor velocidad de secado pero conduce a una actividad proteolítica menor.

En la investigación “Comparación de la Actividad Proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos”, determinaron la actividad proteolítica del látex de *Carica papaya* L. secado por: liofilización, secado al vacío, secado con circulación de aire caliente y exposición directa al sol, analizaron los cambios de actividad proteolítica de las muestras empacadas con y sin vacío. Se encontró que la conservación de la actividad proteolítica de la papaína cruda, depende del método de secado y del tipo de empaque utilizado para su almacenamiento. Con relación al sistema de secado, las muestras liofilizadas indican mayor actividad proteolítica, seguidas de las muestras secadas al vacío, secadas con aire caliente y por último aquellas secadas al sol. El látex seco y empacado con vacío, mantienen una mayor actividad proteolítica durante el almacenamiento que el látex empacado sin vacío (Chaverri, 1983).

En el tema “La papaya un mercado en expansión”, realizaron incisiones sobre la superficie de la fruta verde en repeticiones de 4 a 5 días. Colocaron recipientes debajo de las frutas rodeando al tallo para la recepción del látex y su concentración. El látex coagula rápidamente y para mejores resultados es distribuido en telas y secado en horno a bajas temperaturas, posteriormente se convierte en harina y se empaca en tinas (ASERCA, 1999).

El “Estudio de Mercado Nacional de la Papaya Maradol”, los investigadores realizaron incisiones verticales en frutos verdes, el proceso de secado puede hacerse a pleno sol o utilizando un horno de 25 °C, ya que el calor excesivo destruye el principio activo de la papaína. Si se proporcionan las condiciones óptimas de calor, el látex puede ser secado en 20 horas. Se conoce que el uso de solventes como el alcohol y la acetona, tiene acción sobre la precipitación y deshidratación del látex. El látex coagulado puede producir el 25% de su peso en polvo seco, el cual aún contiene 6-10% de humedad y presenta una coloración blanco-cremosa. La pérdida de calidad está asociada con factores como la edad de los árboles, madurez de los frutos, tiempo de extracción del látex, velocidad de secado, cantidad de lluvia caída, temperatura a la cual el látex es secado, sistema de almacenamiento, etc. La papaína presentó signos de descomposición por la liberación de fuertes olores de productos volátiles, acompañados por un rápido cambio de color blanco cremoso a marrón. Los frutos de 2 a 2.5 meses de edad presentaron las más altas producciones de látex y papaína cruda. Así como las frutas de 23 a 25 cm de largo producen los más altos rendimientos y tienen una mayor actividad. Se recomendó que todas las incisiones deben ser hechas verticalmente y no más de 4 sangrías deben hacerse a un fruto al mismo tiempo (Crece, s.f).

Ramírez y Cruz (s.f), en la investigación “Cinéticas Enzimáticas de Actividades Proteolíticas de productos utilizando látex de papaya (*Carica papaya*) para lograr el ablandamiento de la Carne”, compararon las actividades proteolíticas de ablandadores de carnes comerciales, con un blanco de látex de papaya. Para la determinación de la actividad se utilizó el método de solubilidad de una proteína en ácido tricloroacético (ATC). Se marcó a los ablandadores como A, B y C, el ablandador B es el que presento mayor unidades de Tirosinas liberadas, para la determinación de actividad proteolítica. Los tres ablandadores comerciales, siguen una misma cinética enzimática directamente proporcional al aumento del tiempo en minutos con respecto a su contenido de Unidades de Tirosina liberadas. Concluyeron que la actividad de la papaína, tienen un efecto

muy importante sobre las proteínas de la carne, logrando su hidrólisis, la actividad proteolítica de los diferentes ablandadores para carnes tienen un comportamiento muy similar, con respecto al tiempo, se observa que el mejor fue el ablandador B; pero con respecto a la mejor calidad en los procesos unitarios, es el ablandador C.

“Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya*”. Realizaron la extracción de la enzima de la cáscara verde del fruto con buffer fosfato y etanol para la precipitación de proteínas. La cantidad de proteína obtenida se midió por espectrofotometría UV. La medición de la actividad se efectuó mediante dos técnicas: Método titulométrico (Shwert and Tanaka, 1955) y el Método colorimétrico (Erlanger y Kakade, 1969). La cantidad de látex seco por tonelada de fruto obtenida fue de 2.5 kg; la actividad enzimática que obtuvieron en este proceso antes de las operaciones de precipitación y secado fue relativamente alto por lo cual es interesante estudiar estas operaciones para mantener la actividad con el menor porcentaje de pérdida posible (Glibota y otros, 2000).

Alcayaga (2004), con el tema “Influencia Del Método De Deshidratado Y Época De Extracción En La Actividad Enzimática Del Latéx De Papayo Cultivado En Cobquecura VIII Región Chile”, en este estudio se realizó la extracción del látex de frutos verdes durante el año 2003, en un periodo de estudio que se dividió en 4 épocas. Determinaron la actividad específica de las muestras deshidratadas a través de los métodos de horno común, vacío y liofilizado. Las proteínas se cuantificaron con el método Bradford y la actividad enzimática se determinó por titulación con un sustrato sintético (BAEE) (Polgar, 1984). El valor promedio de la actividad específica obtenido fue de 29,9 U/mg de proteína. La mayor cantidad de frutos aptos para la extracción de látex se observó en los meses de noviembre y diciembre. El látex deshidratado por liofilización presentó menor alteración de color que aquel secado en horno común y al vacío.



En el proyecto “Análisis de Prefactibilidad de la Obtención y Comercialización de la Enzima Papaína”, efectuaron un proceso para obtener papaína recomendado por la Comisión Nacional de Fruticultura; realizaron incisiones con un cuchillo de acero inoxidable sobre la corteza del fruto no maduro, a una profundidad de 3 mm en sentido longitudinal, el látex fue recogido en recipientes de porcelana que contienen preservadores químicos. Para la purificación, el látex se pasa a través de cedazos finos para eliminar materias extrañas, se regula el pH de 6 – 8, y se separa por sí mismo en dos capas: una acuosa en la superficie y un precipitado o coágulo en el fondo, la papaína se encuentra en el líquido claro, seguidamente añadieron un volumen variable de alcohol, el cual forma un precipitado de papaína, que se separa del líquido restante por decantación. La operación se repite dos o tres veces, hasta que se considere que toda la papaína se ha purificado. Secaron el precipitado en una estufa, a 35° C, obteniendo un polvo blanco. En la etapa de depuración, la papaína precipitada con alcohol se mezcla con subacetato de plomo, el cuál precipitará todos los albuminoides y peptonas, sin precipitar la papaína. Filtraron varias veces el plomo que queda en la solución, eliminándolo con un corriente de ácido sulfhídrico caliente, al líquido que pasa totalmente claro, se le añade alcohol, decantándose el precipitado, el cual se seca, se muele y se envasa en recipientes opacos a la luz (Cano y otros, 2004).

Con el tema “Diseño y Construcción de un Liofilizador para conservar papaya a temperatura ambiente, como fuente de papaína a bajo costo”, construyeron a escala de laboratorio un liofilizador para conservar papaya en buenas condiciones por largo tiempo y a temperatura ambiente. El procedimiento permite la obtención de papaína para usos en el laboratorio, a bajo costo y sin modificación de su actividad enzimática.

Trituraron las muestras de frutos verdes, se congelaron, y se colocaron en la cámara del liofilizador. Determinaron las curvas de porcentaje de humedad en función del tiempo de liofilización, luego las muestras fueron extraídas de la cámara y guardadas en recipientes herméticos. Obtuvieron la actividad

enzimática utilizando N Benzoyl-bL-Arginine 4- nitroanilide hydrochloride (BAPNA) como sustrato y se cuantificaron las proteínas totales por el método de Biuret de ambas muestras. Las muestras liofilizadas presentaron igual actividad enzimática que las muestras frescas, la concentración de papaína disuelta en la muestra liofilizada fue de aproximadamente 1.2 mg/l, valor que coincidió con la concentración de papaína disuelta en las muestras frescas, las curvas de humedad obtenidas revelaron el buen funcionamiento y rendimiento del liofilizador diseñado. Las propiedades de las muestras liofilizadas se mantuvieron, esto pone de manifiesto que si bien la obtención de papaína es a bajo costo, el producto final es de una gran calidad (Bertoluzzo y otros, 2007).

Fernández, J (2005), con el proyecto “Plan de negocios para la producción de papaína en la séptima región” explica que efectuaron el proceso de extracción mediante incisiones en la cáscara, se recolectó el látex en contenedores, se filtró y se efectuaron tres procesos de deshidratado: Deshidratado al sol (el látex se coloca en bandejas al sol, se produce un polvo con actividad enzimática baja); Secado en horno (el látex filtrado se seca en un horno a 60° C de 3 a 4 días hasta obtener una escamas secas con un nivel mayor de actividad enzimática); Secado en Spray (el látex se filtra y centrifuga produciendo un 45% de concentración sólida, se obtiene tres veces más actividad enzimática que en el proceso anterior).

Nitsawang y colaboradores (2006), aportaron con la investigación “Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation”, efectuaron la extracción en un sistema acuoso de dos fases y se comparó con el tradicional procedimiento de precipitación de sales en dos fases. Papaína de alta pureza fue obtenida en un proceso de tiempo más corto directamente del látex en un sistema acuoso de dos fases que consta de 8% (p/p) de polietilenglicol y un 15% (p/p) de sulfato de amonio. La técnica proporciona un medio conveniente para la obtención de papaína pura, libre de cualquier actividad de proteasas contaminantes, siendo un proceso más rápido

en comparación con otros procesos de purificación que están limitados por la necesidad de eliminar el material insoluble de látex.

En el trabajo “Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (*Carica Papaya* L.), sobre la concentración de papaína”; realizaron la extracción de la pulpa y se almacenó a 4°C en envases esterilizados, efectuaron pruebas físico – químicas a las muestras, midiendo pH, sólidos solubles, contenido de cenizas y humedad. Se purificó la enzima mediante precipitación de la sal en dos pasos, se refinó por diálisis usando una membrana de diálisis para eliminar impurezas, la cuantificación se efectuó con un espectrofotómetro visible, concluyendo así que a medida que la maduración del fruto transcurre hay menos concentración de papaína en la pulpa y de actividad proteolítica (Gutiérrez y colaboradores, 2009).

Se realizó un estudio sobre “Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae), determinaron el rendimiento y la actividad enzimática de la papaína en diferentes estaciones del año; caracterizaron el látex determinando parámetros como la densidad, color, contenido de materia seca, sólidos solubles cuantificados mediante refractometría, pH, acidez titulable, contenido de proteína con espectrofotometría por técnica de Bradford (Bradford, 1976), proteína Kjeldahl (Hart y Fischer, 1971) y actividad enzimática realizada por técnica titulométrica (Worthington Biochemical Corporation 1998). Los mayores rendimientos de látex se obtuvieron en la estación de primavera, mientras que la actividad enzimática se mantuvo constante durante el año de estudio. La actividad llegó a 24.13 U/mg enzima en primavera, se considera alta, al compararla con patrones de papaína comercial (Vidal y otros, 2009).

A nivel del Ecuador se han realizado las siguientes investigaciones entre los que se destacan “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”. El látex fue extraído mediante incisiones verticales en la fruta verde del toronche y de la papaya, el látex se secó en la estufa, y determinaron la actividad enzimática de la papaína presente en el látex de ambos frutos mediante el método de coagulación de leche (Balls and Hoover) y el método de determinación de proteínas en leche (Aguirre y Castillo, 2009).

“Cuantificación del contenido de papaína y su actividad enzimática en seis especies del género *Vasconcellea*, nativas del sur del Ecuador”, se recolectó la especies en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe; se estudio las especies: *V. monoica*, *V. palandensis*, *V. stipulata*, *V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña*, *V. cundinamarcensis* y *V. x heilbornii nm. var. Gualel*. Se extrajo el látex de los frutos verdes, se trasportó en condiciones de congelación y se separó por centrifugación. A la enzima purificada se le adicionó bisulfito de sodio al 1 % p/p para su conservación. Cuantificaron la actividad enzimática mediante una reacción colorimétrica, medida en un espectrofotómetro UV a 280 nm, empleando el Método (9001-73-4) AOAC 54.

Los resultados demostraron que *Vasconcellea palandensis* tuvo un mayor rendimiento en látex con un valor de 1,40 % p/p, el mayor rendimiento en enzima purificada fue de *Vasconcellea x heilbornii nm. var. Gualel* con un valor de 34.11 % p/p y la actividad de la enzima purificada fue mayor en *Vasconcellea stipulata* con un valor de 13097,20 USP/mg. Luego del secado por liofilización, la actividad enzimática alcanzó un valor de 61 281,00 USP/mg. La actividad de la enzima liofilizada de *Carica papaya var. Tocaimera*, obtenida en las mismas condiciones, obtuvo un valor de 33766,12 USP/mg, significativamente menor que la enzima liofilizada de *Vasconcellea stipulata* (Viñamagua y otros, s.f).

A nivel local se realizó la investigación “Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya”, trabajaron con papaya: verde, pintona y madura; se analizó la diferencia de

actividad enzimática de papaína para los 3 grados de maduración. Se recolectó el látex, y l concentraron mediante secado en la incubadora, se obtuvo un concentrado en polvo, la muestra fue llevada a congelación para conservarla. La evaluación de la actividad enzimática se efectuó mediante determinaciones de viscosidad de leche obtenida por disolución de leche en polvo añadida a la enzima disuelta en ácido acético. El análisis estadístico efectuado demostró que la mejor muestra fue la correspondiente a papayas verdes que presenta mayor actividad enzimática con relación a los otros grados de maduración (Villavicencio, 2011).

## **2.2 Fundamentación Filosófica**

La ubicación paradigmática del proyecto de investigación es de carácter positivista. La naturaleza de la realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente; se cree en la posibilidad, por lo que se busca llegar a leyes y generalizaciones independientes del tiempo y espacio. La investigación es objetiva, aquí predominan los métodos cuantitativos, el escenario de investigación es el laboratorio. Dentro de la logística de análisis se encuentra orientado a verificación, a lo hipotético deductivo, fundamentado en el análisis de resultados.

Además se centra dentro del razonamiento deductivo que es un sistema para organizar hechos conocidos y extraer conclusiones; las conclusiones deductivas son necesariamente inferencias hechas a partir de un conocimiento que ya existía. El razonamiento deductivo puede organizar lo que ya se conoce y señalar nuevas relaciones conforme pasa de lo general a lo específico, pero sin que llegue a constituir una fuente de verdades nuevas (Dávila, 2006).

## **2.3 Fundamentación Legal**

En la FDA (Food and Drug Administration), la papaína es un preparado enzimático derivado de la papaya *Carica papaya L.* Esta enzima se ha

afirmado como GRAS (generally recognized as safe) por la FDA para uso alimentario determinado o indeterminado y que figura en:

Título 21 del Código de Regulaciones Federales (21 CFR)

Parte 184

Papaína: 184.1585

Las condiciones para su uso están establecidas en el reglamento referente y se basan en el uso de cepas no tóxicas de los organismos respectivos y en el uso de Buenas Prácticas de Manufactura (184.1 (b)) (FDA – Food, 2001).

En el Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comité Del CODEX Sobre Aditivos Alimentarios, la papaína es un aditivo que se puede utilizar en la categoría de alimentos en las condiciones de las buenas prácticas de fabricación (BPF) establecidas en el Preámbulo de la GSFA (Codex General Standard for Food Additives) del Codex.

Número del SIN para la papaína: 1101(ii) (Comisión del Codex Alimentarius, 2010).

Según, Congreso Nacional del Ecuador (2006), Ley Orgánica de Salud se establece que:

#### De los alimentos

Art. 145.- Es responsabilidad de los productores, expendedores y demás agentes que intervienen durante el ciclo producción consumo, cumplir con las normas establecidas en esta Ley y demás disposiciones vigentes para asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos para consumo humano.

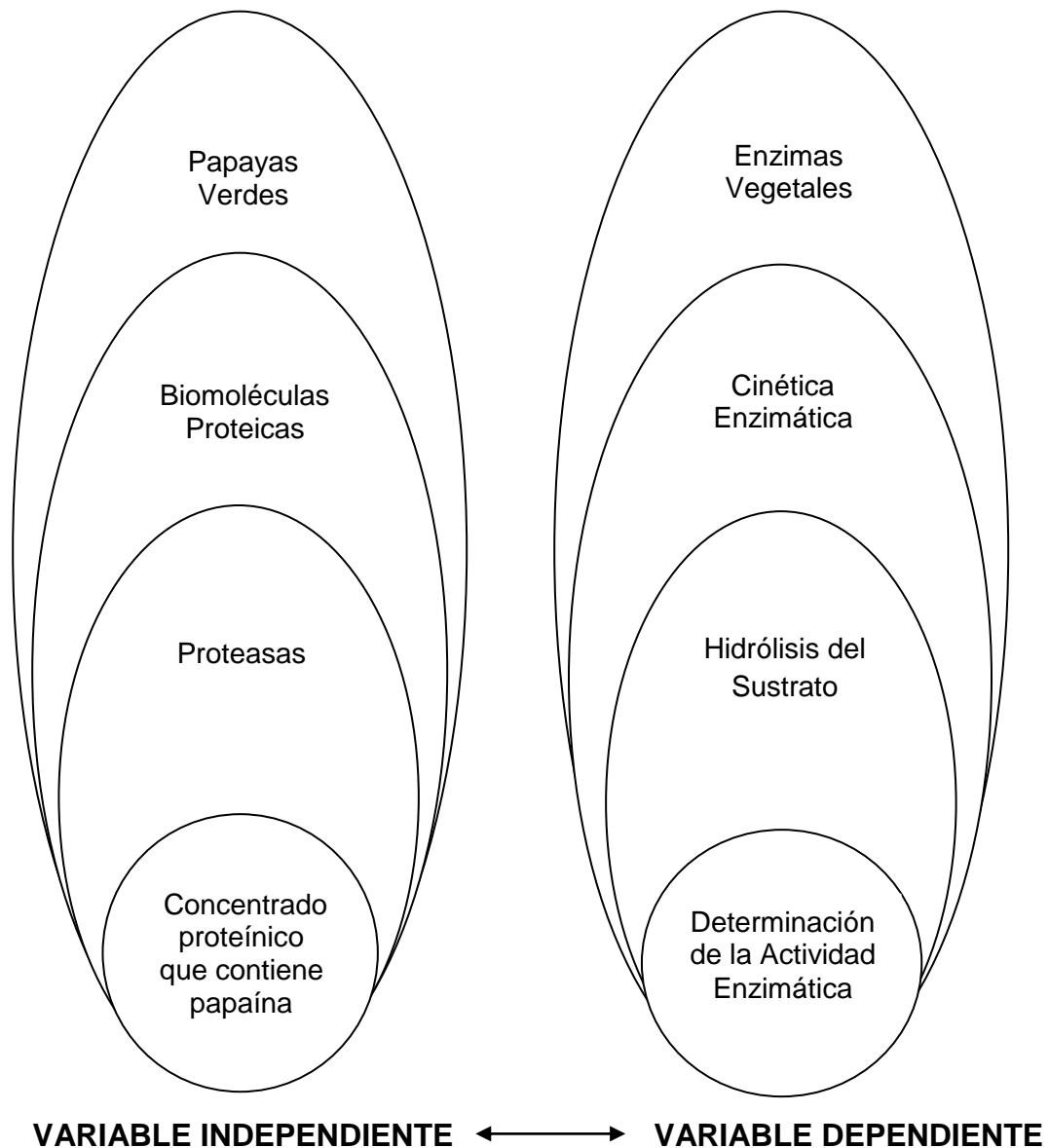
Según, Acuerdo Ministerial N° 117:

#### REGLAMENTO DE LA NORMATIVA DE LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA AGROPECUARIA EN EL ECUADOR

Anexo 2: Ingredientes de origen no agrícola y Coadyuvantes de elaboración que pueden ser empleados para la elaboración / Preparación de los productos de origen agrícola, manifiesta:

1.4 Preparaciones de microorganismos y enzimas: Cualquier preparación a base de microorganismos y enzimas normalmente empleados en la elaboración de alimentos, a excepción de microorganismos obtenidos / modificados genéticamente o enzimas derivadas de la ingeniería genética.

## 2.4 Categorías Fundamentales



### 2.4.1 Marco Teórico de la Variable Independiente

El papayo crece no sólo en regiones tropicales húmedas sino también en regiones subtropicales libres de heladas, es originaria de Centroamérica y Sudamérica. Es una planta con hojas grandes, de crecimiento rápido, mayormente no maderada, herbácea y duradera de muchos años. Su forma es redonda-ovalada hasta oblonga, el color de su pulpa es blanco amarillento, amarillo profundo, anaranjado o amarillo rojizo (Augstburger y colaboradores, 2000).

La papaya pertenece a una pequeña familia de dicotiledóneas *Caricaceae* que incluye cuatro géneros. Actualmente se reconocen 30 especies distribuidas en: 21 especies de *Carica*, 2 de *Cylicomorpha*, 6 de *Jaracatia* y 1 de *Jarilla*. La papaya es la de mayor importancia de las 21 especies de *Carica* (Jiménez, 2002).

Las proteínas son sustancias orgánicas nitrogenadas complejas que se hallan en las células animales y vegetales. Son polímeros lineales en los que las unidades monoméricas son los aminoácidos, que se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporciona una correspondiente variedad de funciones. Quizá las proteínas más importantes sean las enzimas, catalizadores que determinan el ritmo y el rumbo de toda la bioquímica. Están constituidas por la concatenación de unas sustancias químicas denominadas aminoácidos, son éstos la unidad estructural de las proteínas; por hidrólisis de proteínas se han identificado 20 aminoácidos distintos. Un aminoácido posee dos grupos funcionales característicos: un grupo amino  $-NH_2$  y un grupo carboxílico  $-COOH$ . Cada tipo de molécula proteica posee, en su estado activo, una forma tridimensional característica que es conocida como su conformación o estructura. Esta organización en la estructura de una proteína se realiza a cuatro niveles diferentes:

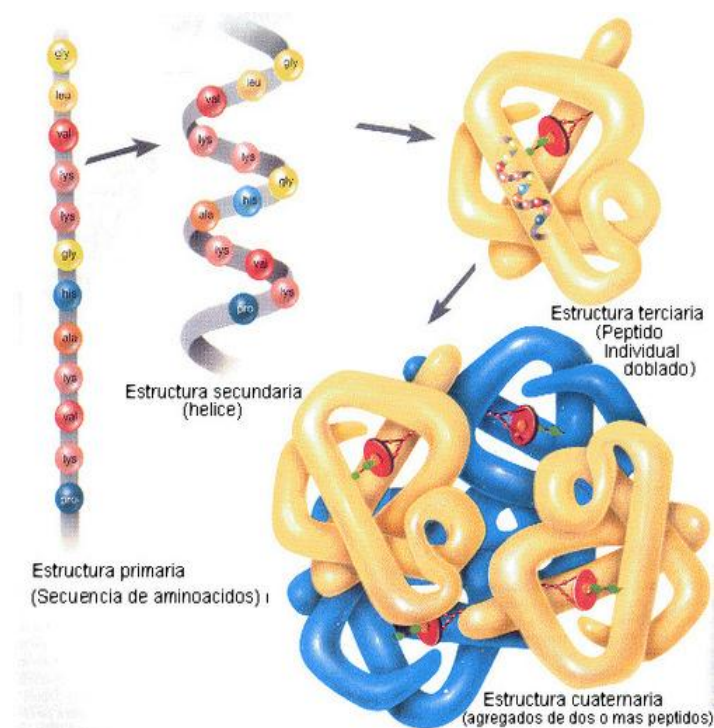


Nivel primario de organización: Se refiere a la composición de los aminoácidos integrantes de la cadena, así como a su orden o secuencia y a la disposición del enlace peptídico.

Nivel secundario de organización: Se refiere a la disposición espacial de la cadena polipeptídica, a la formación de estructuras planas o filamentosas a lo largo de una dirección.

Nivel terciario de organización: Corresponde a la disposición e interrelación de las cadenas plegadas de una proteína, esto origina hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$ ; mantenidas por uniones salinas, puentes disulfuro, fuerzas de Van der Waals, que dan gran estabilidad a la proteína.

Nivel cuaternario de organización: La organización de las proteínas se produce por ajuste de la estructura arrollada y plegada, formando una estructura funcional, éste nivel lo poseen aquellas proteínas formadas por varias cadenas polipeptídicas (Tébar, 2009).



**Figura 2.** Niveles estructurales de una proteína.

**Fuente:** Tébar, 2009.

Al ser las biomoléculas más versátiles y más diversas, realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre ellas la función enzimática que es la más especializada y numerosa. En su función como enzimas, las proteínas hacen uso de su propiedad de poder interaccionar, en forma específica, con muy diversas moléculas (Luque, s.f).

En función de su acción catalítica específica las enzimas se clasifican en grupos o clases. A cada enzima se le asigna un número compuesto por cuatro dígitos, así como un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza.

El primer número indica a cuál de las seis clases pertenece el enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción.

La Comisión de Enzimas “Enzyme Comission” (EC), agrupa a las enzimas en seis clases:

Clase 1: Las Oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro.

Clase 2: A esta clase de enzimas pertenecen las transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) desde un sustrato a otro. Entre los más comunes están los grupos carbonilo, amino y el carboxilo.

Clase 3: Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis. Este grupo de enzimas permite romper moléculas de alto peso molecular, haciéndolas reaccionar con moléculas de agua.

Clase 4: Se encuentran las liasas, que catalizan reacciones de ruptura, se eliminan grupos para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Estas moléculas rompen enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre.

Clase 5: Las isomerasas catalizan la interconversión de isómeros. Realizan modificaciones en una molécula, cambiando su conformación molecular, ya sea como isómero óptico, funcional o de otro tipo.

Clase 6: Las ligasas catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. Aportan siempre la hidrólisis de ATP (Barberis & Illanes, 1994).

Las enzimas proteolíticas (llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad (Hernández, 2006).

Según Whitaker & colaboradores (1998), citado por Hernández (2006), indica que según el grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se pueden clasificar en: serín proteasas, aspartil proteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas.

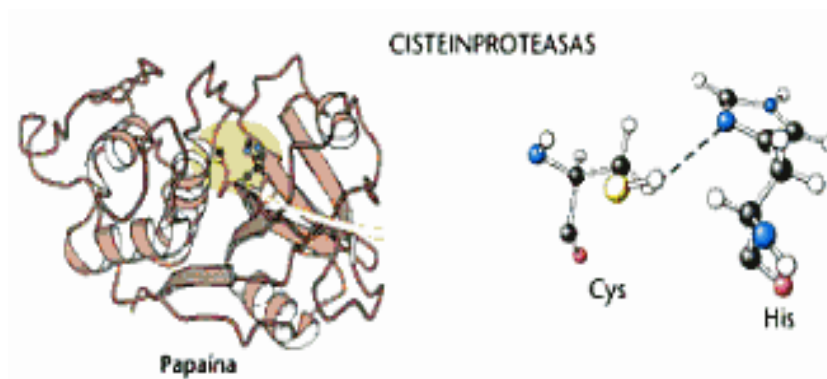
Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, la proteasa papaína se encuentra dentro del grupo de las cisteín proteasas.

La actividad de las cisteín proteasas depende de una diada catalítica consistente en cisteína e histidina. Las cisteín proteasas tienen su máxima actividad a pH neutro.

Las cisteíno proteinasas (EC 3.4.22.n) poseen un grupo cisteíno en su sitio activo. Este grupo incluye más de 40 familias de enzimas, agrupadas en 6 superfamilias o clanes.

En el reino vegetal, las cisteíno proteinasas se encuentran en las plantas de las familias Caricaceae, Bromeliaceae y Moraceae.

Dentro de las cisteíno proteinasas, se incluyen las enzimas de notable importancia industria: papaína, la quimopapaína, la bromelina y la ficina (Sinche, 2009).



**Figura 3.** Estructura de la enzima papaína con un residuo de cisteína e histidina  
**Fuente:** Mark, 2007.

Según Reyes (2005), citado por Sinche (2009), la papaína (EC 3.4.22.2) es una proteína globular de 212 aminoácidos, las cadenas de aminoácidos están intensamente replegadas existiendo multitud de interacciones entre puntos muy distantes de la cadena, lo que les da forma de globo (de ahí el nombre); se obtiene del látex de los frutos verdes de papaya (*Carica papaya*). Estudios realizados recomiendan seleccionar las plantas que tengan frutos verdes, debido a que en ellos se encuentra una mayor cantidad de látex, con una elevada actividad enzimática.

La papaína tiene la capacidad para digerir las proteínas de los alimentos, similar a la pepsina, una enzima que está en el jugo gástrico de los seres humanos, indica Dhuique (2011), citado por Acosta (2011).

Briones (1996), citado por Barrera (2007), menciona que la mayoría de las enzimas proteolíticas de origen vegetal son de tipo cisteínico, como la papaína, utilizadas en numerosas industrias: Modifican proteínas, ya que el control del tamaño de los péptidos es esencial para obtener cambios reproducibles en las propiedades funcionales de proteínas, este control puede lograrse mediante el uso de proteasas específicas y selectivas. También, en la hidrólisis de las

proteínas para la industria alimentaria, con respecto a la funcionalidad y calidad nutricional.

Entre otros usos comerciales de la papaína se encuentran por ejemplo, en la industria de la cerveza hidroliza proteínas que provocan su turbidez.

Además es usada para evitar el endurecimiento de la carne, mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos del colágeno de los tejidos conectivos, la elastina y la actomiosina, elaborándose ablandadores de carne; en la industria del cuero, esta operación es un ataque controlado de la proteasa al colágeno para disminuir las protuberancias y dar un fino aspecto al cuero, así como en la formulación de productos farmacéuticos diversos. También se usa en la limpieza de lentes de contacto, eliminando los depósitos proteicos (Olavide, 2008).

Esta enzima se utiliza además para desengomar la seda, por lo general con un tratamiento previo al baño desgomizante principal, también se utiliza en la industria de la lana, para reducir el encogido al lavar y para mejorar la calidad de las tinturas usadas.

En la industria medicinal la papaína se utiliza en el tratamiento de la difteria, úlceras sifílicas, eczemas, psoriasis, la cera que se forma en los oídos y herpes. Se utiliza en tratamientos postquirúrgicos para el desbridamiento de heridas y en clínica gastroenterológica como coadyuvantes en trastornos digestivos, por sus propiedades antiinflamatorias.

En la industria dietética se emplea en la producción de alimentos especiales para bebés, ya que mejora la capacidad de asimilación en los alimentos al degradar los compuestos de alto peso molecular a cadenas más cortas de fácil incorporación al torrente circulatorio alimenticio del bebé.

En la industria de alimentos (jugos) la papaína es muy utilizada en el pretratamiento de las frutas destinadas a jugos y aceites esenciales, así como en vinos para clarificar en situación similar a la industria cervecera (Theil, 1997), citado por Acosta (2011).

## 2.4.2 Marco Teórico de la Variable Dependiente

Las enzimas son catalizadores de las reacciones químicas en los seres vivos, son específicos, cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Tienen una alta eficiencia y no se consumen en las reacciones, por tales razones, con poca cantidad de ellas se pueden transformar en producto grandes cantidades de sustrato (Sinche, 2009).

Cada enzima es específica, en el sentido de que puede actuar solamente sobre cierto sustrato; esto no quiere decir que haya una enzima para cada sustrato, sino que cada enzima actúa sobre sustancias que tienen en común una cierta identidad molecular. La actividad enzimática de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteína, mientras que otras necesitan uno o más componentes no proteicos llamados cofactores (Lehninger, 1982).

El estudio cualitativo de la catálisis enzimática que se denomina cinética enzimática, proporciona información sobre las velocidades de reacción. La catálisis enzimática de las reacciones es esencial para los sistemas vivos. En condiciones biológicamente significativas, las reacciones sin catalizar tienden a ser lentas.

El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar dentro de un parte interna de la enzima denominada centro activo, éste comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.

La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima se le denomina sustrato, por esta razón se les dice que son altamente específicas tanto en la reacción que catalizan como en la selección de las sustancias reaccionantes.

El complejo enzima-sustrato es de importancia central en la acción de las enzimas y es el punto de partida de los tratamientos matemáticos que definen el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas por enzimas así como la descripción teórica de los mecanismos enzimáticos, una vez formado los productos, la enzima regresa a su forma inicial y puede comenzar un nuevo ciclo de reacción (Cruces, 2003).



**Figura 4.** Esquema complejo enzima – sustrato

**Fuente:** Cruces, 2003.

Donde E representa la enzima, S el sustrato, ES el complejo transitorio enzima - sustrato y P los productos de reacción.

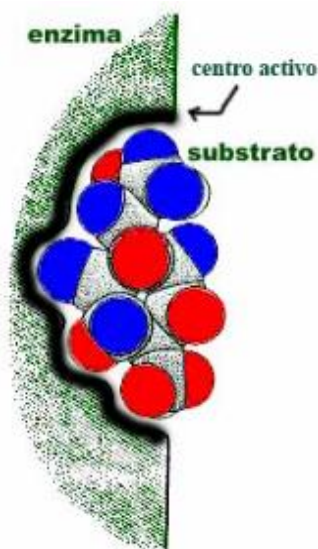
(Whitaker, 1994) citado por Alarcón (2009), expresó que a través del tiempo los métodos de purificación se han ido perfeccionando tratando de cubrir aspectos importantes en la obtención de las enzimas como la concentración obtenida y el mantenimiento de la actividad enzimática.

Uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas es el de su especificidad de actuación, de suerte que tan solo ciertos sustratos

experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales o subproductos.

Aunque las enzimas son muy específicas, su grado de especificidad puede ser muy variado. Algunas poseen una especificidad casi absoluta respecto a un sustrato determinado y no atacarán a moléculas aunque estén muy relacionados, mientras que otras enzimas atacan toda una clase de moléculas con un común denominador estructural, aunque lo hagan a velocidades diferentes.

Los estudios de especificidad de sustrato de las enzimas, muestran que las moléculas de sustrato reflejan en general, por el principio de complementariedad, la estructura del centro activo de la enzima mediante dos rasgos distintivos estructuralmente, el primero el sustrato debe poseer un enlace químico susceptible que pueda ser atacado por la enzima y el segundo, generalmente posee otra característica estructural necesaria para efectuar su unión al centro activo de la enzima, probablemente para situar la molécula del sustrato en la adecuada relación geométrica de modo que el enlace susceptible pueda ser atacado (Lehninger, 1982).



**Figura 5.** Representación del centro activo de la enzima

**Fuente:** Alarcón, 2009.



La actividad de la papaína puede ser determinada mediante una medición de la velocidad de digestión de proteínas, o por seguimiento de la velocidad de hidrólisis de sustratos semejantes de baja masa molecular. Ambos tipos de sustratos son ampliamente usados (Martínez, 2004).

Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima necesaria para la transformación de 1mmol de sustrato por minuto.

La actividad específica es el número de unidades de enzima por mg de proteína (unidades/mg). La actividad específica es una medida de la pureza de la enzima; ésta se incrementa en el proceso de purificación de la enzima y llega a ser máxima y constante cuando la enzima esta pura (Cruces, 2003).

Los diferentes líquidos tienen distintas propiedades, una de estas propiedades es la viscosidad, se puede efectuar medidas de viscosidad para determinar la actividad enzimática en sustratos.

La viscosidad es una propiedad que describe la resistencia que tiene un líquido o gas a fluir como consecuencia de los rozamientos internos de las moléculas que lo constituyen; la fuerza con la que una capa en movimiento arrastra consigo a las capas adyacentes de fluido determina su viscosidad. Los métodos más utilizados para medir la viscosidad de un fluido se basan en medir la velocidad a la cual éste pasa a través de un capilar.

La unidad de viscosidad absoluta en el sistema internacional es el Pascal por segundo (Pa·s), mientras que la más utilizada es, probablemente, el centipoise Cp (CGS), ya que se adecua más al rango de viscosidad de los fluidos más comúnmente utilizados (Restrepo y Arango 1989).

Algunos de los viscosímetros más sencillos se basan en el análisis del flujo por un tubo capilar, a través del cual el fluido fluye por gravedad; entre ellos tenemos los viscosímetros Cannon – Fenske. Estos viscosímetros se encuentran comercialmente disponibles en vidrio y con varios diámetros del tubo capilar, de manera que se puede minimizar el tiempo de flujo de un fluido viscoso. La  $k$  es una constante propia de cada viscosímetro, que depende

básicamente de la geometría de cada viscosímetro; se puede determinar utilizando un fluido de densidad y viscosidad conocida; normalmente se determina las viscosidades relativas referidas al agua (Ruíz, 2005).

## **2.5 Hipótesis**

### **2.5.1 Hipótesis Nula:**

Las soluciones extractoras (etanol y cloruro de sodio) no conducen a la obtención de un concentrado con papaína a partir de la papaya, medida por la actividad enzimática.

### **2.5.2 Hipótesis Alternativa:**

Las soluciones extractoras (etanol y cloruro de sodio) conducen a la obtención de un concentrado con papaína a partir de la papaya, medida por la actividad enzimática.

## **2.6 Señalamiento de Variables**

**Variable Independiente:** Concentrado que contiene papaína.

**Variable Dependiente:** Determinación de la actividad enzimática.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Enfoque**

El enfoque metodológico cuantitativo y cualitativo se presenta en la investigación.

El carácter cuantitativo describe y explica el proceso físico – químico de extracción de un concentrado con la enzima y determinación de la viscosidad que se aplicó de una manera detallada y precisa para que sea de fácil comprensión como un estudio bien definido.

Los valores obtenidos por viscosidad fueron sometidos a análisis estadísticos y matemáticos como una técnica central en el enfoque cuantitativo.

En toda investigación es primordial la comprensión e interpretación de los resultados, que se fundamenta en la metodología cualitativa. El enfoque cualitativo se centra en la teoría que sustenta la investigación y las hipótesis probables con el avance del trabajo.

Estos dos paradigmas se complementaron en el estudio con el desarrollo de ensayos y experimentaciones en el laboratorio y el análisis de los resultados, obteniéndose así una investigación con bases científicas.

#### **3.2 Modalidad Básica de la Investigación**

En el estudio se utilizó la modalidad de investigación documental - bibliográfica que permite recabar información y teorías de diferentes autores obtenida de

libros, textos, revistas, periódicos y otras publicaciones en general, obteniendo la información necesaria y precisa para el desarrollo del tema planteado.

Se efectuó el uso de la investigación experimental en donde en condiciones controladas se observaron los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes, permitiendo una comprensión más específica sobre el trabajo investigativo al utilizar una herramienta estadística para la aplicación en los datos obtenidos permitiendo analizar los factores de estudio con los que se trabajó.

De manera que mediante la experimentación en el laboratorio al utilizar diferentes equipos e instrumentos para efectuarse la investigación fue posible comparar los resultados y verificar las hipótesis de estudio.

### **3.3 Nivel o Tipo de Investigación**

La realización de este trabajo se fundamentó en dos tipos o niveles de investigación:

**Investigación aplicada:** Este tipo de investigación permitió desarrollar los conocimientos teóricos; para verificar la teoría de la realidad mediante pruebas prácticas que confirmen la información bibliográfica. De tal manera que en el laboratorio se realizaron ensayos de extracción y concentración de la enzima, basándose en documentos teóricos comprobados y con las modificaciones correspondientes evaluando la funcionalidad del concentrado obtenido a través de los resultados de actividad enzimática, que servirán como base para continuar con la investigación sobre el tema de estudio.

**Investigación Experimental:** El nivel de investigación experimental utiliza los conocimientos obtenidos de la experiencia práctica desarrollada en el laboratorio, de acuerdo a los resultados de los ensayos efectuados de prueba se realizó un seguimiento de la metodología con la finalidad de mejorar el

proceso utilizado e identificar las características fundamentales del proceso evitando que otros factores intervengan en el desarrollo del trabajo.

### **3.4 Población y Muestra**

#### **3.4.1 Población**

En Ecuador se produce tres variedades de *Carica papaya*:

Hawayana: Esta variedad tiene una forma de pera, su peso puede variar entre 400 y 800 gramos.

Tainung 1 (formosa): Esta especie se destaca porque tiene la pulpa de color rojo y un buen aroma fuerte. Su peso promedio es de 1,1 kilos.

Maradol o Nacional: Esta variedad también se asemeja a la pera, pero es más alargada en relación con la papaya hawaiana. Su peso varía entre 1,5 y 2 kilos.

Estas variedades se cultivan en distintas provincias del Ecuador principalmente en aquellas donde existen climas muy cálidos (Agromar, 2011).

#### **3.4.2 Muestra**

Como materia prima para el desarrollo del trabajo se utilizó la papaya de variedad Tainung 1 (formosa), que se destaca porque posee la pulpa de color rojo – anaranjado y un buen aroma fuerte.

Esta variedad de fruta se adquirió directamente de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas; como materia prima para el desarrollo del estudio se utilizó 4 papayas verdes en total.

### 3.5 Operacionalización de las Variables

**Variable Independiente:** Concentrado que contiene papaína

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
La papaína es una enzima proteolítica que se encuentra en la papaya verde, actúa rompiendo los enlaces peptídicos de las moléculas y presenta diversas aplicaciones.	Enzimas proteolíticas  Papaya verde	Humedad  Materia Seca	¿Cuál es el accionar de las enzimas proteolíticas?  ¿Por qué la papaína se encuentra en los frutos verdes?	Documentos científicos  Internet

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Variable Dependiente:** Determinación de la actividad enzimática.

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
La actividad enzimática indica el grado de funcionalidad que la enzima presenta en un determinado sustrato, que se afecta por factores como el pH o la temperatura.	Funcionalidad en el sustrato  Afección por factores	Viscosidad	¿Cómo se determina la actividad enzimática?  ¿Por qué el pH o la temperatura afectan la actividad de la enzima?	Método de coagulación de la leche propuesto por Balls and Hoover.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

## 3.6 Recolección de la Información

### 3.6.1 Materiales y Métodos

#### 3.6.1.1 Fraccionamiento de la muestra

Se seleccionaron las papayas verdes de mejor apariencia:

**Lavado:** Utilizando agua destilada se lavó la fruta hasta eliminar contaminantes.

**Desinfección:** Se desinfectó la fruta usando alcohol al 70% y nuevamente se lavó con agua destilada.

**Fraccionamiento:** Con un cuchillo se procedió a fraccionar la fruta en cáscara, pulpa y corazón mediante incisiones longitudinales. Para el análisis se empleó la pulpa de la fruta como materia prima para el proceso.

**Trituración:** Se molió la pulpa con un extractor hasta su reducción.

**Filtración:** La muestra se filtró utilizando un cedazo para eliminar cualquier tipo de contaminante.

#### 3.6.1.2 Fase de extracción usando un solvente orgánico y una solución salina.

**Añadir el solvente orgánico:** Se midió el volumen de pulpa obtenido y se multiplicó el volumen resultante por 1,5 ml y esa cantidad se añadió de etanol al 96%.

**Congelación:** La mezcla anterior se colocó en frascos cerrados de 50 ml. Las muestras obtenidas fueron colocadas a -10°C durante 7 días.

**Centrifugación:** Este proceso se efectuó a 4500 rpm durante 20 min.

**Almacenamiento:** El sobrenadante se eliminó y el precipitado se recolectó en frascos cerrados almacenando las muestras para su posterior uso.

**Nota:** Se repitió el mismo procedimiento anterior utilizando la solución extractora cloruro de sodio (al 10%).

### 3.6.1.2.1 Proceso de concentración

**Secado en la estufa:** Las muestras extraídas con etanol y cloruro de sodio se colocaron en cápsulas de porcelana a 40 °C por 48 horas en la estufa, controlando la temperatura del equipo.

**Molienda:** Las muestras secas se procedieron a moler con un pistilo en el mortero hasta obtener un polvo completamente pulverizado.

**Almacenamiento:** El polvo obtenido se almacenó en frascos cerrados y se colocó en refrigeración a 5 °C.

Para la caracterización del concentrado con papaína se determinó el % de humedad y de materia seca con la aplicación de las siguientes fórmulas:

**(Ec.1)**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

**Donde:**

$m_1$  = Peso de la muestra inicial

$m_2$  = Peso de la muestra final

**(Ec.2)**

$$\% \text{ Materia seca} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

### 3.6.1.3 Método para cuantificar la actividad enzimática

#### 3.6.1.3.1 Cálculo de la constante del viscosímetro de Cannon – Fenske

**Limpieza:** Se limpió el viscosímetro con agua destilada, luego con ácido nítrico para remover impurezas, finalmente con agua destilada y se secó con un compresor de aire.



**Preparación del baño termostático:** Se preparó el baño de agua a una temperatura de 20° C.

**Colocación:** Se colocó en el baño termostático el viscosímetro junto con un soporte en posición vertical y se introdujo el agua destilada con la pipeta por el canal más ancho del instrumento.

**Reposo:** Durante 15 minutos se dejó reposar el líquido.

**Medición:** Con el cronómetro se registró el tiempo que tarda el líquido en bajar el nivel desde la marca inferior del bulbo superior al bulbo inferior. Se efectuó el mismo procedimiento 4 veces para asegurarnos de la reproducibilidad de los resultados.

El valor de la constante del viscosímetro se obtiene aplicado la siguiente fórmula:

**(Ec.3)**

$$k = \frac{\mu}{\rho * t}$$

**Donde:**

$\mu$  : Viscosidad del agua a 20°C

$\rho$ : Densidad del agua a 20°C

$t$ : Tiempo de reacción

### **3.6.1.3.2 Medición de la densidad de los sustratos**

**Regulación de la temperatura:** Antes de medir la densidad se reguló la muestra a la temperatura de experimentación.

**Limpieza:** En la probeta se colocó un poco del líquido problema para limpiar el instrumento.

**Colocación:** La muestra se colocó en la probeta y se introdujo el densímetro con mucho cuidado, dando una rotación con los dedos de forma que caiga girando sobre la superficie del líquido.

**Medición:** Una vez que el densímetro se detuvo, se observó el valor en la escala. Este procedimiento se efectuó para medir la densidad de la leche y del jugo de carne.

El valor de densidad se obtuvo aplicado la siguiente fórmula:

**(Ec.4)**

$$p_r = \frac{p}{p_o}$$

**Donde:**

$p_r$ : Densidad relativa o gravedad específica

$p$ : Densidad de la muestra

$p_o$ : Densidad de referencia o absoluta del agua a la temperatura de experimentación.

#### **3.6.1.3.3 Determinación de viscosidad en leche con concentrado proteínico**

El método utilizado para cuantificar la actividad enzimática fue una adaptación del propuesto por Balls and Hoover, en el cual se determinó la viscosidad de los sustratos utilizados.

**Solución 1:** En una balanza analítica se pesó 15,5 g de leche en polvo y se mezcló con 108 ml de agua a una temperatura de 40 °C; manteniendo en constante agitación hasta que se disuelva completamente.

**Solución 2:** Se disolvió en 100 ml de vinagre 0,1g de concentrado proteínico con papaína obtenido de cada solución extractora, y se mantuvo en constante agitación.

**Solución 3:** La solución 1 se reguló a 20 °C; y se añadió 10 ml de la solución 2 en la solución de leche manteniendo siempre a la temperatura de experimentación.

**Baño crioscópico:** Se preparó un baño con hielo y sal para colocar las muestras.

**Congelación:** Se tomaron 10 ml de la solución final cada 2 minutos y se colocaron las diferentes muestras enumeradas en el congelador a – 5 °C.

**Regulación de la temperatura:** Se reguló la temperatura de las muestras a 20 °C en el baño termostático en orden de acuerdo a cada medición.

**Medir:** Se registró los tiempos de escurrido de las muestras en el viscosímetro de Cannon – Fenske número 9 siguiendo el mismo procedimiento que se efectuó con el agua destilada, se realizaron dos réplicas de cada muestra con dos cronómetros. Los valores registrados fueron reportados para los cálculos correspondientes.

**Nota:** Se efectuó el mismo procedimiento para determinar la viscosidad de la leche sin adición del concentrado enzimático realizándose dos réplicas en el viscosímetro 9.

#### **3.6.1.3.4 Proceso para determinación de viscosidad en carne con concentrado proteínico**

**Molienda:** En un molino se trituró la carne hasta que la misma se reduzca lo máximo posible y se exprimió en un lienzo hasta obtener la mayor cantidad de jugo.

**Filtración:** Se filtró el jugo de carne recolectado con un papel filtro y se reguló la temperatura a 20°C en el baño termostático.

**Añadir:** Se procedió a añadir 0,1g de concentrado proteínico con papaína obtenido de cada solución extractora disuelto en vinagre a la solución filtrada, en agitación constante.

**Congelación:** Se tomaron 10 ml de la solución final cada 2 minutos y se colocaron las diferentes muestras en el congelador a – 5 °C.

**Regulación de la temperatura:** Se reguló la temperatura de las muestras a 20 °C en orden de acuerdo a cada medición en el baño termostático.

**Medir:** Se registró los tiempos de escurrido de las muestras en el viscosímetro de Cannon – Fenske número 9, siguiendo el mismo procedimiento que se efectuó con el agua destilada, se realizaron dos réplicas de cada muestra con dos cronómetros. Los valores registrados fueron reportados para los cálculos correspondientes.

**Nota:** Se efectuó el mismo procedimiento para determinar la viscosidad del jugo de carne sin adición del concentrado enzimático realizándose dos réplicas en el viscosímetro 9.

Para el cálculo de viscosidad en leche y carne se aplicó la fórmula:

**(Ec.5)**

$$\mu = k * \rho * t$$

**Donde:**

***k*:** Constante del viscosímetro (agua destilada)

***ρ*:** Densidad de la muestra

***t*:** Tiempo de reacción

Para realizar una comparación de la experimentación se efectuó la determinación de la viscosidad en leche y jugo de carne con enzima papaína tipo reactivo adquirida realizándose el mismo procedimiento antes descrito.

### 3.6.2 Factores en Estudio

Viscosidad	Actividad Enzimática
mPa.s	mPa.s / s

### 3.6.3 Diseño Experimental

#### 3.6.3.1 Diseño Factorial 2<sup>n</sup>

Factores	Niveles
<b>A:</b> Soluciones extractoras	<b>Bajo</b> -1: Solución de etanol al 96%  <b>Alto</b> 1: Solución de NaCl al 10%
<b>B:</b> Sustratos proteínicos	<b>Bajo</b> -1: Leche  <b>Alto</b> 1: Jugo de carne

**Respuesta Experimental:** Valores de Actividad Enzimática para cada muestra.

### 3.6.3.1.1 Tratamientos

-1, -1: Extracción con etanol en el sustrato leche.

-1, 1: Extracción con etanol en el sustrato jugo de carne.

1, -1: Extracción con NaCl en el sustrato leche.

1, 1: Extracción con NaCl en el sustrato jugo de carne.

### 3.6.3.1.2 Número de repeticiones

Se efectuaron 2 réplicas para verificar los resultados de la experimentación.

### 3.6.3.1.3 Total de unidades experimentales

8 en total.

### 3.6.3.1.2 Diseño de Bloques Completos

Observaciones	Tratamientos
1	T1
2	T2
3	T3
4	T4
5	T5
6	T6

**Respuesta Experimental:** Valores de Actividad Enzimática para cada muestra y testigo.

### 3.6.3.1.2.1 Tratamientos

**T1=** Extracción con etanol en el sustrato leche.

**T2=** Extracción con NaCl en el sustrato leche.

**T3=** Extracción con etanol en el sustrato jugo de carne.

**T4=** Extracción con NaCl en el sustrato jugo de carne.

**T5=** Testigo papaína comercial en el sustrato leche.

**T6=** Testigo papaína comercial en el sustrato carne.

#### **3.6.3.1.2.2 Número de repeticiones**

Se efectuó 2 réplicas para verificar los resultados de la experimentación.

#### **3.6.3.1.2.3 Total de unidades experimentales**

12 en total

#### **3.6.4 Tipos de análisis estadísticos**

Se utilizaron los programas graficadores Excel, y Statgraphics. Se efectuó el diseño  $2^2$  y un diseño de bloques completos, además se aplicó la prueba de comparación múltiple Tukey.

#### **3.6.5 Parámetros y criterios de evaluación**

Viscosidad y actividad enzimática

#### **3.7 Procesamiento y Análisis**

Con la realización de la parte experimental en la investigación se obtuvo los datos específicos de los factores de estudio que, mediante la aplicación del diseño experimental adecuado fueron tabulados y procesados permitiendo la interpretación de los mismos. Se obtuvo las respuestas experimentales de la investigación; para una mejor visualización de los resultados se aplicó los programas graficadores Excel y Statgraphics.

Se efectuó el análisis minucioso correspondiente a cada uno de los resultados obtenidos, poniendo en práctica la parte teórica en el laboratorio mediante diferentes ensayos que permitieron la comparación con estudios ya realizados y referencias bibliográficas válidas sustentando el proyecto de investigación.

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de los Resultados

##### 4.1.2 Caracterización del concentrado proteínico en polvo

En la Tabla A-1 se detallan los datos de % de humedad utilizando la (Ec.1), y el porcentaje de materia seca aplicando la (Ec.2); para las muestras extraídas con etanol y NaCl, observándose valores promedio para las dos replicas realizadas por duplicado.

##### 4.1.3 Determinación de la viscosidad

###### 4.1.3.1 Constante ( $k$ ) del viscosímetro Cannon – Fenske.

Para el cálculo de la constante  $k$  del viscosímetro se utilizaron los valores de las propiedades físicas del agua a 20°C, densidad ( $\rho$ ) 998,2 kg/m<sup>3</sup>, y viscosidad ( $\mu$ ) 9,93414E-01 mPa.s.

Los datos se reemplazaron en la (Ec.3), obteniéndose diferentes valores de  $k$  para los nueve viscosímetros utilizados que se encuentran reportados en la Tabla A-2.



#### **4.1.3.2 Densidad de leche y jugo de carne**

El valor de  $p_r$  registrado en el densímetro fue de 1,032, el dato de  $p_o$  es la densidad del agua a 20 °C que es 998,2 kg/m<sup>3</sup>, despejando la (Ec.4) se obtuvo la densidad de la leche que se reporta en la Tabla A-3.

Para el jugo de carne el dato de  $p_r$  registrado en el densímetro fue de 1,040, al ser  $p_o$  998,2 kg/m<sup>3</sup>, despejando la (Ec.4), el valor de densidad se reporta en la misma tabla.

#### **4.1.3.3 Viscosidad de leche y jugo de carne**

##### **4.1.3.3.1 Sin adición del concentrado enzimático**

Para obtener un valor de referencia en la experimentación, se determinó la viscosidad de la leche sin adición del concentrado enzimático.

Mediante la (Ec.5) se obtuvo un valor promedio para la viscosidad en leche reportado en la Tabla A-3.

Se efectuó el mismo procedimiento para el jugo de carne, el valor obtenido se observa en la misma tabla, al aplicar la (Ec.5).

##### **4.1.3.3.2 Con concentrado proteínico que contiene papaína extraído con etanol y NaCl**

En la Tabla A-4 se muestran los valores requeridos para el cálculo, la constante del viscosímetro utilizado, la densidad de la leche obtenida, una vez aplicada la (Ec.5) se obtuvo la viscosidad promedio en leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol.

Es importante recalcar que los datos de tiempo de escurrido son valores promedio de las dos replicas efectuadas por duplicado para cada variable de estudio.

De la misma manera para el caso de la leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con NaCl en la Tabla A-5 se observa los valores de viscosidad promedio obtenidas para las dos réplicas por duplicado efectuadas cada dos minutos.

Los datos de viscosidad calculados en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol se observan en la Tabla A-6, de la misma manera se reporta el tiempo de escurrido promedio para las dos réplicas por duplicado.

En la Tabla A-7 se muestran los valores promedio de viscosidad aplicando la ecuación correspondiente para jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con NaCl.

#### **4.1.3.3.3 Con enzima papaína comercial**

Para obtener un dato de comparación se efectuó el mismo procedimiento utilizando la enzima papaína grado reactivo, en la Tabla A-8 se reportan los valores de viscosidad promedios obtenidos en leche.

En la Tabla A-9 se reporta la viscosidad promedio en jugo de carne a la temperatura de experimentación con la misma enzima.

#### **4.1.4 Cuantificación de la Actividad Enzimática**

Mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, y el análisis correspondiente de regresión lineal que estudia la relación de las variables se efectuó la determinación de la actividad enzimática; en el Gráfico B-1 se observa la curva obtenida para papaína extraída con etanol en leche, el Gráfico B-2 indica la regresión lineal para la variable papaína extraída con NaCl en leche.

La ecuación lineal para el sustrato jugo de carne se aprecia en el Gráfico B-3, para papaína extraída con etanol; mientras que en el Gráfico B-4 se puede

observar el valor de actividad enzimática, de papaína extraída con NaCl en jugo de carne.

Se obtuvo también los valores de actividad enzimática para la enzima papaína grado reactivo efectuándose un análisis de regresión lineal, en el Gráfico B-5 se observa la curva para el caso de la leche, mientras que en el Gráfico B-6 para el jugo de carne.

Para ajustar los datos a una mejor curva y el análisis de las variables de estudio se aplicó la regresión polinómica de orden 3 para todos los casos; en el Gráfico B-7 se puede apreciar los cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída con etanol en leche, para la papaína extraída con NaCl en el mismo sustrato este análisis matemático se observa en el Gráfico B-8.

Los cambios ocurridos en jugo de carne con papaína extraída con etanol se puede apreciar en el Gráfico B-9, y en el Gráfico B-10 la viscosidad en función del tiempo para papaína extraída con cloruro de sodio en jugo de carne, con la correspondiente Regresión Polinómica.

De la misma manera se realizaron las gráficas correspondientes de regresión polinómica para la enzima papaína grado reactivo, en el Gráfico B-11 se observan los cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de la enzima en leche, y para el jugo de carne este análisis se evidencia en el Gráfico B-12.

Los valores de actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo obtenidos para cada sustrato con la solución extractora se reporta en la Tabla C-1. Los datos de Actividad Enzimática obtenidos con enzima papaína grado reactivo durante la experimentación se indica en la Tabla C-2 para la solución de leche y jugo de carne.

Los datos de la Tabla C-1, fueron ingresados en el programa Statgraphics, se realizó el diseño  $2^2$ , la optimización del diseño se reporta en la Tabla C-3, el cuadro de análisis de varianza ANOVA se muestran en la Tabla C-4.

Los factores que intervienen en el estudio se visualizan en el Gráfico C-1, mientras que en el Gráfico C-2 se presenta la respuesta de Superficie para ambos factores.

Se efectuó un diseño de bloques completos con los testigos como se puede apreciar en la Tabla C-5. Se aplicó además la prueba de comparación múltiple Tukey al 5 % que se reporta en la Tabla C-6, en el Gráfico C-3 se indica la misma variable para los diferentes tratamientos. Finalmente en la Tabla C-7 se reporta el cuadro de Análisis de Varianza para el diseño de bloques corregido.

## **4.2 Interpretación de Datos**

### **4.2.1 Materia Prima**

Se utilizaron 4 papayas verdes en total; es de importancia recalcar que el grado de maduración de la fruta es un factor significativo ya que estudios realizados recomiendan seleccionar las plantas que tengan frutos verdes, debido a que en ellos se encuentra una elevada actividad enzimática en comparación con papayas maduras y pintonas.

### **4.2.2 Extracción de las muestras con etanol y NaCl**

Para el proceso de extracción se trabajó con etanol al 96%, y NaCl al 10%.

La adición de un disolvente orgánico, como acetona o alcohol, provoca la disminución de la solubilidad de la proteína, y por ello se utiliza frecuentemente la adición de estos disolventes para precipitar proteínas. Con concentraciones de sales muy solubles, se observa precipitación salina de las proteínas, lo que a su vez provoca la disminución de las interacciones solubilizantes entre el agua y los grupos de la proteína. Es decir que cuando aumenta mucho la cantidad de

iones extraños, la interacción proteína – proteína se hace mayor que la interacción proteína – agua, baja la movilidad de las cargas proteicas y las proteína precipitan (Tébar, 2009).

Ambas sustancias permitieron extraer la proteína deseada en la solución y su precipitación tras el proceso de centrifugación; se obtuvo mayor cantidad de precipitado con cloruro de sodio ya que la papaína al ser una proteína globular tiende a un mayor desorden con soluciones salinas.

#### **4.2.2.1 Concentrado proteínico en polvo**

El precipitado obtenido tras el proceso de centrifugación fue sometido a un proceso de secado, se registro el peso inicial y final para cada muestra; se obtuvo el porcentaje de humedad que indica la pérdida de peso de la muestra por evaporación de agua; para el concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol el porcentaje fue de 7,2, mientras que para el caso del cloruro de sodio fue de 4,1. Estos valores se confirmaron con los datos de materia seca que indica la cantidad de muestra menos el agua contenida en la misma, para el caso del etanol el valor obtenido fue de 92,8, mientras que para la muestra extraída con sal fue de 95,9.

El porcentaje de humedad para las muestras extraídas con etanol fue mayor que el cloruro de sodio ya que ésta es una sustancia higroscópica, de manera que el concentrado extraído con etanol se presentó más seco.

#### **4.2.3 Viscosidad**

##### **4.2.3.1 Constante (k) del viscosímetro Cannon – Fenske**

En el laboratorio se realizaron los ensayos en 9 viscosímetros de Cannon - Fenske; se trabajó con agua destilada a la temperatura de experimentación 20 °C y se registraron los tiempos efectuándose dos réplicas por duplicado para cada viscosímetro.

De acuerdo a los datos se optó trabajar con el viscosímetro número 9, donde la constante obtenida fue de  $2,8434E-05$  ( $m^3 \cdot mPa/kg$ ), este valor indica que el líquido fluye a un promedio de tiempo no tan rápido ni tan lento ya que el capilar no es muy ancho, por tanto es posible tomar datos reales y no se dificulta registrar los tiempos por parte del experimentador.

#### **4.2.3.2 Densidad de leche y jugo de carne**

La densidad para ambos sustratos se efectuó en un densímetro, esta propiedad física permitió comparar las masas de las muestras utilizadas, bajo las mismas condiciones; como resultado la densidad de la leche fue  $1030$  ( $kg/m^3$ ) siendo menor que la del líquido de la carne donde se obtuvo un valor de  $1038$  ( $kg/m^3$ ); la causa que indica la variación del valor es la composición química del sustrato.

La composición química del tejido muscular contiene 67 por ciento (%) de agua, 20 % de proteínas, 8 % de lípidos, 2 % de glúcidos y en torno a un 1 % de sales minerales (Castro, 2008); mientras que en la leche el % de agua es 87%, grasa 34 %, 5 % de lactosa, 4 % de proteína, sales minerales 0,7% (Arias y Espinel, 2006)

Bibliográficamente la densidad a  $20$  °C de la leche de vaca es: Min  $1.0296$  y Máx  $1.0340$   $g/cm^3$  (Agroin, 2005); de manera que el valor obtenido fluctúa en este intervalo. Para el jugo de carne no se encontraron valores bibliográficos puesto que se efectuó la obtención de la densidad del líquido de la carne y no de la carne en sí.

#### **4.2.3.3 Viscosidad de leche y jugo de carne**

##### **4.2.3.3.1 Sin adición del concentrado enzimático**

Se registró el tiempo de escurrido de la leche y del líquido de la carne para el cálculo de la viscosidad como medida de referencia para la experimentación;

obteniéndose un valor de viscosidad mucho mayor para el jugo de carne de 2,52 (m Pa.s), y para la leche fue de 2,30 (m Pa.s).

La viscosidad aumenta con el contenido de grasa, las moléculas relativamente pequeñas apenas afectan a la viscosidad, lo contrario a lo causado por las macromoléculas (Agroin, 2005).

En la leche, es función del número y tamaño de sus partículas, sobre este parámetro influye principalmente las proteínas y la materia grasa, el efecto de la lactosa y de las sales es menos importante (Arias y Espinel, 2006).

De manera que el jugo de carne contiene mayor porcentaje de proteínas y componentes en su constitución lo que hace que sea una sustancia más viscosa que la leche.

Los valores de viscosidad de ambos sustratos sin adición del concentrado proteínico fueron menores a la viscosidad calculada con adición del concentrado, evidenciando así que el concentrado proteínico con papaína obtenido dio buenos resultados ya que se produjo cambios en la viscosidad como se describe en el siguiente numeral.

#### **4.2.3.3.2 Con concentrado proteínico que contiene papaína extraído con etanol y NaCl**

En toda la experimentación se pudo evidenciar que a medida que aumentó el tiempo de escurrido de todas las muestras, los valores de viscosidad calculados también fueron ascendiendo, debido a que el concentrado proteínico que contiene papaína tuvo un efecto sobre ambos sustratos.

Una acidificación en leche provoca una profunda desorganización de la micela acompañado de una modificación de la estructura cuaternaria de la caseínas, lactoalbúmina y lactoglobulinas proteínas de la leche (Fernández M, 2005).

Las proteínas de la carne miofibrilares (miosina y actina), sarcoplasmáticas (mioglobina y hemoglobina) y las proteínas del estroma (colágeno y elastina) sufren una alteración en la estructura por procesos de acidificación (Castro, 2008).

Al adicionar la solución de vinagre con el concentrado proteínico que contiene papaína a la solución de leche, ésta sufrió un proceso de coagulación, por la hidrólisis de los enlaces peptídicos. En el líquido de la carne de igual manera se visualizó un cambio, ya que el vinagre con el concentrado proteínico degrada las proteínas, provocando que la sustancia tome una apariencia heterogénea al igual que en la leche.

La curva que representa los valores de viscosidad calculados para jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol en función del tiempo, fue la más alta, debido a que se efectuó una hidrólisis mayoritaria de los enlaces, por tanto la solución se demoró más tiempo en atravesar el bulbo del viscosímetro. Para la leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol los tiempos de escurrido fueron un tanto menores al igual que los valores de viscosidad.

El rango de tiempo de escurrido registrados en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante NaCl fue menor que las muestras anteriores, por ende también los valores de viscosidad, ya que no se rompen los enlaces de manera eficaz. En el caso de la leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con NaCl no se obtuvieron resultados iguales ya que el tiempo y la viscosidad obtenida fue la más baja en comparación a los demás.

#### **4.2.3.3.3 Con enzima papaína grado reactivo**

La experimentación demostró que con una enzima más concentrada, en el líquido de la carne, los tiempos registrados son más altos de todas las mediciones realizadas, obteniéndose una mejor curva, para el caso de la leche los tiempos de escurrido fueron un tanto menores sin embargo la enzima funcionó en ambos sustratos.

La enzima papaína importada al ser más concentrada llega a un punto en el cual rompe todos los enlaces de las proteínas provocando que la sustancia se vuelve más viscosa, efectuándose una hidrólisis total, por ende al no tener más



sustrato en el cual actuar, los últimos valores de tiempo de escurrido de la muestra se vuelven constantes ya que no existe actividad enzimática.

#### 4.2.4 Actividad Enzimática

La evaluación de la actividad se fundamentó en la medición de viscosidad de los sustratos basándose en el Método de Balls y Hoover, conocido como el método de coagulación de la leche; que determina el tiempo necesario para que una cantidad conocida de enzima coagule un determinado volumen de solución de leche; la actividad se expresa en términos de unidades de leche coagulada por gramo de preparado enzimático (Aguirre y Castillo, 2009).

Para determinar la actividad enzimática, se realizó un análisis de regresión lineal a los datos obtenidos, cada una de las gráficas corresponde al tiempo de actividad enzimática expresado en (s) vs viscosidad en (mPa.s) para cada variable, el modelo matemático que describe la relación lineal es:

$$y = bx + a$$

La pendiente o ángulo de inclinación  $b$  corresponde al valor de actividad enzimática. Este valor se obtuvo tomando solo los puntos de máxima actividad de la curva, la mayor actividad se presentó en el rango de tiempo de 360 a 720 segundos para todos los casos.

El jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída con etanol fue la muestra que presentó un valor mayor de actividad enzimática de 0,004883 (mPa.s / s), seguida de leche con concentrado extraído por la misma solución el dato obtenido fue de 0,004472 (mPa.s / s); el dato de actividad del líquido de la carne con concentrado que contiene papaína extraída con NaCl fue 0,003911 (mPa.s / s), mientras que el valor más bajo se produjo en la leche con concentrado extraído con NaCl de 0,003472 (mPa.s / s).

Para la enzima papaína grado reactivo se obtuvo un valor de actividad enzimática de 0,0080 (mPa.s / s) en el líquido de la carne se obtuvo un valor mucho mayor en comparación a las variables de estudio, en la leche se obtuvo un valor de actividad un tanto menor de 0,0070 (mPa.s / s).

La regresión polinómica de orden 3 permitió un análisis más profundo de las variables y ajustar los puntos a la curva para todos los casos, con este análisis se obtuvo la siguiente ecuación:

Ejemplo: Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída con etanol en jugo de carne, con la correspondiente Regresión Polinómica.

$$y = -4E-09x^3 + 7E-06x^2 + 0,0008x + 3,4755$$

Esta ecuación representa cada fase de la curvatura:

3,4755= Fase inicial donde el concentrado proteínico empieza a reconocer el sustrato y su conformación estructural.

0,0008x = Periodo donde la enzima inicia su función de hidrólisis

7E-06x<sup>2</sup> = Mayor actividad enzimática produciéndose los mayores cambios en el sustrato por acción de la enzima.

-4E-09x<sup>3</sup> =Se produce la última curvatura y la función es asintótica es decir los valores son constantes porque se ha terminado el sustrato en el cual actuar.

La descripción anterior de lo que ocurre en cada etapa de la curva se produce en todas las gráficas dependiendo de la solución extractora y el sustrato en el que actúa el concentrado proteínico.

Las respuestas experimentales es decir los valores de actividad enzimática fueron analizados en el programa Statgraphics, se realizó un diseño 2<sup>2</sup> y un diseño de bloques completos.

Se optimizó el diseño 2<sup>2</sup> y se obtuvo el nivel óptimo para cada factor, para el factor A la mejor solución extractora fue etanol es decir el nivel bajo, mientras

que para el factor B el sustrato en el que se produjeron los mejores resultados fue en jugo de carne representado como nivel alto.

El cuadro de análisis de varianza indica que existe diferencia significativa para el factor A y B, ya que valor de  $F_t$  es inferior al valor de la razón de varianza.

El nivel óptimo para la extracción es trabajar con etanol y la máxima actividad del concentrado con papaína se produce en el sustrato jugo de carne como se evidencia en el Gráfico C-1; las condiciones de función óptima del concentrado se pueden evidenciar en el Gráfico C-2 la figura tridimensional representa una respuesta de superficie; que indica el efecto de los factores, donde la solución extractora etanol es el punto máximo u óptimo, y el jugo de carne como el mejor sustrato proteínico.

Para efectuar la comparación respecto al testigo se aplicó un diseño de bloques completos, se realizó un análisis por separado para cada testigo, uno para ambos testigos y finalmente un diseño de bloques sin testigos, permitiendo el ajuste de los datos; el cuadro de análisis de varianza indica que si existe diferencia significativa entre los tratamientos, por tanto los tratamientos utilizados en el estudio son diferentes.

Se aplicó la prueba estadística de comparación múltiple Tukey al 95%, que refleja que el mejor tratamiento es el 6 que es el testigo papaína grado reactivo en el sustrato carne, seguido del tratamiento 5 que corresponde al testigo papaína grado reactivo en el sustrato leche, seguidamente el número 3 extracción con etanol en el sustrato carne, el tratamiento 1 extracción con etanol en el sustrato leche, a continuación la extracción con NaCl en el sustrato carne que es el 4, y finalmente el tratamiento 1 que corresponde a extracción con etanol en el sustrato leche, de tal manera que se visualiza claramente que en los testigos se obtuvo valores mayores, y las muestras objeto de estudio se presentan en orden del mejor tratamiento.

Se realizó un gráfico general para la prueba de Tukey en donde se observa la diferencia entre los tratamientos y los valores más altos que representan los mejores resultados.

Finalmente se elaboró una tabla completa con los datos finales corregidos para ambos testigos, donde el factor A y el Factor B presentan diferencia significativa, es decir que la actividad enzimática del concentrado que contiene papaína varía con cada solución extractora, de la misma manera el cumplimiento de su función es diferente en cada sustrato proteínico. El testigo 1 y 2 también presentó diferencia significativa respecto al valor de tablas de tal manera que actividad de la enzima es diferente de acuerdo al sustrato en el que actúa.

### **4.3 Verificación de la Hipótesis**

De acuerdo a los análisis efectuados la hipótesis nula se rechaza, por ende se acepta la hipótesis alternativa que indica que las soluciones extractoras (etanol y cloruro de sodio) conducen a la obtención de un concentrado con papaína a partir de la papaya, medida por la actividad enzimática.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

**5.1.1** La investigación se centró en medir la actividad enzimática de la pulpa de papaya, obteniéndose resultados satisfactorios que demostraron que existe cierta cantidad de enzima que puede ser extraída y concentrada con una metodología adecuada de la pulpa y no solamente del látex de la papaya. Se logró la extracción del concentrado proteínico con papaína con etanol y cloruro de sodio, obteniéndose mejores resultados con el solvente, el estudio demostró que la enzima si llega a un punto de concentración a 40 °C por 48 h, la evaluación de la actividad enzimática del concentrado que contiene papaína se realizó mediante la adaptación de un método viscosimétrico, que se fundamenta en la medición de la velocidad de reacción de la enzima sobre los enlaces peptídicos de los sustratos leche y jugo de carne; se aplicó un análisis de regresión lineal y se obtuvo los valores de actividad enzimática para cada muestra; en el jugo de carne se obtuvieron mejores resultados que en la leche, sin embargo el concentrado que contiene papaína actúo en ambos sustratos.

**5.1.2** Se realizó la extracción del concentrado con papaína utilizando un solvente orgánico etanol al 96% y una solución de cloruro de sodio al 10%, ambas sustancias permitieron la precipitación de la proteína y separación del resto del componentes en su estructura por

centrifugación, con el cloruro de sodio se obtuvo mayor cantidad de precipitado es decir de proteína en comparación con el solvente, sin embargo tras el proceso de secado el concentrado proteínico con papaína extraído mediante etanol se presentó más concentrado es decir más seco por tal motivo esta variable afectó los resultados.

**5.1.3** El proceso de secado se realizó en la estufa a 40 °C durante 48 h, ya que temperaturas mayores provocan desnaturalización de la enzima, y a esta temperatura hay menor pérdida de actividad enzimática; las muestras se presentaron un tanto granuladas, de manera que se trituró hasta obtener un polvo seco y se almacenaron a 5 °C para mantener estable la actividad enzimática y no perder las propiedades. Este proceso permitió una mejor concentración de la enzima, de acuerdo al valor obtenido de humedad y de materia seca, el concentrado proteínico con papaína extraído con etanol registró un valor menor de peso por pérdida de agua es decir se encontró más seco y al estar más concentrado se produjeron mejores resultados que el concentrado extraído con cloruro de sodio.

**5.1.4** Para cuantificar la actividad enzimática del concentrado proteínico que contiene papaína se adaptó un método viscosimétrico, se registró los tiempos de escurrido de la muestra problema en el viscosímetro de Cannon – Fenske. Los valores de tiempos y viscosidad variaron para cada sustrato dependiendo de la solución extractora. El etanol permitió una mejor extracción de la enzima, de tal manera que los enlaces de las proteínas de ambos sustratos se rompen rápidamente ya que la enzima está más concentrada y provocan que la solución se torne más viscosa y demore más tiempo en escurrir; el efecto de cloruro de sodio fue menor, esta sustancia no permitió una buena extracción, por tanto no se rompió en mayor proporción los enlaces del sustrato y las soluciones fluyen con mayor rapidez en el viscosímetro.

**5.1.5** Se trabajo en los sustratos proteínicos leche y jugo de carne, se adaptó un nuevo método de extracción del líquido de la carne; el concentrado obtenido permitió la hidrólisis de los enlaces peptídicos en ambos sustratos, sin embargo en el jugo de carne se obtuvo valores de viscosidad mayores conforme aumentó el tiempo, en la leche los valores fueron un tanto menores, esto se debe a la composición estructural de cada sustrato, ya que la viscosidad de una sustancia depende del tamaño de las moléculas que la constituyen, así como del contenido de grasa y proteínas por tal motivo la viscosidad del líquido de la carne fue mayor.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

**5.2.1** En el estudio se trabajó con *Carica papaya*, se propone efectuar la cuantificación de la actividad enzimática en otra variedad de papaya para conocer si existe diferencias en cuanto a la cantidad de enzima que puede ser extraída y la actividad enzimática que presenta la misma.

**5.2.2** Realizar un estudio alternativo, con una metodología diferente, utilizando otro tipo de solvente y otra sal para comparar resultados en cuanto a la pureza de la muestra.

**5.2.3** Utilizar otro tipo de sustrato que presente un porcentaje de proteínas considerable en donde se pueda medir la velocidad de hidrólisis de los enlaces por efecto de la enzima.

**5.2.4** En la presente investigación se trabajó con cantidades relativamente pequeñas de enzima, se debe realizar pruebas previas a la experimentación sobre la cantidad de enzima que se requiere ya que con cantidades excesivamente elevadas no se podrá medir el tiempo de reacción durante la experimentación.

- 5.2.5** Siempre que se efectúe un análisis sobre extracción de enzima procurar almacenar las muestras a una temperatura baja generalmente 4 °C para no alterar sus propiedades.
- 5.2.6** Para realizar medidas de densidad se recomienda mantener limpia y seca la probeta para evitar errores experimentales durante la medición.
- 5.2.7** La limpieza del viscosímetro es importante si se requiere de repetidas mediciones; se puede utilizar ácido nítrico para este proceso que permite digerir las moléculas que se pegan en las paredes del instrumento.



## CAPITULO VI

### PROPUESTA

#### 6.1 Datos Informativos

- **Título:** Análisis de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína obtenida de la papaya (*Carica papaya*), mediante la aplicación de un método viscosimétrico en soluciones proteínicas.
- **Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- **Beneficiario:** Estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Industrias del sector Alimenticio.
- **Director del Proyecto:** Ing. Juan de Dios Alvarado.
- **Personal Operativo:** Egda. Cristina Chimborazo.
- **Tiempo de Duración:** 8 meses.
- **Lugar de Ejecución:** Ambato – Ecuador.
- **Costo:** \$ 3032.

#### 6.2 Antecedentes de la propuesta

Según Aguirre y Castillo (2009), las plantas son una fuente de un gran número de enzimas para distintos usos a nivel mundial.

La industrialización de frutas en nuestro país está limitada hacia la exportación de jugos, concentrados, conservas y mermeladas, sin considerar otros principios activos que contiene las frutas como subproductos, sean estos proteicos o enzimáticos los cuales pueden ser usados como colorantes,

clarificantes, saborizantes y coadyuvantes de ciertas reacciones químicas en la elaboración de otros productos.

La papaya se consume principalmente como fruta, además se usa para preparar refrescos, jugos, mermelada, fruta en almíbar o cristalizada, también produce látex que se extrae de los frutos verdes y tallo, el cual contiene una enzima que favorece la digestión de las proteínas y es usada en la industria farmacéutica, alimenticia, textil y otras (Jiménez, 2002).

La papaína es el constituyente activo proteolítico presente en la fruta tropical papaya (*Carica papaya*); su aprovechamiento es total, hojas, fruta y tallo, ya que poseen alcaloides calpaínas y la enzima papaína utilizada ampliamente.

El mercado mundial de la papaína se encuentra en expansión, con vista al desarrollo de productos en los cuales se utiliza el fruto fresco y antes de su madurez total, donde se tiene el máximo tamaño y mayor producción de enzimas proteolíticas cuando todavía su coloración es verde (Gutiérrez y otros, 2009).

En general las enzimas se cuantifican siguiendo la actividad de la reacción que catalizan y se acepta, en principio, que dicha actividad es proporcional a la cantidad de enzima presente.

La actividad enzimática se mide por la desaparición del sustrato o la aparición de algunos de los productos de la reacción, siguiendo dichos cambios en el tiempo (Ferrao y Jácome, 1977).

### **6.3 Justificación**

El proyecto de investigación es fundamental puesto que en Ecuador el estudio sobre enzimas es muy poco explorado.

Existen algunos métodos que permiten la extracción y concentración de enzimas así como la determinación de la actividad enzimática, obteniéndose

diferentes resultados entre método y método; por tal motivo la importancia del estudio radica en la aplicación de un método confiable, económico y factible de ejecutarse de acuerdo a los recursos disponibles.

La necesidad de establecer otro método de extracción y concentración de enzimas permite incentivar la investigación en el área de enzimología y la búsqueda de principios activos que poseen las frutas con aplicaciones inmediatas.

La determinación de la funcionalidad de la enzima es elemental, para esto se aplicará un método de cuantificación de actividad enzimática basado en cambios de viscosidad en sustratos proteínicos.

Mediante la aplicación de esta metodología se logra una eficaz extracción y cierto grado de actividad enzimática, proporcionando información fundamental para la comunidad científica, estudiantes o el sector industrial.

## **6.4 Objetivos**

### **General**

- Analizar la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína obtenida de la papaya (*Carica papaya*), mediante la aplicación de un método viscosimétrico en soluciones proteínicas.

### **Específicos**

- Extraer el concentrado que contiene papaína a partir de la pulpa de papaya.
- Cuantificar la actividad enzimática de un concentrado con papaína mediante viscosidad.
- Comprobar que mediante análisis viscosimétricos es factible la medición de hidrólisis en el sustrato.

## 6.5 Análisis de Factibilidad

El presente estudio es de tipo tecnológico ya que se puede implementar un método confiable para realizar la extracción del concentrado que contiene papaína de la pulpa de la papaya, así como la determinación de su funcionalidad a través de pruebas de viscosidad que indican el tiempo de hidrólisis del sustrato por acción del concentrado proteínico; de tal manera que mediante un método viscosimétrico es factible el análisis de la actividad enzimática. La investigación además es de carácter económico por la técnica a utilizarse ya que no intervienen gran cantidad de reactivos y equipos; siendo de esta manera un proyecto factible de ejecutarse, contribuyendo a futuras investigaciones sobre enzimas.

**Tabla 1.** Costos de la propuesta de investigación.

<b>Concepto</b>	<b>Valor Total (\$)</b>
<b>Recursos Humanos</b>	
Tutor	160
Graduando	270
<b>Recursos Físicos</b>	
Materia Prima	10
Equipos	2400
Reactivos	40
Materiales de Escritorio	20
<b>Recursos Económicos</b>	
Transporte	42
Publicaciones	90
Imprevistos (5%)	151,6
<b>Total</b>	<b>3032</b>

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

## 6.6 Fundamentación

Los enzimas son proteínas altamente especializadas que catalizan numerosas reacciones en los sistemas biológicos. Una propiedad importante es su especificidad a la hora de reaccionar con sustratos, acelerando determinadas reacciones químicas en disolución. En general, un enzima proporciona el ambiente en que una reacción determinada es, energéticamente, más favorable. (Olavide, 2008).

La utilización práctica de las enzimas supera con creces su empleo analítico. Su especificidad y su enorme eficacia catalítica han atraído la atención desde hace mucho tiempo con el fin de emplearlas como catalizadores en reacciones de interés industrial (Hernández, 2006).

La papaya (*Carica papaya*) es la planta de mayor interés económico ya que al provenir de un fruto comestible, es ampliamente utilizada en la industria alimentaria; así también, de los frutos en estado inmaduro se extrae la papaína (proteasa cisteínica), enzima vegetal de uso más difundido la cual es muy utilizada en la industria alimentaria (clarificación de cerveza y ablandador de carne), en la industria farmacéutica (en la preparación de medicamentos) y en la industria textil (curtido de pieles y suavizante de lanas) (Alarcón, 2009).

La papaína (EC 3.4.22.2) es una enzima proteolítica que se obtiene de frutos verdes de papaya (*Carica papaya*). Posee un peso molecular de 23 kDa y está formada por una cadena peptídica de 211 residuos de aminoácidos.

Su importancia económica es considerable puesto que representa las dos terceras partes del mercado de enzimas.

El crecimiento del negocio relacionado con ella ha sido tal en los últimos años, que en la actualidad se calcula en unos 100 millones de dólares anuales, de los cuales el 70% pertenece a las industrias relacionadas con la alimentación (Sinche, 2009).

La propuesta de la investigación se fundamenta en analizar la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína, mediante una metodología adecuada, práctica y confiable; para el proceso de extracción se propone el uso del solvente etanol porque con éste se obtuvieron los mejores resultados ya que se efectuó una ruptura mayoritaria de los enlaces.

Todos los ensayos enzimáticos miden la cantidad de sustrato consumido o la cantidad de producto generado en la reacción, catalizada por la enzima, durante un lapso de tiempo; existen diversos métodos para medir la concentración de sustratos y productos, con el propósito de determinar la actividad enzimática es factible aplicar la propiedad de viscosidad, determinando el grado de hidrólisis de los enlaces peptídicos en soluciones proteínicas mediante el registro del tiempo que se demora el sustrato en fluir en el viscosímetro.

Para determinar el grado de funcionalidad del concentrado obtenido se efectúa un análisis de regresión lineal a los datos de viscosidad y tiempo obtenidos para la determinación de la actividad enzimática mediante el modelo de relación lineal:

$$y = bx + a$$

Donde  $b$  es la pendiente de la gráfica que corresponde al valor de actividad enzimática para cada muestra.

## 6.7 Metodología

**Tabla 2.** Modelo Operativo (Plan de acción).

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Análisis de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína.	Revisión Bibliográfica	Investigador	Humano Técnico Económico	\$ 160	2 mes
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta	Pruebas previas	Investigador	Humano Técnico Económico	\$ 258	3 meses
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Análisis de la Actividad enzimática mediante viscosidad	Investigador	Humano Técnico Económico	\$ 2.512	2 meses
4. Evaluación de la propuesta	Comprobar la funcionalidad de la enzima	Análisis de datos con paquetes estadísticos	Investigador	Humano Técnico Económico	\$ 102	1 mes

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo.

## 6.8 Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Ing. Juan De Dios Alvarado M. Sc y Egda. Cristina Chimborazo.

**Tabla 3.** Administración de la propuesta.

<b>Indicadores a mejorar</b>	<b>Situación actual</b>	<b>Resultados esperados</b>	<b>Actividades</b>	<b>Responsable</b>
<p>Análisis de la actividad enzimática de un concentrado que contiene papaína obtenida de la papaya (<i>Carica papaya</i>), mediante la aplicación de un método viscosimétrico en soluciones proteínicas.</p>	<p>Poca exploración sobre metodologías de extracción de determinación de la actividad enzimática de enzimas vegetales.</p>	<p>Extracción de un concentrado que contiene papaína mediante un método económico y confiable.  Cuantificación de la funcionalidad enzimática a través de viscosidad en sustratos proteínicos.</p>	<p>Extraer el concentrado que contiene papaína a partir de la pulpa de papaya.  Determinar la funcionalidad de la enzima mediante pruebas viscosimétricas  Comprobar que mediante análisis viscosimétricos es factible la medición de actividad enzimática.</p>	<p>Investigador: Ing. Juan De Dios Alvarado M. Sc y Egda. Cristina Chimborazo</p>

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo.



## 6.9 Previsión de la Evaluación

**Tabla 4.** Previsión de la Evaluación.

<b>Preguntas Básicas</b>	<b>Explicación</b>
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Estudiantes de carreras afines al campo de estudio.</li><li>▪ Sector industrial principalmente el sector alimenticio.</li></ul>
¿Por qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Metodologías tecnológicas confiables y económicas.</li><li>▪ Investigación profunda sobre enzimas vegetales.</li></ul>
¿Para qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Confirmar si es factible el análisis sobre actividad enzimática mediante pruebas de viscosidad.</li></ul>
¿Qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Materia prima utilizada.</li><li>▪ Metodología adecuada.</li><li>▪ Datos obtenidos.</li></ul>
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Director del proyecto de investigación.</li><li>▪ Calificadores.</li></ul>
¿Cuándo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Durante el lapso de tiempo desde la iniciación de las pruebas preliminares hasta la obtención de los resultados finales.</li></ul>
¿Cómo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ A través de instrumentos de evaluación.</li></ul>

¿Con qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Experimentación.</li><li>▪ Investigaciones bibliográficas.</li></ul>
-------------------	--

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo.

## MATERIALES DE REFERENCIA

- Acosta, R. 2011. Estudio de la Variación de la Actividad Enzimática Proteolítica del Látex del Babaco (*Vasconcellea heilbornii cv babaco*) en Función de la Edad del Fruto. Tesis de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador. 64 pp: 1. Disponible en: [http://rapi.epn.edu.ec/?page=record&op=view&path\[\]=63360](http://rapi.epn.edu.ec/?page=record&op=view&path[]=63360)
- Acuerdo Ministerial N° 117. Reglamento De La Normativa De La Producción Orgánica Agropecuaria En El Ecuador. 32 pp: 29. Disponible en: <http://www.cofenac.org/documentos/Reglamento-cafes-especiales.pdf>
- Agrogest. 2009. Obtención y usos de la papaína. Disponible en: <http://boards2.melodysoft.com/nen0/el-mercado-de-la-papaina-en-el-mundo-419.html?MAXMSGs=200&ORDERBY=0>
- Agroin. 2005. Aspectos Nutricionales Y Tecnológicos De La Leche. 60 pp:43. Disponible: [http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin\\_doc2.pdf](http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin_doc2.pdf)
- Agromar. 2011. Tres variedades de papaya se consumen. Consultada el 21/11/2011. Disponible: [http://www.elcomercio.com/agromar/variedades-papaya-consumen\\_0\\_413358692.html](http://www.elcomercio.com/agromar/variedades-papaya-consumen_0_413358692.html)
- Aguirre, E y Castillo, P. 2009. 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. Ecuador. 7pp:1. Disponible: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123>

456789/7532/1/Extraccion%20y%20Estudio%20Comparativo%20de%20I  
as%20Enzimas%20Proteol%C3%ADticas.pdf

- Alarcón, K. 2009. Estudios de separación de las proteasas del cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A.DC.). Tesis de Maestría en Ciencia en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. México. 57pp:4,13,14. Disponible: <http://www.ceprobi.ipn.mx/WPS/WCM/CONNECT/A5C5E500466C57A89313FB42F2EF43D/KARINAALARCONDOMINGUEZ3BCD.PDF?MOD=AJPERES>
- Alcayaga, O. 2004. Influencia Del Método De Deshidratado Y Época De Extracción En La Actividad Enzimática Del Látex De Papayo Cultivado En Cobquecura Viii Región Chile. Tesis de Ingeniería Civil Agrícola. Universidad De Concepción. Chile. 35pp. Disponible en: [http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2004/alcayaga\\_o/doc/alcaayaga\\_o.pdf](http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2004/alcayaga_o/doc/alcaayaga_o.pdf)
- Arias y Espinel. 2006. Evaluación de la utilización de microfiltración tangencial (MFT) para la fabricación de queso y aprovechamiento de lactosuero. Tesis de Ingeniería Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional Quito – Ecuador. 119pp: 13-14. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2724/1/CD-0402.pdf>
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización). 1999. La papaya un mercado en expansión. 2pp. Disponible en: [http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papaya/trans\\_indus.pdf](http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papaya/trans_indus.pdf)
- Augstburger, F. Berger, J y Otros. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico – Papaya. Alemania. 38: pp: 5. Disponible en: [http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/Espanol/papaya\\_2005.pdf](http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/Espanol/papaya_2005.pdf)

- Barberis & Illanes. 1994. Biotecnología Enzimática. USA. 253 pp. Disponible:<http://sedici.unlp.edu.ar/ARG-UNLP-TPG-000000173/3222.pdf>
- Barrera, I. 2007. Cultivo de células de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift: efecto de un inductor y un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas. Tesis de maestría en ciencias con especialidad en bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México 84 pp: 4. Disponible en: [http://148.204.85.99/recursos/posgrado/Tesis/mc\\_ibarrera.pdf](http://148.204.85.99/recursos/posgrado/Tesis/mc_ibarrera.pdf)
- Bertoluzzo, S. Mayer, L. Bertoluzzo, M. 2007. Diseño y Construcción de un Liofilizador para conservar papaya a temperatura ambiente, como fuente de papaína a bajo costo. Argentina. 3 pp. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/856/85617508051.pdf>
- Cano, E. Martínez, E. Moreno, J. Nieto, J. Silva, F. Vargas, O. 2004. Análisis de Prefactibilidad de la Obtención y Comercialización de la Enzima Papaína. México. 269pp: 89. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAMI11871.PDF>
- (CAR/PL) Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia. 2003. Aplicaciones de la Biotecnología Industrial. Barcelona, España. 132 pp: 11, 14, 15,17 y 20.
- Castro, Fernando. 2008. Carne – Introducción. 205 pp: 3,4 y 5. Disponible:<http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/2149/fichero4%28tesis%29.pdf?sequence=4>
- Chaverri, A. 1983. Comparación de la Actividad Proteolítica de la Papaína secada por diferentes métodos. Tesis de licenciatura en tecnología de los Alimentos. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 87

pp.Disponible:<http://www.cita.ucr.ac.cr/Alimentica/tesis%20completas/Tesis%20111%20completa.pdf>

- Comisión del Codex Alimentarius. 2010. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias - comité del codex sobre aditivos alimentarios (42a reunión). Beijing, China. 17 pp: 12 y 16. Disponible en: [ftp://ftp.fao.org/codex/ccfa42/fa42\\_17s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/ccfa42/fa42_17s.pdf)
- Congreso Nacional. 2006. Ley Orgánica de Salud. Ley 67, Registro Oficial Suplemento 423. Libro I: De las acciones de Salud. Capítulo II: De los Alimentos. 40 pp: 22. Disponible en: [http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Ecuador/EC\\_Ley\\_Organica\\_de\\_Salud.pdf](http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Ecuador/EC_Ley_Organica_de_Salud.pdf)
- Crece (Centro Regional para la Competitividad Empresarial).(s.f). Estudio de Mercado Nacional de la Papaya Maradol. México. 142 pp: 42 – 44. Disponible:<http://www.fuppue.org.mx/CONVERTIDOS%20PDF/estudio%20de%20mercado%20papaya%20maradol.pdf>
- Cruces, E. 2003. Efecto de la inhibición con iodoacetamida sobre la proteasa cisteínica quimopapaína. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 25 pp: 3, 4, 14. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAMI10607.pdf>
- Dávila, G. 2006. El Razonamiento Inductivo y Deductivo dentro del proceso investigativo en Ciencias Experimentales y Sociales. Venezuela. 27pp:6y7. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/761/76109911.pdf>

- FDA (Food and Drug Administration) – Food. 2001. Partial List of Enzyme Preparations That are Used in Foods. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm084292.htm>
- Fernández, J. 2005. Plan de negocios para la producción de papaína en la séptima región. Chile. 115 pp: 15 – 16. Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/retrieve/2978/JFernandezD.pdf>
- Fernández, M. 2005. Estructura y función de proteína y péptidos. pp: 14 – 18. Disponible en: <http://www.itescham.com/Syllabus/Doctos/r637.PDF>
- Ferrao, M. Jácome, C. 1977. Obtención y Determinación de la Actividad Proteolítica de las enzimas de la papaya *Carica papaya* (Linné). México. 37pp:26. Disponible: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/763/1/tesis-05.pdf>
- Glibota, G. Garro, O. Judis, M. 2000. Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya*. Argentina. 4pp. Disponible en: [http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/8\\_exactas/e\\_pdf/e\\_022.pdf](http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_022.pdf)
- Guananga, R. 2009. Cadena Logística de Exportación de Papaya. Ecuador. 84pp:9. Disponible: [http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10336/8/cadena\\_logistica\\_de\\_exportacion\\_papaya-solo.pdf](http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10336/8/cadena_logistica_de_exportacion_papaya-solo.pdf)
- Gutiérrez, M. Geraldine, S. Velásquez, S. Virginia, E. y Ferrer, J. 2009. Determinación del Efecto de la Maduración de la lechosa (*Carica Papaya* L.) sobre la concentración de papaína. Venezuela. 16 pp. Disponible en: <http://www.uru.edu/fondoeditorial/articulos/ARTICULO%20CIENT%3%8DFICO%20SOBRE%20EXTRACCI%3%93N%20DE%20PAPAINA%20DE%20LA%20LECHOSA.pdf>

- Hernández, R. 2006. Producción y Caracterización de un Extracto Proteolítico Termoestable. Tesis en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 121 pp: 11, 12, 13. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAMI14181.PDF>
- Jiménez, J. 2002. El Cultivo de la Papaya Hawayana. Costa Rica. 126 pp: 5. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/90022688.pdf>
- Lehninger. 1982. Bioquímica. Segunda Edición. Barcelona. 315 pp: 223 – 225.
- Luque, V. (s.f). Estructura y Propiedades de las Proteína. 31 pp: 27. Disponible en: [http://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf)
- Mark, J. 2007. Bioquímica. Barcelona – España. 980 pp: 251. Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA252&lpg=PA252&dq=estructura+ciste%C3%ADnas+proteasas+-+cisteina+e+histidina&source=bl&ots=LTsKI3Cr8x&sig=sHYs9Bd9eToFSBNdwaHlVqxp7jk&hl=es&sa=X&ei=09m3T6q5A8L6ggeN4628Cg&ved=0CF4Q6AEwCA#v=onepage&q=estructura%20ciste%C3%ADnas%20proteasas%20-%20cisteina%20e%20histidina&f=false>
- Martínez, J. 2004. Calor de adsorción y estudios de actividad catalítica de una enzima sulfhidrónica sobre SiO<sub>2</sub> mesoporoso con alta área específica. Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 17pp:5. Disponible: <http://148.206.53.231/UAMI11935.PDF>
- Nitsawang, S. Hatti-Kaul, R. Kanasawud, P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step



salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 1. Tailandia. 5 pp. Disponible: <http://www.aseanbiotechnology.info/abstract/23005916.pdf>

- Olavide, Pablo. 2008. Cinética enzimática: determinación espectrofotométrica de la constante de Michaelis-Menten de la papaína. España. 5pp:2. Disponible: [http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/biotec\\_termo/Practica5TyCQ0506.pdf](http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/biotec_termo/Practica5TyCQ0506.pdf)
- Ortiz, A. 1978. Estudios sobre la Actividad Proteolítica y Secado del Látex de la Papaya (*Carica papaya* L.). Tesis en Tecnología de los Alimentos. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 78 pp. Disponible en: <http://www.cita.ucr.ac.cr/Alimentica/tesis%20completas/Tesis%20053%20completa.pdf>
- Ramírez, K. Cruz, M. (s.f). Cinéticas Enzimáticas de Actividades Proteolíticas de productos utilizando látex de papaya (*Carica papaya*) para lograr el ablandamiento de la Carne. México. 1 pp. Disponible en: [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_III/Carteles/CIII-8.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_III/Carteles/CIII-8.pdf)
- Restrepo, F y Arango, L. 1989. Manual de Laboratorio de Química Orgánica–Unamed. México. 4pp:1. Disponible: [http://copernico.escuelaing.edu.co/ceciba/dep\\_cnaturales/upload/file/Laboratorios/QUIM/VISCOSIDAD%20DE%20SOLUCIONES.pdf](http://copernico.escuelaing.edu.co/ceciba/dep_cnaturales/upload/file/Laboratorios/QUIM/VISCOSIDAD%20DE%20SOLUCIONES.pdf)
- Ríos, M. 2010. Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de *Carica papaya*. Tesis de Ciencia en Bioprocesos, Instituto Politécnico Nacional. México. 81 pp: 2. Disponible en: [http://148.204.85.99/recursos/posgrado/Tesis/mc\\_mrrios.pdf](http://148.204.85.99/recursos/posgrado/Tesis/mc_mrrios.pdf)

- Ruíz, Richard. 2005. Medición de la viscosidad de fluidos newtonianos. México. 6 pp: 1 - 2.  
 Disponible: [http://cbi.izt.uam.mx/iq/lab\\_mec\\_de\\_fluidos/Practicas%20Laboratorios/PRACTICA1.pdf](http://cbi.izt.uam.mx/iq/lab_mec_de_fluidos/Practicas%20Laboratorios/PRACTICA1.pdf)
  
- Sinche, M. 2009. Aislamiento, Purificación Parcial y Caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*. Tesis de Ingeniería Agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador. 140 pp: 36 – 42. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1661/1/CD-2218.pdf>
  
- Tébar. 2009. Bioquímica Estructural Tema2 - Proteínas: Definición, concepto y significación biológica. Aminoácidos: Sus clases y propiedades generales. 84 y 85. pp: 107 .Disponible en: <http://www.editorialtebar.com/flash/pdf/Bioquimica%20estructural.pdf>
  
- Valle, M y Alvarado, S. 2003. Estudio de Factibilidad para el Establecimiento de una Planta Procesadora de Papaína Cruda en Honduras. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad Earth. Costa Rica. 95pp:1y10. Disponible: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/ColeccionVirtual/pdf/2000099.pdf>
  
- Vidal, L. Finot, V. Mora, K. Venegas F. 2009. Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcella cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). Chile. 11pp. Disponible: <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v20n6/art12.pdf>
  
- Villavicencio, C. 2011. Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya. Tesis de Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador. 80 pp.

- Viñamagua, M. Sánchez, R. Tene, Á. (s.f). Cuantificación del contenido de papaína y su actividad enzimática en seis especies del género *Vasconcellea* nativas del sur del Ecuador. Loja. Disponible:[http://newsite.utpl.edu.ec/files/image/stories/publi\\_cientificas/cettia/PUB-CETTIA-010.pdf](http://newsite.utpl.edu.ec/files/image/stories/publi_cientificas/cettia/PUB-CETTIA-010.pdf)

**ANEXOS**

**ANEXOS A**

**TABLA DE**

**RESULTADOS**

**Tabla A-1.** Caracterización del concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante Etanol y NaCl.

	<b>*Humedad (%)</b>	<b>* Materia Seca (%)</b>
<b>Sol. Extractora etanol</b>	7,2	92,8
<b>Sol. Extractora NaCl</b>	4,1	95,9

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo.

**Tabla A-2.** Constante  $k$  para la medida de viscosidad en los viscosímetros de Cannon - Fenske.

# Viscosímetro	$\mu$ (mPa.s)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$\frac{=}{* t}$	$k$ (m <sup>3</sup> . mPa/kg)
1	9,93414E-01	998,2	635	1,5685E-06
2	9,93414E-01	998,2	6	1,6587E-04
3	9,93414E-01	998,2	294	3,3851E-06
4	9,93414E-01	998,2	36	2,8034E-05
5	9,93414E-01	998,2	73	1,3727E-05
6	9,93414E-01	998,2	33	3,0158E-05
7	9,93414E-01	998,2	76	1,3182E-05
8	9,93414E-01	998,2	79	1,2638E-05
9	9,93414E-01	998,2	35	2,8434E-05

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-3.** Densidad y Viscosidad para ambos sustratos a la temperatura de experimentación.

	$\rho$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$\mu$ (m Pa.s)
<b>Leche</b>	1030	2,30
<b>Jugo de Carne</b>	1038	2,52

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo



**Tabla A-4.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante etanol.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m3 . mPa/kg)	ρ (kg/m3)	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{* t}$			
Leche	0	0	108,0	2,8434E-05	1030	3,16
	2	120,00	114,5	2,8434E-05	1030	3,35
	4	240,00	123,5	2,8434E-05	1030	3,61
	6	360,00	134,5	2,8434E-05	1030	3,93
	8	480,00	151,5	2,8434E-05	1030	4,43
	10	600,00	169,8	2,8434E-05	1030	4,97
	12	720,00	189,5	2,8434E-05	1030	5,55
	14	840,00	204,5	2,8434E-05	1030	5,99
	16	960,00	211,5	2,8434E-05	1030	6,19
	18	1080,00	215,8	2,8434E-05	1030	6,32
	20	1200,00	219,0	2,8434E-05	1030	6,41

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-5.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante NaCl.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m3 . mPa/kg)	ρ (kg/m3)	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{*t}$			
Leche	0	0	97,5	2,8434E-05	1030	2,86
	2	120	102,75	2,8434E-05	1030	3,01
	4	240	111,25	2,8434E-05	1030	3,26
	6	360	123,75	2,8434E-05	1030	3,62
	8	480	135,5	2,8434E-05	1030	3,97
	10	600	152,5	2,8434E-05	1030	4,46
	12	720	165,5	2,8434E-05	1030	4,85
	14	840	175,75	2,8434E-05	1030	5,15
	16	960	179,75	2,8434E-05	1030	5,27
	18	1080	184,75	2,8434E-05	1030	5,41
	20	1200	188,75	2,8434E-05	1030	5,53

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-6.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante etanol.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m <sup>3</sup> . mPa/kg)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{* t}$			
Carne	0	0	117,8	2,8434E-05	1038	3,48
	2	120	124,5	2,8434E-05	1038	3,68
	4	240	136,5	2,8434E-05	1038	4,03
	6	360	149,5	2,8434E-05	1038	4,41
	8	480	167,8	2,8434E-05	1038	4,95
	10	600	189,3	2,8434E-05	1038	5,59
	12	720	208,5	2,8434E-05	1038	6,15
	14	840	221,3	2,8434E-05	1038	6,53
	16	960	232,8	2,8434E-05	1038	6,87
	18	1080	236,5	2,8434E-05	1038	6,98
	20	1200	240,8	2,8434E-05	1038	7,10

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-7.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con concentrado proteínico que contiene papaína extraída mediante NaCl.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m <sup>3</sup> . mPa/kg)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{* t}$			
Carne	0	0	100,0	2,8434E-05	1038	2,95
	2	120	107,3	2,8434E-05	1038	3,17
	4	240	113,3	2,8434E-05	1038	3,34
	6	360	126,5	2,8434E-05	1038	3,73
	8	480	142,5	2,8434E-05	1038	4,20
	10	600	160,5	2,8434E-05	1038	4,74
	12	720	173,5	2,8434E-05	1038	5,12
	14	840	179,8	2,8434E-05	1038	5,31
	16	960	186,5	2,8434E-05	1038	5,51
	18	1080	190,5	2,8434E-05	1038	5,62
	20	1200	194,5	2,8434E-05	1038	5,74

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-8.** Cálculo de la viscosidad promedio en leche con enzima papaína grado reactivo adquirida.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m <sup>3</sup> . mPa/kg)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{* t}$			
Leche	0	0	185,5	2,8434E-05	1030	5,43
	2	120	196,5	2,8434E-05	1030	5,76
	4	240	208,3	2,8434E-05	1030	6,10
	6	360	223,8	2,8434E-05	1030	6,55
	8	480	241,5	2,8434E-05	1030	7,07
	10	600	280,8	2,8434E-05	1030	8,22
	12	720	306,8	2,8434E-05	1030	8,99
	14	840	322,5	2,8434E-05	1030	9,45
	16	960	332,3	2,8434E-05	1030	9,73
	18	1080	332,8	2,8434E-05	1030	9,75
	20	1200	333,3	2,8434E-05	1030	9,76

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo

**Tabla A-9.** Cálculo de la viscosidad promedio en jugo de carne con enzima papaína grado reactivo adquirida.

T = 20 ° C	Tiempo de toma de muestra		Tiempo de escurrido	k (m <sup>3</sup> . mPa/kg)	ρ (kg/m <sup>3</sup> )	μ (m Pa.s)
	t (min)	t (s)	$\frac{=}{*t}$			
Leche con concentrado proteínico	0	0	209,8	2,8434E-05	1038	6,19
	2	120	220,5	2,8434E-05	1038	6,50
	4	240	232,5	2,8434E-05	1038	6,86
	6	360	250,8	2,8434E-05	1038	7,40
	8	480	275,8	2,8434E-05	1038	8,14
	10	600	315,8	2,8434E-05	1038	9,32
	12	720	346,5	2,8434E-05	1038	10,23
	14	840	354,8	2,8434E-05	1038	10,47
	16	960	359,8	2,8434E-05	1038	10,62
	18	1080	358,0	2,8434E-05	1038	10,57
	20	1200	357,8	2,8434E-05	1038	10,56

\* Valores promedio de dos replicas por duplicado

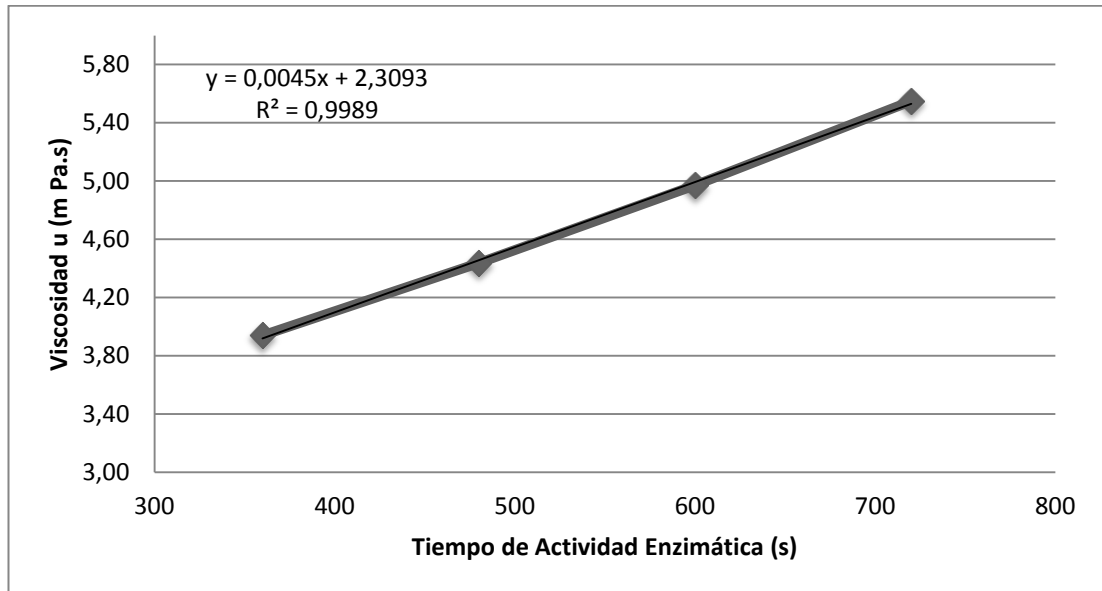
**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

**Elaborado por:** Cristina Chimborazo.

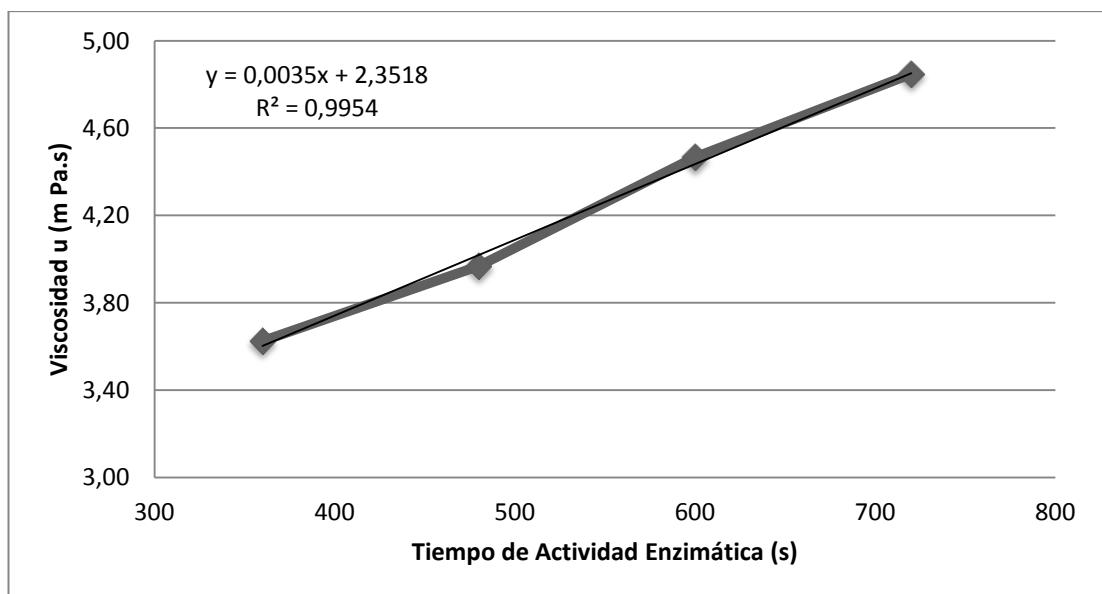
**ANEXOS B**

**GRÁFICAS**

**Gráfico B-1.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante etanol en leche, con la correspondiente regresión lineal.

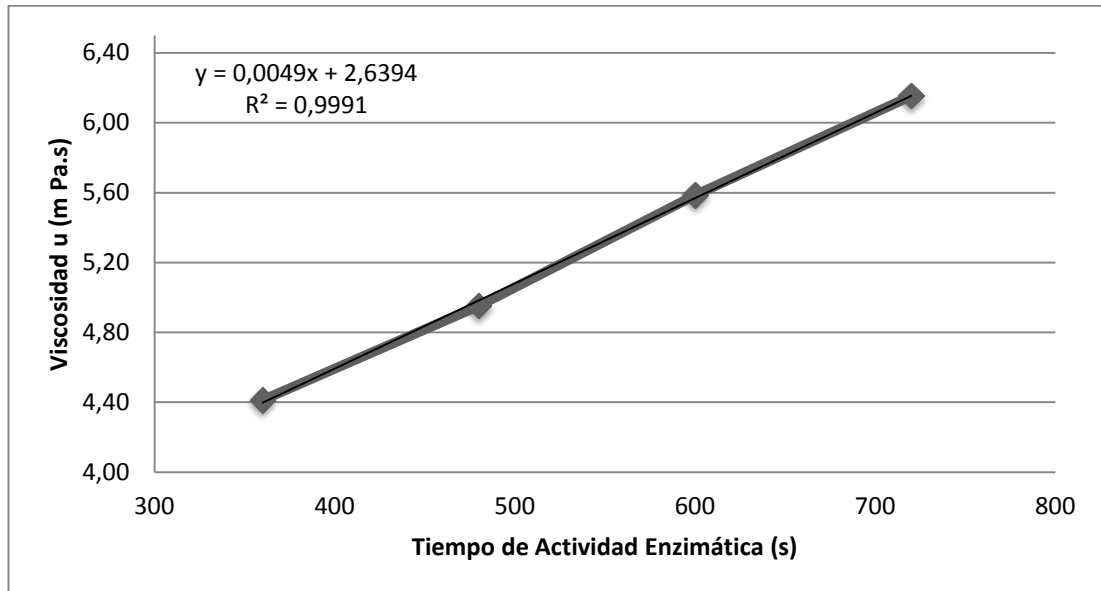


**Gráfico B-2.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante NaCl en leche, con la correspondiente regresión lineal.

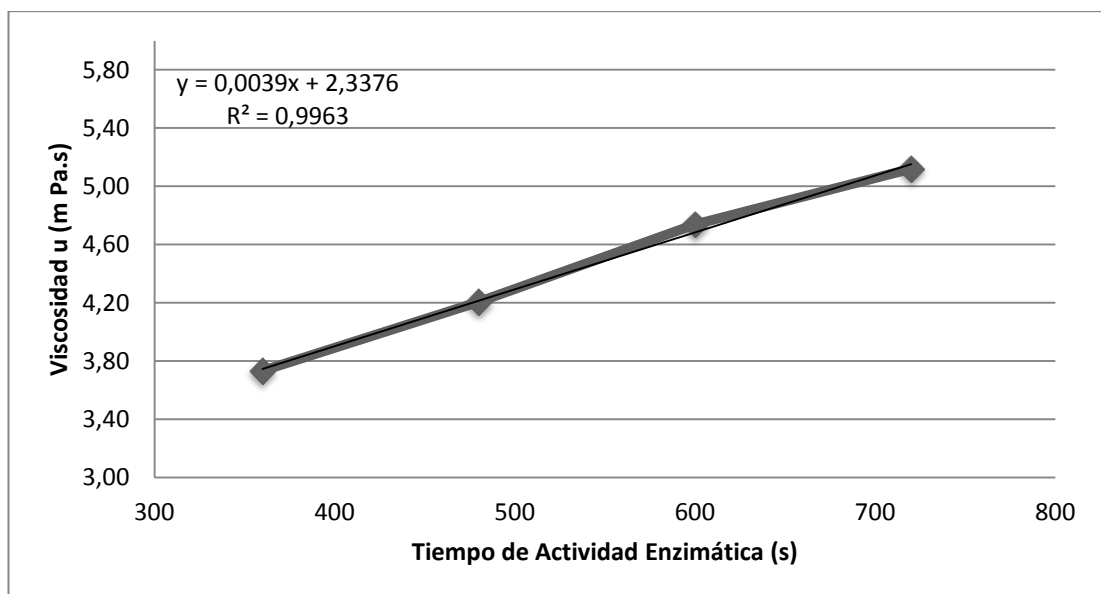




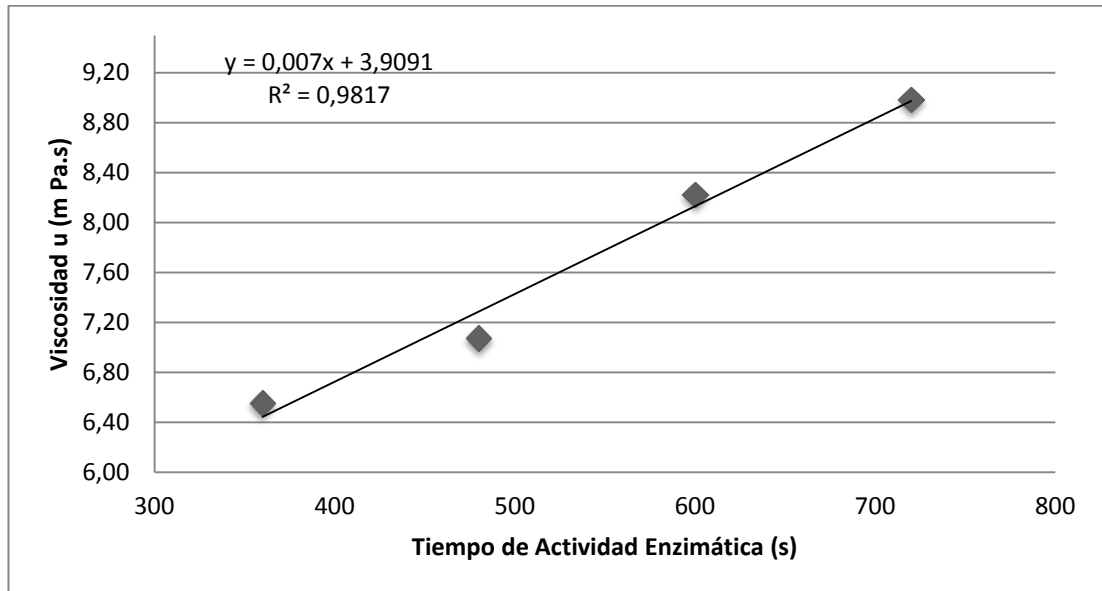
**Gráfico B-3.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante etanol en jugo de carne, con la correspondiente regresión lineal.



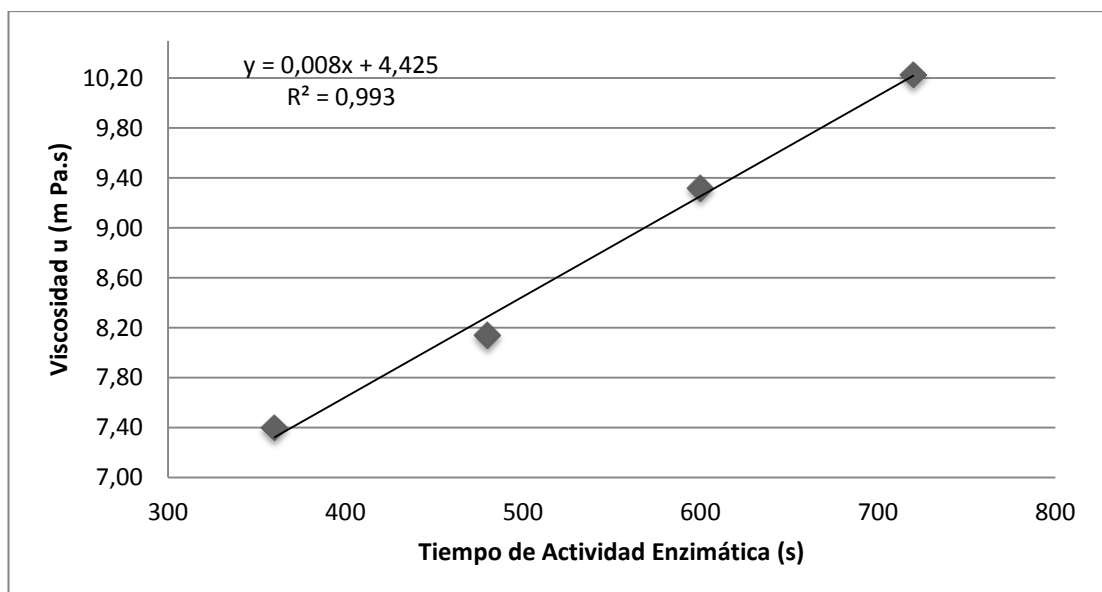
**Gráfico B-4.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de papaína extraída mediante NaCl en jugo de carne, con la correspondiente regresión lineal.



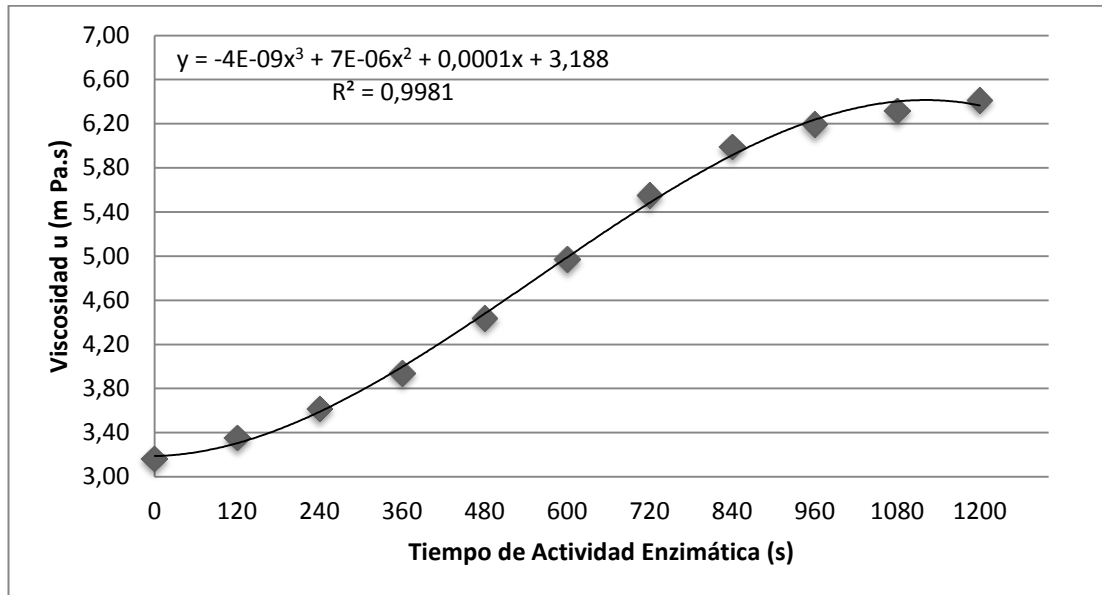
**Gráfico B-5.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de enzima papaína grado reactivo en leche, con la correspondiente regresión lineal.



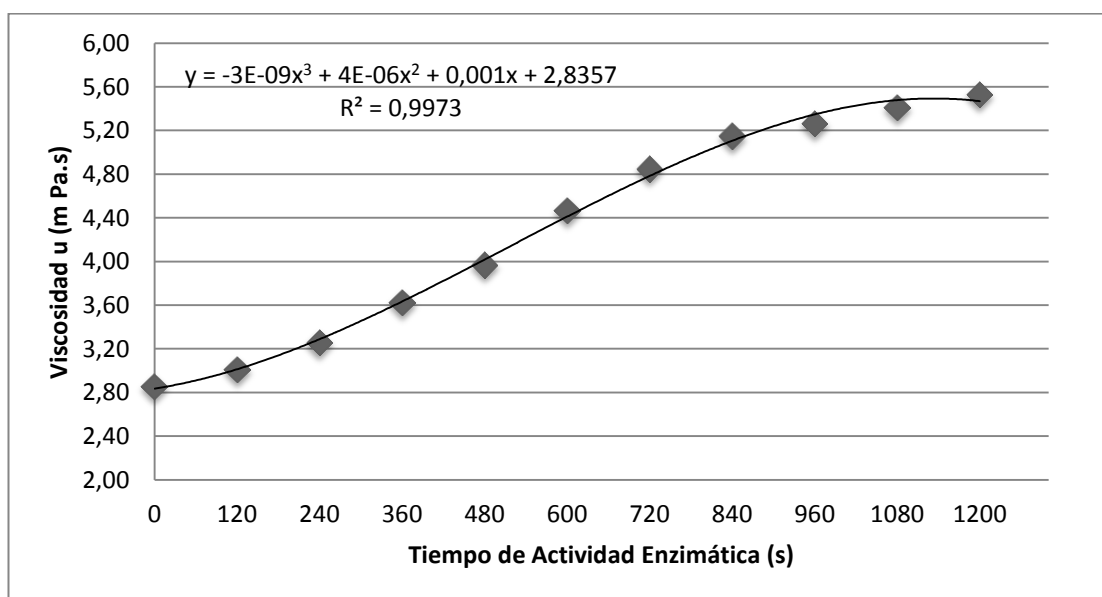
**Gráfico B-6.** Determinación de la actividad enzimática, mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo, de enzima papaína grado reactivo en jugo de carne con la correspondiente regresión lineal.



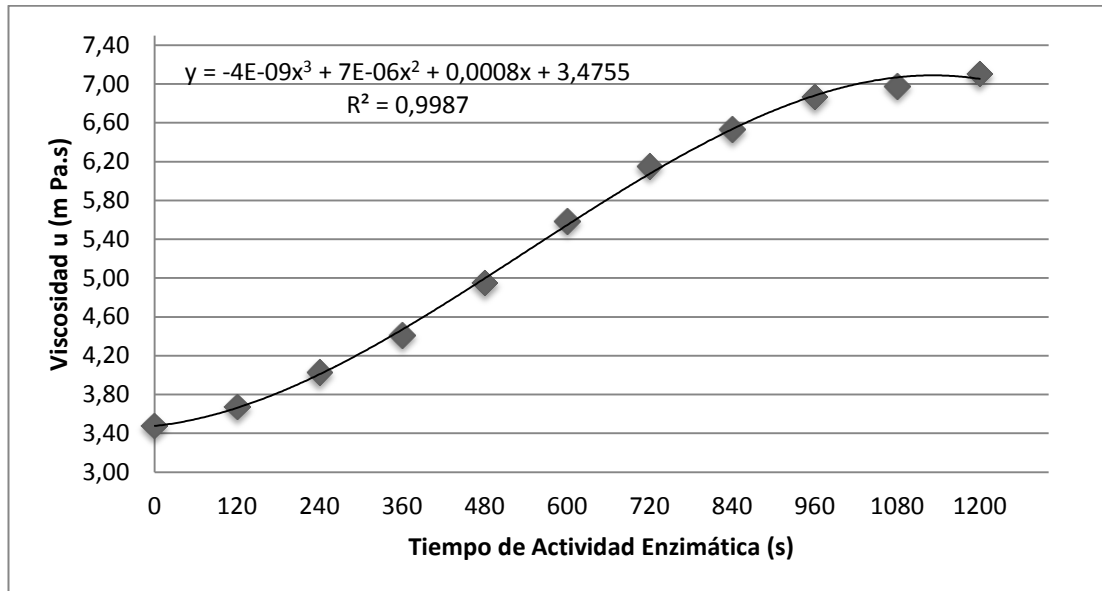
**Gráfico B-7.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante etanol en leche, con la correspondiente regresión polinómica.



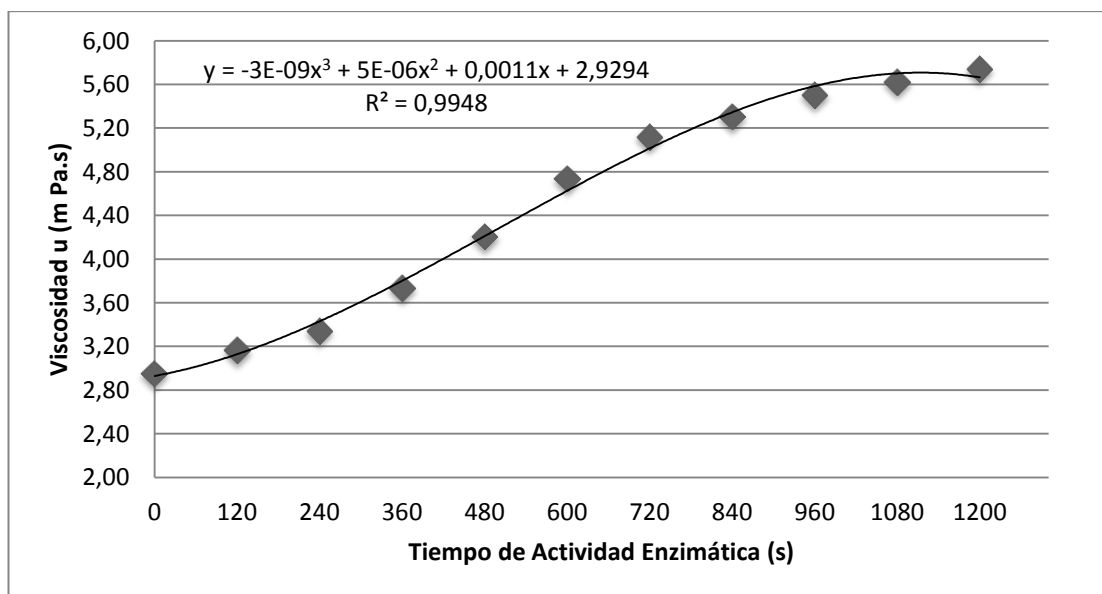
**Gráfico B-8.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante NaCl en leche, con la correspondiente regresión polinómica.



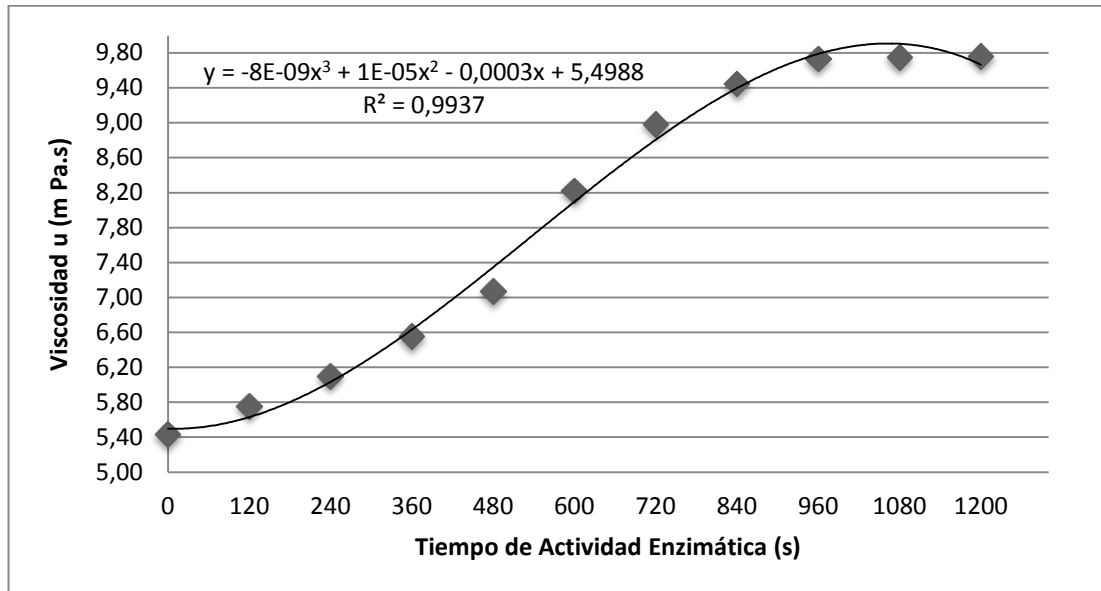
**Gráfico B-9.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante etanol en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.



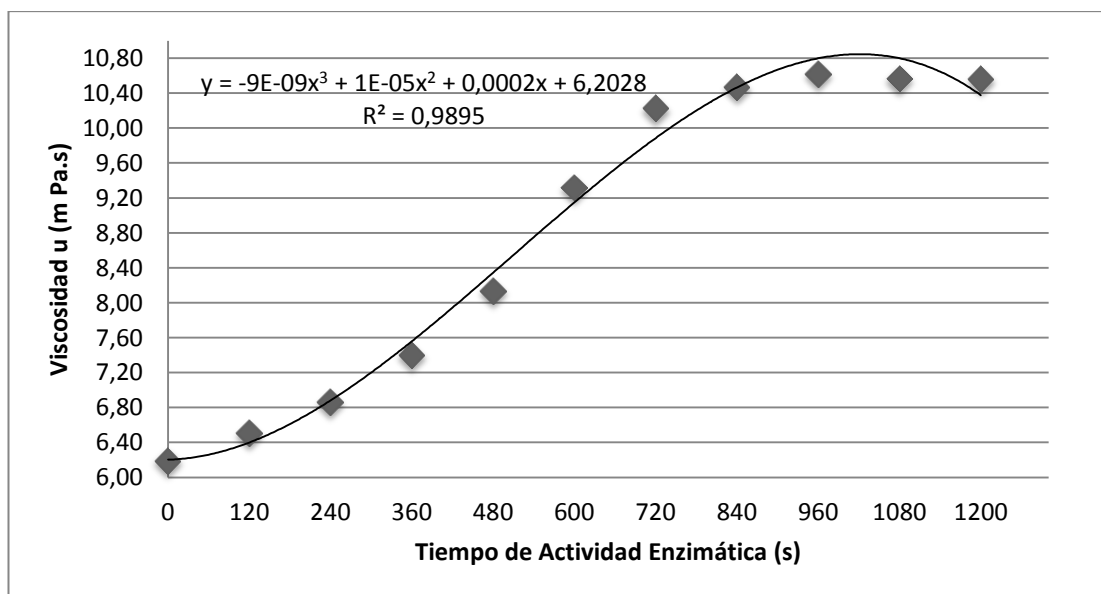
**Gráfico B-10.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de papaína extraída mediante NaCl en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.



**Gráfico B-11.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de enzima papaína grado reactivo en leche, con la correspondiente regresión polinómica.



**Gráfico B-12.** Cambios de viscosidad en función del tiempo por efecto de enzima papaína grado reactivo en jugo de carne, con la correspondiente regresión polinómica.



**ANEXOS C**

**ANÁLISIS  
ESTADÍSTICOS**

**Tabla C-1.** Valores de actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo para cada sustrato con la solución extractora.

<b>Solución Extractora</b>	<b>Actividad Enzimática (mPa.s / s)</b>					
	<b>Sustrato proteínico</b>					
	<b>Leche</b>			<b>Jugo de Carne</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Promedio</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Promedio</b>
<b>Etanol</b>	0,004466	0,004479	0,004472	0,004882	0,004883	0,004883
<b>NaCl</b>	0,003490	0,003454	0,003472	0,003899	0,003924	0,003911

**Tabla C-2.** Valores de actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad en función del tiempo para cada sustrato con enzima papaína grado reactivo adquirida.

<b>Enzima</b>	<b>Actividad Enzimática (mPa.s / s)</b>					
	<b>Sustrato proteínico</b>					
	<b>Leche</b>			<b>Jugo de Carne</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Promedio</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Promedio</b>
<b>Papaína grado reactivo</b>	0,0069	0,0071	0,0070	0,0079	0,0080	0,0080

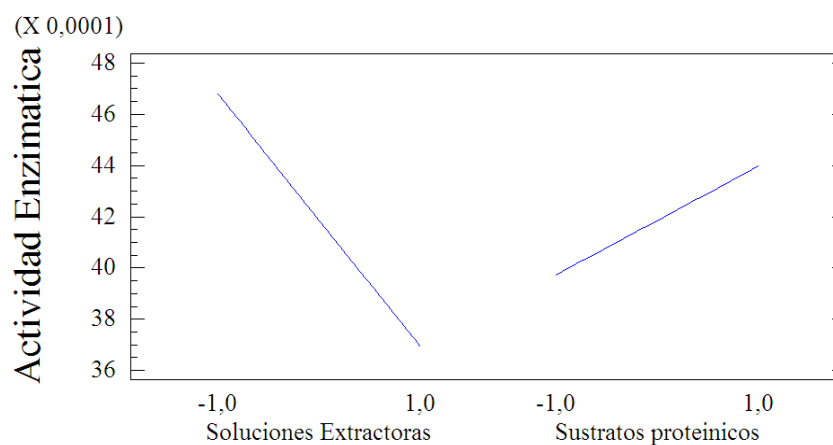
**Tabla C-3.** Optimización del diseño factorial 2<sup>2</sup>

<b>Factores</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
<b>Soluciones Extractoras</b>	-1.0	1.0	-1.0
<b>Sustratos Proteínicos</b>	-1.0	1.0	1.0

**Tabla C-4.** Cuadro de Análisis de varianza para el diseño 2<sup>2</sup>.

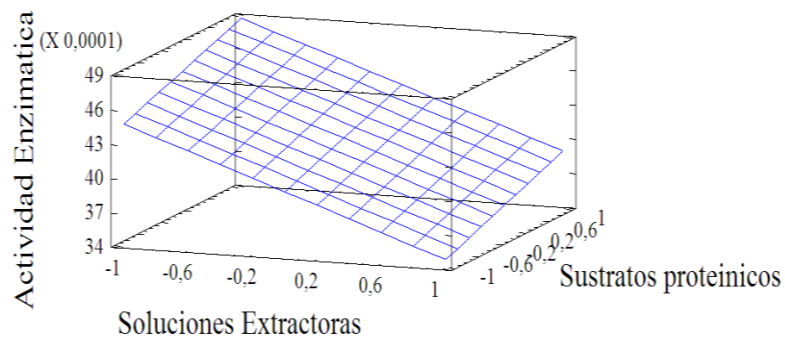
<b>Fuente de Varianza</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Razón de Varianza</b>	<b>Ft</b>
<b>A: Sol. Extractora</b>	1,9434E-6	1	1,9434E-6	5582,50	5,59
<b>B: Sustratos Proteínicos</b>	3,6082E-7	1	3,6082E-7	1036,48	5,59
<b>AB</b>	4,3512E-10	1	4,3512E-10	1,25	5,59
<b>Réplicas</b>	1,125E-12	1	1,125E-12	0,00	5,59
<b>Total error</b>	1,0443E-9	3	3,4812E-10		
<b>Total (corr)</b>	2,3057E-6	7			

**Gráfico C-1.** Factores utilizados para la determinación de la actividad enzimática.





**Gráfico C-2.** Respuesta de superficie para ambos factores.



**Tabla C-5.** Análisis de varianza para el diseño de bloques para ambos testigos.

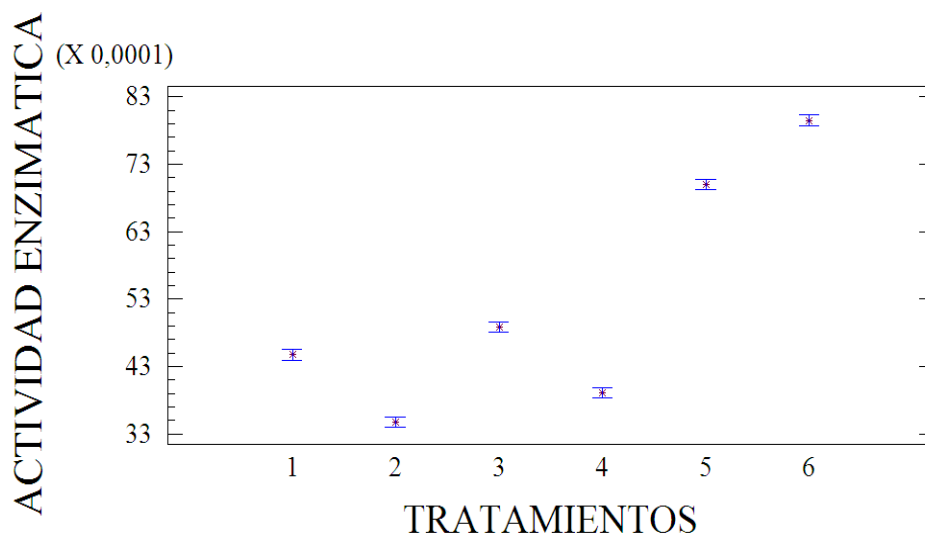
Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Ft
<b>A:</b> Observaciones	7,6507E-9	1	7,6507E-9	2,08	4,84
<b>B:</b> Tratamientos	3,2078E-5	5	6,4156E-6	1743,87	4,84
<b>Residual</b>	1,8394E-8	5	3,6789E-9		
<b>Total (corr)</b>	3,2104E-5	11			

**Tabla C-6.** Prueba de comparación múltiple Tukey al 5 %.

Tratamientos	Réplicas	— AE	Grupos Homogéneos
6	2	0,00795	<b>A</b>
5	2	0,007	<b>B</b>
3	2	0,0048825	<b>C</b>
1	2	0,0044725	<b>D</b>
4	2	0,0039115	<b>E</b>

2	2	0,003472	<b>F</b>
---	---	----------	----------

**Gráfico C-3.** Prueba de Tukey para los diferentes tratamientos.



**Tabla C-7.** Cuadro de análisis de varianza para el diseño de bloques corregido.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Ft
<b>A: Sol. Extractora</b>	1,9434E-6	1	1,9434E-6	372,3168	4,84
<b>B: Sustratos Proteínicos</b>	3,6082E-7	1	3,6082E-7	69,126	4,84
<b>AB</b>	4,3512E-12	1	4,3512E-12	0,0833	4,84
<b>T1</b>	1,07E-05	1	1,0676E-5	2045,3558	4,84
<b>T2</b>	1,91E-05	1	1,9097E-5	16975140,2	4,84
<b>Réplicas</b>	1,13E-12	1	1,125E-12	0,00021553	4,84
<b>Error</b>	2,6098E-8	5	5,2197E-9		
<b>Total (corr)</b>	3,2104E-5	11			

**ANEXOS D**

**FOTOGRAFÍAS**

**Fraccionamiento de la muestra**



**Fotografía D-1.** Materia Prima: Papayas Verdes.



**Fotografía D-2.** Trituración en el extractor.



**Fotografía D-3.** Muestra filtrada.  
**Fase de extracción**



**Fotografía D-4.** Extracción con etanol al 96% y NaCl al 10%.



**Fotografía D-5.** Refrigeración a  $-10^{\circ}\text{C}$  por 7 días.



**Fotografía D-6.** Proceso de centrifugación a 4500 rpm durante 20 min.



**Fotografía D-7.** Muestras precipitadas.

### **Proceso de concentración**



**Fotografía D-8.** Secado a 40 °C por 48 horas.



**Fotografía D-9.** Papaína extraída con etanol. Almacenada a 5 °C.



**Fotografía D-10.** Papaína extraída con NaCl. Almacenada a 5 °C.

### **Cuantificación de la Actividad enzimática**



**Fotografía D-11.** Preparación del baño termostático a 20° C.



**Fotografía D-12.** Medición del peso de leche en polvo.



**Fotografía D-13.** Preparación de la solución de leche en polvo.



**Fotografía D-14.** Medición de densidad de la leche en el densímetro.





**Fotografía D-15.** Medición de la densidad del líquido de la carne en el densímetro.



**Fotografía D-16.** Solución de leche y concentrado proteínico en vinagre.



**Fotografía D-17.** Baño crioscópico a  $-5^{\circ}$  C.



**Fotografía D-18.** Determinación de viscosidad en leche en el viscosímetro de Cannon – Fenske.



**Fotografía D-19.** Molienda de la carne.



**Fotografía D-20.** Filtración y regulación de la temperatura a 20°C.



**Fotografía D-21.** Determinación de viscosidad en jugo de carne en el viscosímetro de Cannon – Fenske.