

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



MEDICION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA ENZIMA PAPAINA
NATURAL EXTRAIDA DEL LATEX DE PAPAYO (*Carica papaya*) E
INMOVILIZADA EN GEL DE AGAR

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

ROXANA BEATRIZ MEJIA AGUILAR
CECILIA XIOMARA VEGA RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2010

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: MICROBIOLOGICO

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

ASESORA DE AREA GESTION AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

AGRADECIMIENTOS

Los más profundos y sinceros agradecimientos a nuestra asesora de este trabajo: MSc Maricela Lemus por su valiosa asesoría, su incondicional apoyo, dedicación, tiempo, esfuerzo, compromiso en la finalización de este trabajo y por todos sus consejos y palabras de aliento. Por ser una docente dedicada a fortalecer el carácter, la excelencia y la ética profesional.

Al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia y al Laboratorio de control de calidad microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), al Laboratorio de Aguas, por habernos prestado sus instalaciones ya que sin estas no se hubiera podido realizar esta investigación, así como también a Lic Mazzini, Sr. Oscar Coreas, Sr. Wilber Guzmán, Sr. Jaime González que fueron de ayuda incondicional en cada una de las etapas de nuestro trabajo.

A todas las personas que colaboraron con su apoyo en la realización de este trabajo de graduación sin esperar recompensa alguna más que la bendición del todopoderoso.

DEDICATORIA

A DIOS porque a lo largo de mi vida me iluminó y fortaleció en todo momento para alcanzar las metas propuestas permitiéndome así terminar mi carrera universitaria.

A MIS PADRES Amilcar Mejía y Ana Miriam Aguilar por el apoyo incondicional que siempre me han brindado en el transcurso de mi vida.

A MI ESPOSO Joel Rodríguez por apoyarme en los momentos mas difíciles y no dejarme vencer por nada, por su comprensión, amor y cariño.

A MI HIJO Fabrizzio por acompañarme durante mi trabajo de graduación dentro de mi vientre y llegar a mi vida para darme una gran felicidad.

A MIS HERMANAS Karina, Esmeralda y Carolina por estar a mi lado y apoyarme en todo momento.

A MIS AMIGAS Cecilia, Odilia y Raquel por apoyarme en todo y darme todo su cariño.

Roxana Beatriz Mejía Aguilar

DEDICATORIA

GRACIAS A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN SANTISIMA Por darme la vida, salud, serenidad y sobre todo sabiduría, para seguir adelante y vencer todo obstáculo de la vida y por lograr culminar con éxito mi carrera profesional.

A MIS PADRES: Trinidad Ramos y Julio Vega por su dedicación esfuerzo y educación durante el desarrollo y sobre todo a mi mamá que gracias a su sacrificio culmine mi carrera que Dios la bendiga siempre.

A MIS HERMANOS: Beatriz Ramos y Edwin Ramos por haberme dado todo el apoyo incondicional durante el proceso de estudios.

A MI NOVIO: Fredy García por su amor, comprensión y su apoyo incondicional para lograr culminar mi carrera profesional.

A MI AMIGA Y COMPAÑERA DE TESIS: Roxana Mejía por los momentos difíciles que pasamos para lograr culminar nuestra carrera.

A todas las personas que estuvieron pendientes de mi trabajo que de una u forma me animaron a seguir adelante con mucho cariño un agradecimiento enorme y mil gracias.

Cecilia Xiomara Vega Ramos

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xx
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Suero de Leche	25
3.1.1 Composición del suero	25
3.1.2 Clases de sueros líquidos	26
3.2 Agua	26
3.2.1 Contaminación del agua	26
3.2.2 Alteraciones físicas del agua	28
3.2.3 Alteraciones químicas del agua	29
3.2.4 Tipos y niveles de tratamiento	29
3.2.4.1 Tipos de tratamiento	29
3.2.4.2 Niveles de tratamiento	29
3.3 Papaya o papayo	31
3.3.1 Historia de la papaya	31
3.3.2 Usos de la papaya	31
3.3.3 Monografía de la papaya	32

3.3.3.1 Definición	32
3.3.4 Parte Medicinal de la papaya	33
3.3.5 Propiedades de la papaya	33
3.3.6 Indicaciones farmacológicas de la papaya	33
3.4 Enzima papaína	35
3.4.1 Historia de la papaína	35
3.4.2 El látex de la papaya	35
3.4.3 Aislamiento	37
3.4.4 Propiedades	39
3.4.4.1 Propiedades Físicas	39
3.4.4.2 Composición Químicas	40
3.4.4.3Otras propiedades y factores que influyen en la acción de la papaína.	40
3.4.5 Activación y sitio activo	42
3.4.5.1 Activación	42
3.4.5.2 Sitio activo	42
3.4.6 Especificidad	43
3.4.7 Usos y aplicaciones de la papaína	44
3.4.8 Tipos de papaína	44
3.4.8.1 Papaína cruda	44
3.4.8.2 Papaína semi-refinada	45
3.4.8.3 Papaína refinada	45
3.4.9 Extracción y recolección del látex	45

3.4.10	Medición de la actividad proteolítica	47
3.4.10.1	Definición	47
3.4.10.2	Principio del método	49
3.5	Inmovilizado de enzima	49
3.5.1	Aspecto general sobre la inmovilización de enzimas	49
3.5.2	Ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas	49
3.5.3	Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización	50
3.5.4	Efectos en la actividad enzimática.	50
3.5.5	Aplicaciones de la enzima inmovilizada	52
3.5.6	Requerimientos básicos de un sistema inmovilizado	52
3.5.6.1	Soporte	53
3.5.6.2	Agar	53
3.5.6.3	Técnica de inmovilización	54
3.5.6.3.1	Métodos químicos	54
3.5.6.3.2	Métodos físicos	54
3.5.6.4	Técnica de atrapamiento en gel	55
3.5.6.5	Reactores	55
3.5.6.6	Reactor semicontinuo	56
3.6	Liofilizado	56
3.6.1	Características de la liofilización	56
3.6.2	Etapas de la liofilización	56
3.6.3	El liofilizador	57

Capitulo IV	59
4.0 Diseño Metodológico	60
4.1 Tipo de Estudio	60
4.2 Investigación bibliográfica	60
4.3 Universo	60
4.4 Muestras	60
4.5 Métodos e instrumentos de recolección de datos	61
4.6 Parte experimental	61
4.6.1 Extracción del látex de papayo	61
4.6.2 Liofilización de la enzima	61
4.6.3 Inmovilización de la enzima	62
4.6.4 Mezcla enzima – soporte	62
4.6.5 Moldeo de la enzima	63
4.6.6 Ensayo general de actividad por el método modificado de Kunitz	63
4.6.7 Recolección de la muestra	64
4.6.8 Tratamiento de aguas residuales de vertido lácteo Con la enzima papaína cruda y liofilizada inmovilizada	65
Capitulo V	66
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	67
5.1 Determinación del pH óptimo de actividad de la enzima cruda libre e Inmovilizada	67

5.2 Determinación de temperatura optima de la enzima cruda libre e inmovilizada.	69
5.3 Determinación de pH optimo de enzima liofilizada libre e inmovilizada	71
5.4 Determinación de pH optimo de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a pH 7.0 y a diferente temperaturas.	73
5.5 Determinación de pH optimo de enzima comercial libre e inmovilizada	75
5.6 Determinación de temperatura optima de la enzima comercial libre e Inmovilizada	77
5.7 Comparación de enzima cruda, liofilizada y comercial libre	79
5.8 Comparación de enzima cruda, liofilizada y comercial inmovilizada	80
5.9 Determinación del tiempo de actividad de la enzima papaína cruda Inmovilizada en el control de las aguas residuales de lecherías.	81
5.10 Determinación del tiempo de actividad de la enzima papaína liofilizada Inmovilizada en el control de las aguas residuales de lecherías.	83
Capitulo VI	86
6.0 Conclusiones	87
Capitulo VII	89
6.1 Recomendaciones	90
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE CUADRO

Cuadro N°	Pág.
1. Alteraciones Físicas del agua	28
2. Alteraciones Químicas del agua	29
3. Características de la enzima del látex de papaya	37
4. Propiedades físicas de la papaína	39
5. Composición de la papaína	40
6. Resultados de las lecturas de la absorbancia de la enzima cruda Libre e inmovilizada a 280 nm a 40°C.	67
7. Actividad en unidades Kunitz de la enzima cruda libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C.	67
8. Porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C.	68
9. Absorbancia de enzima cruda libre e inmovilizada a 280 nm a a pH 6.0 y a diferente temperatura.	69
10. Actividad en unidades kunitz de la enzima cruda libre e inmovilizada a pH 6.0 a diferente temperatura.	69
11. Porcentaje de actividad de la enzima cruda libre e inmovilizada a Diferente temperatura y a pH constante de 6.0.	70
12. Resultados de lecturas de la absorbancia de la enzima liofilizada libre e Inmovilizada a 280 nm a 40°C.	71

13. Actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C.	71
14. Porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C.	72
15. Resultados de las lecturas de la absorbancia de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a 280 nm a pH 7.0 a diferente temperatura.	73
16. Actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a un pH 7.0 a diferente temperatura	73
17. Porcentaje de actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferente temperatura y a un pH constante 7.0.	74
18. Resultados de las lecturas de la absorbancias de la enzima comercial Libre e inmovilización a 280 nm a 30°C.	75
19. Actividad de la enzima comercial libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 30°C.	75
20. Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura de 30°C.	76
21. Absorbancia de enzima comercial libre e inmovilizada a pH 6.0 a diferente temperatura.	77
22. Actividad de la enzima comercial libre e inmovilizada a pH 6 y a diferentes temperatura	77
23. Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferente temperatura y a un pH constante de 6.0.	78
24. Actividad de enzima cruda, liofilizada y comercial libre.	78

25. Actividad de enzima cruda, liofilizada y comercial inmovilizada.	80
26. Absorbancia antes y después del tratamiento de agua residual de lecherías con enzima cruda inmovilizada y actividad de la enzima.	81
27. Absorbancia antes y después del tratamiento de agua residual de lecherías con enzima liofilizada inmovilizada y actividad de la enzima.	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Tabla que se utilizaron para recolección de datos de la actividad de la enzima inmovilizada.
2. Preparación de reactivos para el ensayo de actividad.
3. Preparación de buffer fosfato pH 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0
4. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada natural equivalente a 1 mL de solución de papaína.
5. Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada liofilizada equivalente a 1 mL de solución de papaína.
6. Formulas para determinar las unidades de actividad.
7. Resultados de enzima cruda, liofilizada, comercial a diferentes pH.
8. Material y equipo de laboratorio.
9. Imágenes de extracción del látex de papayo, liofilización de la enzima papaína, ensayo de actividad por el método modificado de kunitz, recolección de muestra y análisis de la muestra.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág
1. Papaya	31
2. Grafica de porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura de 40°C.	68
3. Grafica de porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferente temperatura y a un pH constante de 6	70
4. Grafica de porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C.	72
5. Grafica de porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferente temperatura y a pH constante de 7.	74
6. Grafica de porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 30°C.	76
7. Grafica de porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferente temperatura y a pH constante de 6.	78
8. Grafica de comparación de actividad de enzima cruda, liofilizada y comercial libre.	79
9. Grafica de comparación de actividad de enzima cruda, liofilizada y comercial inmovilizada.	80
10. Grafica de actividad de la enzima cruda inmovilizada vrs tiempo en el tratamiento de las aguas residuales de lecherías.	82
11. Grafica de actividad de la enzima liofilizada inmovilizada vrs tiempo en el tratamiento de las aguas residuales de lecherías.	84

RESUMEN

En el presente trabajo comprende la extracción por medios mecánicos de la enzima papaína del látex del papayo (***Carica papaya***) obteniendo una muestra de 25 mL de enzima papaína. Para darle un mayor tiempo de vida media se sometió a un proceso de liofilización hasta total desecación, y para mayor tiempo de uso se inmovilizó en gel de agar.

Por ser una enzima natural se midió la actividad determinando temperatura y pH óptimos, por el método modificado de Kunitz y se comparó la enzima liofilizada libre e inmovilizada con la enzima cruda libre e inmovilizada y una enzima comercial libre e inmovilizada.

La enzima cruda libre e inmovilizada presentó un máximo de actividad a una temperatura de 40°C y un pH de 6 y la enzima liofilizada libre e inmovilizada presento una actividad máxima a 40°C y un pH de 7 y la enzima comercial libre e inmovilizada un máximo de actividad a 30°C y un pH de 6.

Con los parámetros optimizados se trataron aguas residuales de lechería con las enzimas cruda y liofilizada inmovilizadas, obteniendo un tiempo de actividad de 570 minutos de la enzima cruda y 630 minutos de la enzima liofilizada.

Al comparar la actividad de las tres enzimas se determinó que la que tiene mayor actividad es la enzima liofilizada. Con el proceso de liofilización ayudó a mejorar la actividad y darle un mayor tiempo de vida media a la enzima papaína liofilizada.

Por los resultados obtenidos se recomienda para el tratamiento de las aguas residuales de lechería el uso de enzima papaína cruda y liofilizada inmovilizada

previo a su descarte a las alcantarillas y ríos disminuyendo la contaminación que este tipo de industria genera.

La investigación fue realizada en los laboratorios de Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y Laboratorios de la facultad de Química Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Capitulo I
INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La industria Lechera genera una gran contaminación de las aguas superficiales porque se descarta el suero de la producción de queso sin ningún tratamiento.

En El Salvador la producción de leche es de 1,000,000 de litros por día y para la fabricación del queso se consumen 469,000 litros, el suero que se obtiene que por no ser aprovechado convenientemente; es descartado a ríos y quebradas sin ningún tratamiento, lo que constituye una fuente de contaminación de las aguas superficiales por lo que presentamos el uso de la enzima papaína proteolítica como una alternativa para el tratamiento previo de las descargas que se hagan reciban un tratamiento previo antes de que llegue a los ríos.

Es por ello que se vio la necesidad de tratar estas aguas residuales de las lecherías de la ciudad de Aguilares, con la enzima papaína natural (*Carica papaya*) la cual se extrajo por medios mecánicos. Siendo la papaína una mezcla de enzimas (Papaína, Lizosima, Quimiopapaina) que son capaces de dividir a las proteínas en moléculas más simples.

En la investigación para poder tener un fácil manejo de la enzima papaína y un mayor tiempo de vida útil se utilizo el método de liofilización, se utilizo el método de inmovilización en gel de agar para permitir una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace que se pueda reutilizar.

Para cumplir dicho objetivo de la actividad de la enzima papaína se determino con el método Modificado de Kunitz logrando así comparar la actividad de la enzima papaína natural, liofilizada con una enzima comercial.

La información recolectada en esta investigación se presenta en cuadros, figuras y esquemas que explica de una manera más comprensible los resultados obtenidos.

Capitulo II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Medir la actividad proteolítica de la enzima papaína natural extraída del látex de papayo (*Carica papaya*) e inmovilizada en gel de agar.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Extraer del látex del papayo (*Carica papaya*) por medios mecánicos la enzima papaína natural.

2.2.2 Determinar el pH y Temperatura óptimos de actividad de la enzima papaína cruda, seca liofilizada libre e inmovilizada y papaína comercial.

2.2.3 Comparar la actividad a pH y Temperatura óptimos de la papaína extraída cruda y liofilizada inmovilizada con una papaína comercial inmovilizada.

2.2.4 Determinar el tiempo máximo de actividad de la papaína cruda y liofilizada inmovilizada en el control de aguas residuales de lechería.

Capitulo III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 SUERO DE LECHE ⁽³²⁾.

Durante la elaboración del queso se hace coagular la leche mediante la adición de cuajo. Con ello la leche se descompone en dos partes: una masa semisólida, compuesta de caseína y un líquido, que es el suero de leche. El suero de leche es transparente y de color amarillo verdoso y tiene un sabor ligeramente ácido, bastante agradable.

3.1.1 Composición del suero

El suero de leche tiene un perfil de minerales en el que destaca sobre todo la presencia de potasio, en una proporción de 3 a 1 respecto al sodio, lo que favorece la eliminación de líquidos y toxinas. Cuenta también con una cantidad relevante de otros minerales como calcio ("En una proporción de un 50% más que en la leche", según Roser Amills), fósforo y magnesio, y de los oligoelementos zinc, hierro y cobre, formando todos ellos sales de gran biodisponibilidad para nuestro organismo.

El suero de leche, que contiene todos los aminoácidos esenciales, aporta proteínas de una calidad extraordinaria y con un coeficiente de uso por parte del organismo humano, según Marisa Madoz: "Superior incluso al de la leche o los huevos". Contiene además cantidades pequeñas pero apreciables de las vitaminas A, C, D, E y del complejo B, así como ácido orótico, que es, en palabras de Madoz⁽³²⁾: "Fundamental para la absorción de minerales como el calcio, fósforo,

etc." , y ácido láctico ("Que ayuda a mejorar el proceso de respiración celular", según Roser Amills), junto con un contenido muy bajo en grasas y en calorías.

3.1.2 Clases de sueros líquidos

Hay dos clases de suero: el dulce y el ácido, los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche. El suero dulce es el obtenido por una coagulación enzimática, utilizando para ello un cuajo de procedencia animal, como la quimosina de rumiantes; o vegetal, o bien un cuajo microbiano. El suero ácido es obtenido por acidificación natural de la leche o por la adición de ácidos orgánicos. La coagulación natural se produce por fermentación de la leche causada por la flora bacteriana existente o a fermentos lácticos añadidos; o bien puede ser obtenida por adición de ácidos orgánicos a la leche líquida, tales como acético, cítrico, láctico, etc.

3.2 AGUA ⁽²⁶⁾

El agua, constituye un área esencial para el establecimiento de la sustentabilidad de la vida, en un país o el planeta; ya que es un elemento necesario para la supervivencia y un recurso vital para el desarrollo de las diversas actividades económicas, sociales, agrícolas, etc. La problemática del agua incluye aspectos de disponibilidad, distribución, uso y contaminación.

3.2.1 Contaminación del agua ⁽²⁶⁾.

De acuerdo a la Ley del Medio Ambiente de El Salvador, promulgada en 1998, se entiende como contaminación: "la presencia o introducción al ambiente de

elementos nocivos a la vida, la flora o la fauna, o que degraden la calidad de la atmósfera, del agua, del suelo o de los bienes y recursos naturales en general, conforme lo establece la ley”.

Bajo este concepto se estimó que más del 90% de todas las fuentes de agua superficiales se encuentran con algún grado de contaminación por desechos orgánicos, industriales y agroquímicos. En cuanto a aguas subterráneas, solo se tienen algunos datos muy esporádicos sobre la contaminación.

Los ríos más contaminados a nivel nacional según el MARN son el Acelhuate, Suquiapa, Sucio, Grande de San Miguel y Acahuapa, en cuyas cuencas se encuentran establecidas zonas urbanas con alta densidad poblacional.

La OPS-UNICEF estimó en el año 2000, que de toda la población cubierta con servicios de alcantarillado, sólo entre 2% y 3% del caudal de aguas residuales recibe algún tipo de tratamiento previo antes de ser lanzadas a ríos o quebradas (OPS-UNICEF, 2000).

En general las actividades humanas que contribuyen a la contaminación del agua, se clasifican de la siguiente forma:

- Domésticas /institucionales
- Comerciales
- Industriales
- Agropecuarias
- Hospitalarias
- Por derrame de petróleo

3.2.2 Alteraciones Físicas del agua ⁽¹⁴⁾

Cuadro Nº 1 Alteraciones Físicas del agua.

Alteraciones Físicas	Características y contaminación que indica
Color	El agua no contaminada no suele tener ligeros colores rojizos, pardos, amarillentos o verdosos. Las aguas contaminadas pueden tener muy diversos colores pero, en general, no se pueden establecer relaciones claras entre el color y el tipo de contaminación.
Olor y sabor	Compuestos químicos presentes en el agua como los fenoles, diversos hidrocarburos, cloro, materias orgánicas en descomposición o esencias liberadas por diferentes algas u hongos pueden dar olores y sabores muy fuertes al agua, aunque estén en muy pequeñas concentraciones. Las sales o los minerales dan sabores salados o metálicos, en ocasiones sin ningún olor.
Temperatura	El aumento de temperatura disminuye la solubilidad de gases (oxígeno) y aumenta, en general, la de las sales. Aumenta la velocidad de las reacciones del metabolismo, acelerando la putrefacción. La temperatura óptima del agua para beber está entre 10 y 14°C. Las centrales nucleares, térmicas y otras industrias contribuyen a la contaminación térmica de las aguas, a veces de forma importante.
Materiales en suspensión	Partículas como arcillas, limo y otras, aunque no lleguen a estar disueltas, son arrastradas por el agua de dos maneras: en suspensión estable (disoluciones coloidales); o en suspensión que sólo dura mientras el movimiento del agua las arrastra. Las suspendidas coloidalmente sólo precipitarán después de haber coagulación o floculación (reunión de varias partículas)
Espumas	Los detergentes producen espumas y añaden fosfato al agua (eutrofización). Disminuyen mucho el poder autodepurador de los ríos al dificultar la actividad bacteriana. También interfieren en los procesos de floculación y sedimentación en las estaciones depuradoras.
Conductividad	El agua pura tiene una conductividad eléctrica muy baja. El agua natural tiene iones en disolución y su conductividad es mayor y proporcional a la cantidad y características de esos electrolitos. Por esto se usan los valores de conductividad como índice aproximado de concentración de solutos.

3.2.3 Alteraciones Químicas del agua ⁽¹⁴⁾

Cuadro Nº 2 Alteraciones Químicas del agua

Alteraciones Químicas	Contaminación que indica
pH	<p>Las aguas naturales pueden tener pH ácidos por el CO₂ disuelto desde la atmósfera o proveniente de los seres vivos; ácido sulfúrico procedente de algunos minerales, por ácidos húmicos, disueltos del mantillo del suelo. La principal sustancia básica en el agua natural es el carbonato cálcico que puede reaccionar con el CO₂ formando un sistema de tampón carbonato/bicarbonato.</p> <p>Las aguas contaminadas con vertidos mineros o industriales pueden tener pH muy ácido. El pH tiene una gran influencia en los procesos químicos que tienen lugar en el agua, actuación de los floculantes, tratamientos de depuración, etc.</p>

3.2.4 Tipos y Niveles de Tratamiento de Aguas Residuales ⁽¹⁴⁾

3.2.4.1 Tipos de tratamiento:

Los tipos de tratamiento se pueden clasificar como: físicos, químicos, biológicos

3.2.4.2 Niveles de Tratamiento ⁽¹⁴⁾

Los niveles de tratamiento se agrupan según los diferentes grados de eficiencia alcanzados en la remoción de los contaminantes existente en los líquidos residuales. Estos niveles se conocen usualmente como; pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamientos avanzados o terciarios.

Pretratamiento. Se trata de un tratamiento previo, diseñado para remover partículas grandes, tales como plásticos, pelos, papeles, etc. ya sea que floten a se sedimenten, antes de que lleguen a las unidades de tratamiento posteriores. Aquí se emplean mayoritariamente rejillas o tamices,

Tratamiento primario

Se elimina un gran porcentaje de sólidos en suspensión, sobrenadante y materia inorgánica.

En este nivel se hace sedimentar los materiales suspendidos usando tratamientos físicos o fisicoquímicos.

Tratamiento secundario.

Se trata de reducir el contenido en materia orgánica acelerando los procesos biológicos naturales. En esta fase del tratamiento se eliminan las partículas coloidales y similares. Puede incluir procesos biológicos y químicos.

Tratamientos avanzados o terciarios.

En el tratamiento terciario es necesario cuando el agua va a ser reutilizada; elimina un 99% de los sólidos y además se emplean varios procesos químicos para garantizar que el agua esté tan libre de impurezas como sea posible.

3.3 PAPAYA O PAPAYO (*Carica papaya*)⁽¹⁷⁾

3.3.1 Historia de la Papaya.

La papaya cuyo nombre científico (*Carica papaya*) pertenece a la familia de la Caricáceas nativa de Centroamérica. La primera mención de la misma fue en el año 1535 y se le atribuye a Oviedo (González Fernández de Oviedo 1478-1557, Historiador Español),



Figura N°1: Papaya

quien informo a los Reyes de España haber visto plantas de papaya creciendo en dicha región.

Su llegada del Caribe a Sudamérica se dio a los marinos españoles y Portugueses. En estos lugares se le conoce con diferentes nombres tales como: Fruta bomba, Lechosa, Papaw y otros.

Su distribución en todo el resto del mundo tropical se logra durante el siglo XVI.

3.3.2 Usos de la Papaya ⁽¹⁷⁾

El fruto de la Papaya tiene muchos usos como:

- Fruta fresca
- En jugos
- En batidos
- Helados
- Como parte de las ensaladas
- Elaboración de dulces por Casera o envasados por la Industria.

3.3.3 Monografía de la Papaya ⁽¹⁹⁾

3.3.3.1 Definición:

Se trata de un arbolito carnoso y de tronco frágil muy esponjoso y hueco en su parte central muy cultivado en regiones tropicales y sub-tropicales.

Altura: Alcanza hasta los 9 metros

Familia: Caricáceas

Hábitat: Originaria probablemente del área tropical de América del Sur.

Hojas: De color verde oscuros y gruesas, y de 80 centímetros de longitud, alternas y muy juntas entre sí, palmeadas y divididas de forma suborbicular en 5-7 lóbulos, irregulares. Posee un pecíolo robusto de hasta 50 centímetros de longitud.

Flores: Dioicas, aunque raramente monoíca, agrupadas en el extremo del tronco de color amarillo claro. Posee 5 pétalos y 5 sépalos del mismo color. Las flores masculinas son fragantes las cuales nacen de racimos pedunculados de hasta 50 centímetros de longitud. Las femeninas son de mayor tamaño, solitarias, axilares y con pedúnculo corto.

Frutos: Son gratos al paladar y refrigerantes, vallas carnosas y lobulosas, usualmente con 5 ángulos de tamaño variable y de color anaranjado al madurar. Contiene en su interior una pulpa lechosa de color anaranjado , con numerosos semillas negras y globulares que están dispuestas en su cavidad central. Las numerosas semillas son aplanadas y con endospermo carnoso.

3.3.4 Parte Medicinal de la Papaya ⁽¹⁹⁾

El látex desecado del fruto, el cual se puede obtener de las semillas y la planta entera.

3.3.5 Propiedades de la Papaya ⁽¹⁹⁾

- Digestiva
- Activadora de los jugos pancreáticos
- Anticonceptiva (a grandes dosis)
- Vermífugo
- Cicatrizante (látex).

3.3.6. Indicaciones Farmacológicas de la Papaya ⁽¹⁷⁾:

- Sistema Digestivo: su jugo posee la característica de ablandar las carnes, debido a su alto contenido en papaína, la cual es capaz de disolver los trombos de fibrina y ejerce una actividad peptónica muy superior a la de la propia pepsina digestiva. La papaína y la pulpa de la papaya se recomiendan en caso de dispepsia y dificultad de digestión de origen intestinal, especialmente cuando existe una disminución en la secreción de los jugos pancreáticos. La papaya está muy recomendada para aquellas personas que tienen dificultades en digerir las proteínas o las grasas. Así mismo está muy indicada como postre en aquellas comidas en las cuales ha habido una sobrecarga proteica.
- Estreñimiento: tomar en ayunas una papaya con un poco de sal

- Endocrinología: la virtud en la papaya como anticonceptiva es algo discutida si bien se sabe por ejemplo que las mujeres indias que consumen este fruto en gran cantidad poseen una menor capacidad reproductiva. Esta acción se debe probablemente a una inhibición de la hormona progesterona. Las semillas de la papaya son occitóxicas, es decir que estimulan la contracción uterina.
- Infestación intestinal: por *Áscaris lumbricoides* y tenia
- Lombrices Intestinales: Ingerir una cucharada de las semillas frescas y molidas. Puede mezclarse las semillas con alguna infusión que tomemos habitualmente.
- Inflamaciones del hígado, riñones y ovarios: El fruto maduro y rallado o licuado mezclándolo con leche o agua.
- Enteritis de los niños: Cocimiento de una rodaja verde, pelada y sin semillas en un litro de agua. Añadir luego leche.
- Dermatología: debido a su capacidad de disolver las proteínas, su uso es recomendado en los casos de verrugas, úlceras córneas y excrecencias de todo tipo como eccemas descamativos, psoriasis, etc. En los abscesos se utiliza el látex de papaya el cual además de ayudar en la cicatrización disuelve el tejido colágeno que obstruye en muchos casos la cicatrización correcta.
- Otorrinolaringología: La papaya se utiliza en la disolución de los tapones de cerumen de los oídos.
- Asma, fiebres y enfermedades pulmonares: cocimiento de un pedazo de la hoja (del tamaño de un billete para un jarro de agua)
- Para mujeres que amamantan a sus niños: El jugo lechoso de la papaya verde,

untado en los pechos de las mujeres que dan de mamar a sus hijos aumenta la secreción láctea.

.

3.4 ENZIMA PAPAÍNA ⁽⁴⁾

3.4.1 Historia de la papaína

Se ha sabido que desde hace muchos años los pueblos de la India Occidental prensaban piezas de carne entre las hojas de papaya, con el objeto de suavizarla. En Barbados se añadían masas de frutas verdes a la carne que de otra manera no se podían cocer. Los Nativos también usaban el jugo de la papaya con propósitos de cosmético; así, frotaban ya sea el jugo solo o el jugo mezclado con agua o pigmentos en sus pieles, para obtener así un tono de piel más saludable y suave.

El jugo de la papaya también fue usado por los indígenas contra:

- El eczema
- Las verrugas
- Los parásitos intestinales
- Las úlceras y otras llagas
- La difteria
- Múltiples afecciones de la piel.

3.4.2 El látex de la papaya ⁽²⁾

Se obtiene el látex de la ***Carica papaya***, un árbol que crece en casi todo país tropical. La fuente más rica de papaína es el jugo o látex que se encuentra bajo la

cáscara de la papaya verde y plenamente desarrollada. Este látex está contenido en unos pequeños vasos largos que se encuentran justamente debajo de la piel.

Cuando estos vasitos son cortados, exudan un líquido claro como el agua, el cual se vuelve opaco por su exposición al aire, siendo este líquido la fuente más importante de papaína.

Aunque todas las partes de la planta contienen látex, en plantaciones comerciales para obtener papaína, solo los frutos verdes, inmaduros y sin cortar son usados para la extracción de látex, porque las exudaciones de estos frutos son más vigorosas que de cualquier otra parte de la planta.

El látex de papaya consiste en una mezcla de proteasas o enzimas. Schack demostró la existencia de cuatro componentes principales con actividad proteolítica:

- Papaína
- Quimiopapaína
- Lisozima
- Material no caracterizado, en las proteínas solubles del látex.

Juntas estas proteínas son más o menos el 64% de las proteínas solubles del látex. La fracción denominada quimiopapaína es el componente proteolítico más abundante en el extracto. La papaína fue cristalizada por primera vez por Ball et. Al. En 1937

Cabe mencionarse también que la extracción del látex no daña la pulpa del fruto, pudiendo utilizarse este al madurarse, para consumo fresco o considerar la posibilidad de enlatarlo en forma de trozos o rodajas, fabricar mermeladas, vinagre, néctar, etc., ya sea para consumo interno o para exportación.

3.4.3 Aislamiento ⁽²⁾

La papaína es una enzima proteolítica (hidrolasa) que se encuentra en el látex de la papaya, el cual está contenido principalmente en unos vasos pequeños que están debajo de la cáscara del fruto, y se extrae por medio del estriado del fruto verde, pero plenamente desarrollado, sin cortarlo de la planta; las propiedades de este son conocidas desde hace muchos años.

El látex de la papaya contiene una mezcla de enzimas, la composición de este y algunas de las características de sus fracciones enzimáticas se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro Nº 3 Características de la enzima del látex de papaya ⁽⁵⁾

Enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Concentración del látex
Papaína	21,000	8.75	10%
Quimipapaína	36,000	10.1	45%
Lisozima	25,000	10.5	20%

La papaína puede separarse del resto de enzima y prepararse rápida y económicamente, en una forma cristalina, en un estado de pureza bueno y en cantidades razonables, a partir del látex seco comercial.

Se han desarrollado muchos métodos para aislar la papaína del resto de enzimas, entre ellos cabe mencionar el desarrollado por Kimmel y Smith, que es uno de los métodos más usados de extracción de papaína.

Este procedimiento comprende una extracción del látex, eliminación del material insoluble en el extracto a un pH 9, precipitaciones con sulfato de amonio, seguidas de tres recristalizaciones. La papaína pura obtenida por este método contiene tres componentes:

- Papaína activa
- Papaína no activable
- Papaína activable.

Por este método se obtienen aproximadamente de 6 a 7 mg., de papaína pura por gramo de látex seco ⁽²⁾.

En general, lo que se busca en la purificación del látex seco es:

- 1) Reducir el contenido de componentes no proteolíticos, para obtener una fracción con mayor actividad proteolíticas.
- 2) Separar la papaína u otro componente del resto de enzimas o compuestos con actividad proteolítica (o al menos incrementar considerablemente la proporción de esta).
- 3) Producir un producto más estable para incrementar su vida de almacenamiento
- 4) Producir un producto estéril para una aplicación específica.

La papaína aislada representa solo una parte menor del total de actividad proteolítica, esto se debe a que hay otra enzima proteolítica presente en el látex

en una proporción considerablemente mayor, que también ha sido aislada en forma cristalina por medio de un procedimiento de fraccionamiento diferente, siendo esta la quimiopapaína. La suma de las actividades de esas dos enzimas cristalinas representan casi el total de la actividad proteolítica del látex fresco.

3.4.4 Propiedades ⁽²⁾

3.4.4.1 Propiedades Físicas

De acuerdo a Balls y Lineweaver la papaína cristalina se presenta en forma de agujas bajo el microscopio. Algunas veces, se presenta otra forma de cristales, lamina largas con caras hexagonales alargadas, menos solubles en agua, las cuales aparecen en las suspensiones conteniendo las agujas después de mantenerlas a 8°C durante muchos meses.

La papaína cristalina es soluble en agua y en alcohol etílico o metílico al 70% y notablemente estable en solución de urea 9.0M, pero puede ser precipitada fácilmente (Salting out) en solución, especialmente a bajas temperaturas.

Cuadro Nº 4 Propiedades físicas de la Papaína ⁽¹⁵⁾

Propiedad	Valor
Punto Isoeléctrico	pH= 8.75
Constante de sedimentación	2.42 + 0.04 seg
Constante de difusión	$10.27+0.13 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$
Peso molecular	23,350 Daltons
Coefficiente de Extinción	25.0
Rotación óptica (pH = 5.7, 25°C)	-66.7

3.4.4.2 Composición Química ⁽²⁾

La papaína existe como un monómero, consistente de 212 aminoácidos. Es una proteína simple conteniendo solamente aminoácidos y desprovista de

carbohidratos. Todos los aminoácidos usuales están presentes con excepción de la metionina.

La composición elemental de la papaína cristalina ha sido reportada que contiene un 16.1% de nitrógeno y un 1.2% de azufre. El valor del azufre corresponde a 8 átomos por mol de papaína. La composición de aminoácidos reportada por Smith y Kimmel ⁽⁷⁾ se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro Nº 5: Composición de la Papaína ⁽⁵⁾

AMINOACIDO	% DE PROTEINA
Acido aspártico	11.32
Treonina	3.89
Serina	5.91
Acido glutámico	12.43
Prolina	5.11
Glicina	8.60
Alanina	6.08
Valina	8.43
Isoleucina	6.05
Leucina	6.10
Tirosina	14.71
Fenilamina	3.16
Histidina	0.85
Lisina	5.67
Arginina	7.75
Triptófano	4.68

3.4.4.3 Otras propiedades y factores que influyen en la acción de la papaína⁽²⁾

a) Temperatura.

Es de recordar que los nativos del trópico ablandaban su carne hirviéndola con pedazos de papaya verde o con su jugo; éste fenómeno fue reportado por numerosos investigadores de este campo desde hace mucho tiempo. Las enzimas proteolíticas son tradicionalmente poco estables al calor, pero la papaína es

relativamente la enzima más estable en un rango de temperatura amplio, propiedad que no es compartida por otras proteasas vegetales.

Wurtz ⁽²²⁾, encontró que una muestra de papaína todavía retiene actividad después de haber sido calentada a 105°C. Esto se basa en el descubrimiento que la papaína resiste calor seco a 100°C por 3 horas.

Sin embargo cuando se usó papaína en solución, su actividad fue destruida por calentamiento a 82.5°C, esto se debe a que la papaína es más estable en estado sólido que en solución.

b) pH del medio

Una de las peculiaridades de la papaína es su actividad proteolítica en un amplio rango de condiciones de pH. Declaraciones recientes muestran que la papaína es activa en un medio ácido, neutro y básico, cubriendo esta actividad un rango de pH de 3 a 12.

En efecto, éste es probablemente el rango efectivo más amplio de pH que el de cualquier otra enzima proteolítica. También se ha reportado que el óptimo de estabilidad de la papaína en solución es del rango de pH de 5 a 6. La acción óptima de papaína sobre caseína ha sido encontrada a un pH de 6.5 y 7.

c) Efecto de almacenamiento.

La papaína pierde su actividad durante el almacenamiento, especialmente cuando esta se encuentra en solución.

Se han reportado pérdidas de actividad de preparaciones comerciales de papaína que se han almacenado durante varios meses o durante un año, y también de

muestra de papaína de diversos grados de pureza que han perdido, en promedio, acerca de un 30% de su actividad en 3-6 meses, cuando se han mantenido a 25°C. El método de preparación de la papaína es muy importante en relación a su estabilidad durante el almacenamiento. Estudios especiales sobre la estabilidad de la papaína han confirmado que mucha de la actividad del látex se pierde durante el secado y su subsecuente almacenamiento.

3.4.5 Activación y sitio activo ⁽²⁾

3.4.5.1 Activación

La papaína es activada por agentes reductores y desactivada por agentes oxidantes.

Los agentes más comunes usados son cisteína, cianuro y sulfuros. Es importante enfatizar que aunque la papaína requiere activación, no es requerida la presencia continua del activador, la efectividad del sistema activador depende de cual sistema buffer sea utilizado. Esta variabilidad del sistema buffer es eliminada si EDTA (Acido-etilendiaminotetracético) es usado en unión del agente reductor.

Varios agentes como el yodo, bromo, peróxido de hidrógeno diluido y oxígeno atmosférico, inactivan la papaína bajo ciertas condiciones.

Estos efectos han sido explicados por la naturaleza del grupo "TIOL" de la enzima, el cual es activo en estado reductor e inactivo en estado oxidado.

3.4.5.2 Sitio activo

La interacción entre enzima y substrato ocurre en la superficie de la molécula de papaína en un surco el cual está situado entre las dos partes de la molécula. La

cadena lateral de Cisteína 25 se encuentra en la ranura, si el grupo SH de la Cisteína no se encuentra libre ya sea por bloqueo por metales pesados, por agentes alquilantes o por formación disulfídica, la actividad de la enzima desaparece completamente.

Cercano al grupo sulfhídrico se encuentra el anillo imidazólico de la Histidina 159, el cual se encuentra unido a su vez, a través de puentes de hidrógeno, con la cadena lateral de Asparagina 175; dándole forma a la triada catalítica que forma el sitio activo de la papaína

3.4.6 Especificidad ⁽²⁾

Se ha conocido desde hace muchos años que la papaína puede producir una degradación de la proteína en muchos sustratos, mas que cualquier otra proteasa vegetal conocida. La papaína tiene una amplia especificidad, así puede hidrolizar sustratos sintéticos que son los sustratos generalmente usados para tripsina, quimiotripsina o pepsina. La papaína es también muy activa en la hidrólisis de amidas y ésteres.

La aplicación de sustratos sintéticos simples en el estudio de la especificidad de enzimas proteolíticas ha resultado con grandes progresos para el entendimiento de la acción de la papaína. Usando dichos sustratos se ha encontrado que los preparados comerciales de papaína no atacan los dipéptidos, o si lo hacen, lo hacen muy despacio Kimmel y Smith, han reportado que el ácido Carbobenzoxi-L-glutámico es un inhibidor de la papaína en la región de pH 3.9 a 4.5; también se ha demostrado que el ácido Carbobenzoxi-L-aspartico produce inhibición similar.

3.4.7 Usos y Aplicaciones de la Papaína ⁽²⁾

La distribución de la utilización de la papaína por tipo de industria ha sido estimada así:

- Cervecería 75%
- Carne 10%
- Pescado 5%
- Otras comidas 5%
- Productos farmacéuticos 2%
- Usos diversos 3%

De acuerdo a esta estimación el 95% de la papaína es utilizada en la industria de alimentos y cerveza.

3.4.8 Tipos de Papaína ⁽²⁾

Los principales tipos de papaína que actualmente se venden en el mercado Internacional son:

3.4.8.1 Papaína Cruda

Esta se obtiene por el secado del látex al sol o en hornos rústicos. Es un producto de baja calidad, baja estabilidad biológica y por lo tanto de vida corta y de una actividad proteolítica relativamente baja (aproximadamente 350 unidades tirosina/mg), su rendimiento a partir del látex fresco es de un 20% en peso aproximadamente.

3.4.8.2 Papaína Semi-Refinada

Es obtenida por secado del látex bajo condiciones controladas. Sin embargo su vida es limitada a 6-8 meses, su rendimiento a partir del látex fresco es de un 25% en peso aproximadamente y su actividad proteolítica es mas baja que la de la papaína completamente refinada (450-500 unidades tirosina/mg). Su color es blanco.

3.4.8.3 Papaína Refinada

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

Generalmente es obtenida a través de un proceso de secado por aspersion al vacío (método de Bourdart); a grandes rasgos la secuencia de operaciones que sigue este látex son: homogenización, clarificación, filtración sobre placas clarificantes, concentración, filtración esterilizante y atomización. La relación de látex fresco a papaína que se vende refinada es de 6:1 o 7:1. Es la papaína más purificada que se vende actualmente en el mercado internacional. También existen otros métodos para su obtención, como el de fraccionamiento alcohólico.

3.4.9 Extracción y Recolección del látex

La extracción del látex se lleva a cabo por medio del estriado de los frutos verdes. El estriado consiste en hacer incisiones longitudinales en la cáscara del fruto; respecto a la profundidad de las incisiones, algunos autores recomiendan que

éstas no sean mayores de 2 mm. Mientras que otros dan un rango de variabilidad de 2 a 2.5 mm, y algunos opinan que la profundidad de éstas pueden ser hasta de 3 mm.

Debe de cuidarse mucho de esto, ya que incisiones profundas podrían causar infecciones, echando a perder el fruto.

Se recomienda utilizar materiales no oxidables para la extracción del látex. Así, los incisores deben ser de acero inoxidable, aluminio, madera, hueso, vidrio o bambú, pero nunca de metal corriente, esto es debido a que la papaína pierde su actividad fácilmente al estar en contacto con metales como el hierro y el cobre. Las hojas de afeitar de acero inoxidable de doble filo han sido utilizadas con éxito para ello (1,9, 13). Generalmente el incisor consiste de una vara de madera, a la cual se le prende un trozo de la hoja de afeitar o navaja, de un tamaño tal, que vaya de acuerdo con la profundidad deseada de las incisiones.

Una vez realizadas las incisiones, el látex fluye, y cae en los recipientes recolectores hechos, generalmente en forma de sombrilla y colocados alrededor del tronco.

Hay diferentes diseños para estos recolectores; así, una técnica común de recolección en el Este de África, consiste en instalar en torno del árbol un aro, portando plástico, cuyo diámetro sea mayor que la circunferencia del follaje y de los frutos, el cual es sostenido por tres estacas de suficiente altura, instaladas convenientemente, cada una terminada en horqueta, las cuales se entierran en el suelo hasta que el arco queda fijo y nivelado. Sobre el aro se coloca una tela de

plástico de forma circular y cónica para que sea sujeta en torno del tallo del árbol en un extremo y el otro a diversos puntos del aro por medio de cordeles. El plástico debe tener una depresión para que se deposite el látex.

Los recipientes en que se recolecte el látex deben ser siempre de un material que no desactive la papaína, así puede usarse acero inoxidable, porcelana, vidrio, metal esmaltado, plástico, lona, aluminio.

El látex que coagula sobre la incisión, luego que ha cesado el flujo, se raspa con utensilios no corrosivos y se mezcla con el anterior, ya que no existe diferencia en la actividad proteolítica entre la papaína obtenida del látex fluido y del que coagula en la incisión.

Luego de ser colectado el látex, este es transportado en recipientes de material adecuado y se somete ya sea a un simple proceso de secado o directamente a un proceso de purificación, dependiendo de su uso final.

3.4.10 Medición de la Actividad Proteolítica ⁽²⁾

3.4.10.1 Definición

La efectividad o potencia de una enzima es más útilmente expresada en términos de actividad. Cuando es posible ésta es expresada en Unidades de Actividad las cuales se definen en términos del peso de sustrato transformado en producto, en un tiempo determinado. En el caso de la papaína, que es una enzima hidrolítica, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un mol de sustrato en un minuto.

La proporción en que la enzima cataliza las reacciones está afectada por la concentración del sustrato, la temperatura y el pH de la solución en que es medida, por lo tanto ambas condiciones deben ser establecidas para que la medición tenga sentido y pueda usarse para propósitos comparativos.

Actualmente hay 3 tipos comunes de ensayos utilizados para medir la actividad de la papaína:

- 1) El método que se basa en la hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos; estos métodos son los más exactos, mas caros y menos pertinentes para aplicaciones prácticas.
- 2) El método que se basa en el grado de hidrólisis de sustratos proteínicos; existen una gran variedad de éstos métodos debido a tanta combinación de proteínas y metodología a escoger, son los métodos más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y fuente de proteína usada así como las condiciones en que se lleva a cabo el ensayo.
- 3) Los métodos que se basan en la habilidad de la enzima coagular la leche, estos métodos son los más baratos en término de materiales, pero no en el tiempo que se toman: se expresan los resultados en unidades de coagulación de leche (m.c.u.= milk clotting unites).

Método Modificado de Kunitz

En esta tesis se trabajará para medir la actividad de la papaína con el Método Modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de enzima;

este método pertenece al segundo grupo de métodos de medición de actividad proteolítica antes mencionado.

3.4.10.2 Principio del Método ⁽²⁾

Una solución de la enzima es incubada, bajo condiciones estándar con caseína desnaturalizada. La reacción es detenida por la adición de ácido tricloroacético (TCA).

La proteína no hidrolizada es precipitada por el TCA añadido. El precipitado es removido por filtración y la absorbancia de la capa sobrenadante es medida espectrofotométricamente a 280 nm. El incremento de la absorbancia a 280 nm, después de la incubación es una medida de la actividad enzimática

3.5 INMOVILIZADO DE ENZIMA ⁽¹⁵⁾

3.5.1. Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente ⁽²⁴⁾.

Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte.

3.5.2 Ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas

1. El aumento de la estabilidad de la enzima;

2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

3.5.3 Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

3.5.4. Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,

2. Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima,
3. La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva,
4. Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Efectos en la estabilidad

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones:

1. Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte.

La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes.

2. Una protección frente a las proteasas en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica.
3. Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
4. Existe una *alteración del microentorno* del enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima es sensible al oxígeno

(como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

3.5.5 Aplicaciones de la enzima inmovilizadas

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas
3. Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.

3.5.6 Requerimientos básicos de un sistema inmovilizado ⁽³⁾

Se requieren cuatro elementos básicos:

1. La enzima

2. El soporte
3. Técnica de inmovilización
4. Reactor.

3.5.6.1 Soporte

Los materiales utilizados como soporte incluyen tanto materiales orgánicos como inorgánicos. Los soportes orgánicos tienen más sitios de enlace por gramo, pero a menudo no tienen las propiedades más deseables de fluidez y son afectados por factores ambientales como pH o deterioro por microorganismos. Ejemplos de soportes orgánicos son el almidón, el dextran, la sacarosa, nylon, polímeros basados en la alquilamida.

Los soportes inorgánicos incluyen vidrios sólidos y porosos, tierra diatomeas, aluminio, silicón, pantalla de níquel, bolas de acero inoxidable, arena, roca.

Estos soportes tienen menos sitios activos que los soportes orgánicos, pero son más estables.

3.5.6.2 Agar

El Agar es un coloide de algas extraído de especies del género *Gelidium* y otras agarofitas, todas ellas pertenecientes a las algas rojas (rodófitas), es una sustancia amorfa y se halla en el comercio en forma de polvo, escamas, tiras delgadas, es poroso, translúcido, membranoso, de color amarillo, quebradizo cuando está seco y flexible cuando está húmedo.

3.5.6.3 Técnica de inmovilización

Los métodos para inmovilizar enzimas se pueden dividir en dos clases principales: métodos químicos y métodos físicos.

3.5.6.3.1 Métodos Químicos

Los métodos químicos de inmovilización incluyen cualquiera de aquellos procedimientos que involucren la formación de al menos un enlace covalente o parcialmente covalente entre una o varias moléculas enzimáticas y un polímero insoluble en agua. En realidad, normalmente se forma más de un enlace covalente entre los reactantes.

Ejemplos de métodos químicos:

- a) Acoplamiento de la enzima a polímeros funcionalmente insolubles en agua.
- b) Incorporación de la enzima dentro de cadenas crecientes de polímeros.
- c) Enlazamiento intermolecular de la enzima con un reactivo multifuncional de bajo peso molecular

3.5.6.3.2 Métodos Físicos

En los métodos físicos se incluyen a todos aquellos procedimientos que involucren la fijación de una enzima en un soporte, sin la formación de un enlace covalente. En estos procedimientos, la inmovilización de las enzimas es dependiente de la operación de ciertas fuerzas físicas tales como interacciones electrostáticas, formación de enlaces iónicos, interacciones proteína-proteína, etc. El atrapamiento en microcompartimientos o la contención en membranas semipermeables

Ejemplos de métodos físicos:

- a) Adsorción de la enzima sobre una matriz insoluble en agua.
- b) Atrapamiento de la enzima dentro de una matriz gelatinosa insoluble en agua (atrapamiento en gel).
- c) Atrapamiento de la enzima dentro de una microcápsula permanente o no permanente semipermeable.
- d) Retención de la enzima dentro de dispositivos especiales dependientes de membranas semipermeables

3.5.6.4 Técnica de Atrapamiento en Gel ⁽⁴⁾

Esta técnica de inmovilización consiste en dar lugar a la formación de un gel en presencia de la enzima. Las condiciones deben ser idóneas para producir un gel con poros más pequeños que la enzima, de manera que ésta quede atrapada dentro de la matriz del gel; además estos poros deben ser suficientemente grandes para permitir la difusión y transformación del sustrato, y finalmente la liberación del producto

3.5.6.5 Reactores ⁽⁴⁾

Un reactor enzimático es básicamente, el recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control. El reactor provee la unión central entre el lote de alimentación inicial y el producto.

De acuerdo a las características de manejo del sustrato en el sistema los reactores se pueden clasificar en reactores de flujo continuo y flujo discontinuo o reactores en lotes.

3.5.6.6 Reactor semicontinuo ⁽⁴⁾:

Consiste en colocar dentro de la columna de vidrio la enzima inmovilizada y la muestra de agua a tratar y dejar en contacto por un periodo de 24 horas, transcurrido ese tiempo se lee en el Spectronic 20 a 610 nm

3.6 LIOFILIZADO ⁽¹⁶⁾

3.6.1 Características de la Liofilización

La liofilización consiste en una desecación del sólido que contiene disolvente (generalmente agua). En primer lugar, el producto es congelado y, más tarde, el disolvente será eliminado por sublimación a través de un sistema de vacío. El sólido, por ello, no pierde sus características originales. El producto resultante es un polvo liofilizado, que debe ser reconstituido en el momento de su utilización.

3.6.2 Etapas de la Liofilización

Para efectuar la liofilización se siguen varias etapas:

1. Congelación: Para conseguirla se somete el producto a temperaturas muy bajas (-20°C), con la mayor rapidez posible para no modificar su estructura.
2. Desecación primaria: Se realiza mediante un sistema de vacío que permite que el agua pase a gas por sublimación a baja temperatura.

3. Deseccación secundaria: Consiste en eliminar la humedad residual del agua, fuertemente ligada, mediante evaporación.
4. Rehidratación del producto liofilizado.

3.6.3 El Liofilizador

El liofilizador es un aparato en el que podemos distinguir una serie de partes:

- a) Cámara de liofilización o cámara de desecación.

En la que se encuentran unas bandejas huecas por las que transcurre el fluido calefactor o el refrigerante, y en las que se coloca el producto previamente congelado o no, dependiendo del liofilizador. El fluido refrigerante o calefactor se hará pasar según la fase del proceso en la que nos encontremos.

- b) Cámara de condensación.

Que dispone de una tubería fría (condensador) cuya función es enfriar el vapor de agua obtenido en la cámara de liofilización, quedando en forma de hielo adherido a sus paredes y evitando que ingrese en la cámara de vacío.

- c) Bombas de vacío.

Se encuentran conectadas a las dos cámaras, de tal manera que, cuando comienza el proceso, se cierra la conexión con la cámara de liofilización, pero no con la de condensación, para que así el vapor producido sea arrastrado al condensador. Por efecto del vacío, se producirá sublimación de hielo que pasa a vapor, con lo que el producto se va desecando progresivamente, descendiendo su temperatura. Por ello, es necesario aportar posteriormente calor a las placas.

Cuando se haya producido la sublimación, su temperatura aumentará hasta igualar la de las placas calefactores y el vapor será arrastrado al condensador.

Capitulo IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

El trabajo de investigación se clasificó como:

Estudio retrospectivo: porque se basó en estudios anteriores

Estudio prospectivo: ya que se exploró posibilidades futuras basándonos en indicios presentes

Estudio Experimental: porque se comprobó el poder proteolítico de la papaína.

4.2 Investigación Bibliográfica.

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas
- Investigación en Internet.
- Investigación en la Universidad Alberto Masferrer

4.3 Universo.

Vertido de Aguas Residuales de Industrias Lácteas de la Ciudad de Aguilares
Departamento de San Salvador.

4.4 Muestras

Se recolecto 9 muestras de un litro de aguas residuales de las Industrias Lácteas.

4.5 Métodos e instrumentos de recolección de datos.

- a) Llevar la prueba por duplicado para asegurar confiabilidad de los resultados.
- b) Espectrofotómetro Ultravioleta con $\lambda = 280$ nm
- c) Espectrofotómetro Spectronic 20 con $\lambda = 610$ nm.
- d) Liofilizador Testar Cryodos 50

4.6 Parte Experimental

4.6.1 Extracción del látex de papayo (*Carica papaya*) nacional ⁽⁵⁾

(Ver anexo 10 Figura 25)

- a) Sanitizar el área de trabajo, limpiando con toalla el área, luego agregar texapón lavando con mascón, lavar con agua destilada y por ultimo agregar cloruro de benzalconio dejando actuar por 10 minutos y secar con toalla.
- b) Sanitizar las papayas lavándolas con jabón luego con agua destilada, dejar que sequen solas (ver anexo 9 Fig. 14).
- c) Colocar mecheros alrededor del área de trabajo para evitar la contaminación.
- d) Hacer las incisiones en la papaya con un cuchillo de acero inoxidable teniendo el cuidado que no cortar el fruto.
- e) Recolectar el látex en un beaker y luego trasladar a tubos previamente esterilizados, enfriar inmediatamente -20°C y por un periodo entre 3 y 4 horas.

4.6.2 Liofilización de la enzima₍₂₈₎. (Ver Anexo 10 Figura 26)

- a) Encender el aparato liofilizador Testar Cryodos 0 hasta que la presión llegue a cero (Anexo 9 Fig. 16).

- b) Transportar las muestras en Nitrógeno líquido al liofilizador.
- c) Colocar los tubos dentro de los balones y conectar a las válvulas del cilindro del condensador del aparato liofilizador (Anexo 9 Fig 17).
- d) Abrir las válvulas con las que se efectúa el vacío en el interior del recipiente comenzando la sublimación de la muestra.
- e) Colocar uno por uno los balones teniendo el cuidado que la presión no baje.
- f) Una vez que todos los balones están conectados, dejar en funcionamiento el equipo por un periodo de 4 a 5 horas hasta total desecación.
- g) Almacenar en refrigeración en frascos viales previamente esterilizados, dejarlos en refrigeración (estas muestras tienen una duración aproximadamente de 3 años).

4.6.3 Inmovilización de la enzima₍₅₎. (Ver anexo 10 Figura 27)

- a) En una balanza granataría pesar 10 g de agar-agar.
- b) En un erlenmeyer de 250mL colocar Agar y adicionar 100mL de agua destilada.
- c) Calentar en baño de agua hasta completar disolución, agitar constantemente.
- d) Esterilizar la solución homogénea en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos.
- e) Enfriar hasta 60°C y mantener en baño María.

4.6.4 Mezcla enzima-soporte₍₅₎ (Ver anexo 10 Figura 28)

- a) Pesar en balanza analítica 400 mg de la enzima papaína.

- b) Mezclar la enzima con la solución de agar a 47°C.
- c) Agitar vigorosamente por 3 minutos.
- d) Mantener la mezcla en baño de agua a 45°C.

4.6.5 Moldeo de la enzima ⁽⁵⁾ (Ver anexo 10 Figura 29)

- a) Con una jeringa de 3.0cc dejar caer la mezcla agar-enzima en agua fría 5°C, destilada estéril formando esferas.
- b) Retirar las esferas del agua, lavar y obtener peso.
- c) Almacenar las esferas en una solución de agua estéril a 10°C.

4.6.6 Ensayo general de actividad por el Método Modificado de Kunitz⁽⁵⁾ (Ver Anexo 6 figura 12)

- a) En cuatro tubos de ensayo, pipetear 1 mL de Sustrato de Caseína ajustado a pH 9 (Con Acido cítrico 0.05M o Hidróxido sodio 0.2N).
- b) Etiquetar los tubos de la siguiente manera: E¹⁵, E⁰, I¹⁵, I⁰.
- c) Colocar los tubos en baño de agua a 40°C y dejar reposar por 10 minutos.
- d) En el tubo E¹⁵ pipetear 1 mL de la solución papaína, agitar y colocar en el baño de agua.
- e) En el tubo I¹⁵ colocar una cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 1 mL.
- f) Repetir el procedimiento anterior para el tubo vacío E⁰ el cual se le añade 1 mL de la solución de papaína y para el tubo I⁰, se añade el equivalente de enzima inmovilizada.
- g) Incubar por 15 minutos.

- h) Detener la reacción adicionando 3 mL de solución de ácido tricloroacético a los tubos E¹⁵, E⁰, I¹⁵, I⁰, agitar después de cada adición.
- i) Añadir el contenido del tubos E⁰ en el tubo E^{0'} y el tubo I⁰ en el tubo I^{0'}.
- j) Colocar los tubos en baño María a 40°C durante una hora para permitir la coagulación completa de la proteína precipitada.
- k) Filtrar en papel filtro Whatman # 42.
- l) Leer las absorbancias de los filtrados a 280 nm y el blanco (solución ácido tricloroacético).

4.6.7 Recolección de la muestra₍₈₎ (ver anexo 30)

- a) Lavar los frascos de plástico de un litro dos o tres veces con el agua residual a recolectar.
- b) Tomar la muestra de agua residual en forma manual.
- c) Llenar el frasco por completo sin dejar espacios de aire.
- d) Identificar todas las muestras tomadas poniendo una etiqueta con la siguiente información: Fecha y hora de recolección, lugar de recolección, nombre de la persona que tomara la muestra, hora y análisis a realizar.
- e) Almacenar en refrigeración a 4°C para conservar sus propiedades originales para su posterior análisis.

NOTA: El periodo transcurrido entre la toma de muestra y su almacenamiento no debe sobrepasar las 6 horas.

4.6.8 Tratamiento de Aguas Residuales de vertido lácteo con la enzima papaína inmovilizada₍₈₎ .

Al tener las condiciones óptimas en la cual la enzima inmovilizada ejercerá una mayor acción sobre las proteínas se procederá de la siguiente manera:

- a) Colocar en una columna de vidrio 25.0g de enzima inmovilizada equivalente a la cantidad de enzima inmovilizada que se obtenga en 1 mL de solución de papaína.
- b) Tomar 50 mL de muestra de agua residual de lechería recolectada.
- c) Leer a una longitud de onda de 610 nm.
- d) Modificar el pH de la muestra, en donde se presente mayor actividad.
- e) Colocar dentro de la columna de vidrio 25 mL de agua residual de lechería a analizar.
- f) Concluidos los 15 minutos girar el regulador de flujo para extraer el agua residual tratada, y coleccionar en un beaker.
- g) Colocar el agua residual tratada dentro de la celda y leer a una longitud de onda de 610 nm.
- h) Seguir este procedimiento hasta que la enzima inmovilizada ya no actúe sobre las proteínas presentes en las aguas de vertido.
- i) Cuando la actividad de la enzima inmovilizada se vea disminuida se puede hacer un lavado con solución buffer fosfato pH 6.0.
- j) Continuar con los tratamientos hasta que la actividad de la enzima se vea disminuida al mínimo o ya no presenta actividad

Capitulo V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

La papaína por ser una enzima de naturaleza proteica, factores como la temperatura y el pH son importantes ya que la desnaturalizan influyendo en su actividad. Como fue extraída en forma natural se fue necesario determinar su pH y temperatura óptima de actividad tanto cruda (sin tratamiento) como liofilizada libre e inmovilizada para luego ser comparada con una comercial.

5.1 Determinación de pH optimo de actividad de la Enzima cruda libre e Inmovilizada

Cuadro N° 6: Resultados de las lecturas de la absorbancia de la enzima cruda libre e inmovilizada a 280 nm a 40°C.

pH	E ⁰	E ¹⁵	I ⁰	I ¹⁵
5.0	0.185	0.270	0.226	0.243
6.0	0.085	0.579	0.255	0.962
7.0	0.180	0.254	0.103	0.282
7.5	0.076	0.110	0.062	0.221
8.0	0.102	0.343	0.196	0.306
9.0	0.130	0.147	0.323	0.332

E⁰, E¹⁵ = Enzima en solución

I⁰, I¹⁵ = Enzima Inmovilizada

Cálculos: Ver anexo 6.

Cuadro N° 7: Actividad en Unidades Kunitz de la enzima libre e inmovilizada cruda a diferentes pH y a una temperatura constante de 40°C.

pH Sustrato	Actividad enzima cruda libre UK	Actividad enzima cruda inmovilizada UK
5.0	0.28 x 10 ⁴	0.06 x 10 ⁴
6.0	1.65 x 10 ⁴	2.36 x 10 ⁴
7.0	0.25 x 10 ⁴	0.59 x 10 ⁴
7.5	0.11 x 10 ⁴	0.19 x 10 ⁴
8.0	0.80 x 10 ⁴	0.37 x 10 ⁴
9.0	0.06 x 10 ⁴	0.03 x 10 ⁴

UK: Unidades Kunitz

Cálculos: ver anexo 6

Cuadro N°8: Porcentaje de actividad de enzima libre e inmovilizada cruda a diferentes pH y a una temperatura constante de 40°C

pH Sustrato	Porcentaje de actividad Enzima cruda libre	Porcentaje de actividad Enzima cruda inmovilizada
5.0	16.97	2.54
6.0	100	100
7.0	15.15	25
7.5	5.67	22.46
8.0	48.49	15.68
9.0	3.64	1.27

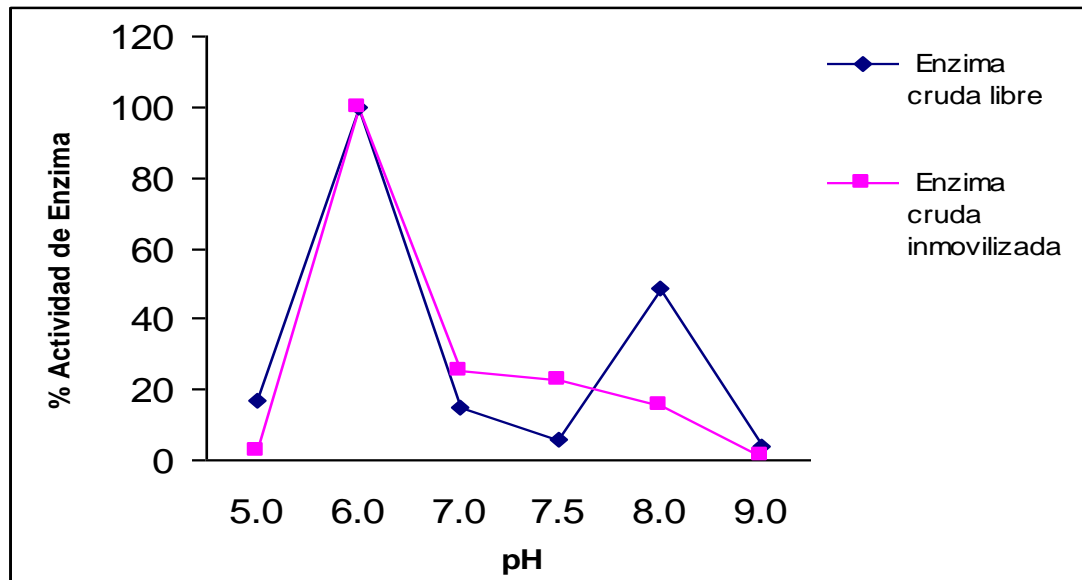


Figura N°2: Gráfica de porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferente pH y a una temperatura constante de 40°C

Interpretación de Resultados:

La figura N°2 representa la gráfica de porcentaje de actividad a diferentes pH, tanto la enzima cruda libre como la enzima cruda inmovilizada presentan un 100% de actividad a un pH 6.

5.2 Determinación de Temperatura óptima de la Enzima cruda libre e inmovilizada

Cuadro N° 9: Absorbancias de enzima libre e inmovilizada cruda a 280 nm a pH 6.0 y a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	E ^{0'}	E ¹⁵	I ^{0'}	I ¹⁵
20	0.267	0.313	0.124	0.242
30	0.127	0.236	0.136	0.236
40	0.085	0.579	0.255	0.962
50	0.187	0.207	0.200	0.279
60	0.115	0.130	0.161	0.200

Cálculos: ver anexo 6

Cuadro N° 10: Actividad en Unidades Kunitz de la enzima cruda libre e inmovilizada a un pH= 6.0 a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Actividad enzima cruda libre UK	Actividad enzima natural inmovilizada UK
20	0.15×10^4	0.33×10^4
30	0.36×10^4	0.39×10^4
40	1.65×10^4	2.36×10^4
50	0.06×10^4	0.26×10^4
60	0.05×10^4	0.13×10^4

UK: Unidades Kunitz

Cálculos: Ver anexo 6

Cuadro N° 11: Porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 6.

Temperatura (°C)	Porcentaje de actividad Enzima cruda libre	Porcentaje de actividad Enzima cruda inmovilizada
20	9.09	16.53
30	21.82	13.98
40	100	100
50	4.24	11.02
60	3.03	5.51

Cálculos: ver anexo 6

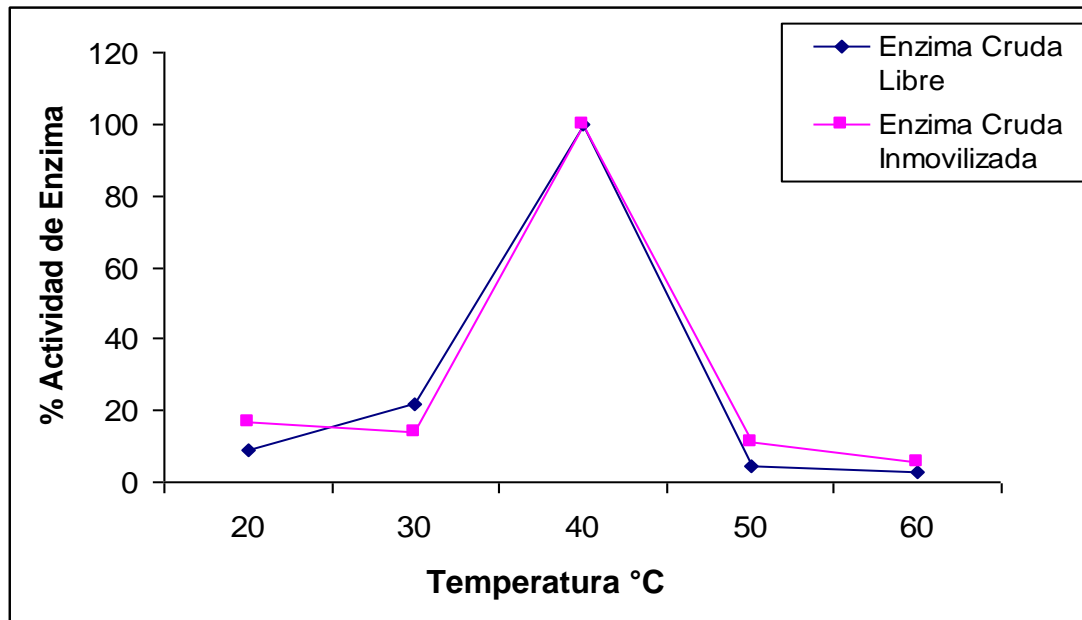


Figura N°3: Grafica de Porcentaje de actividad de enzima cruda libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 6

Interpretación de Resultados:

La figura N° 3 representa el porcentaje de actividad contra la variación de la temperatura. Ambas presentan un 100% de actividad a una temperatura de 40°C.

5.3 Determinación de pH óptimo de Enzima Liofilizada libre e Inmovilizada

Cuadro N°12: Resultados de las lecturas de la absorbancia de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a 280 nm a 40°C.

pH	$E^{0'}$	E^{15}	$I^{0'}$	I^{15}
5.0	0.173	0.206	0.259	0.326
6.0	0.140	0.296	0.109	0.348
7.0	0.124	1.310	0.270	0.902
Tr7.5	0.084	0.145	0.216	0.473
8.0	0.194	1.105	0.289	0.776
9.0	0.154	0.204	0.240	0.371

$E^{0'}$, E^{15} = Enzima en solución

$I^{0'}$, I^{15} = Enzima Inmovilizada

Cálculos: Ver anexo 6.

Cuadro N° 13: Actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 40°C.

pH Sustrato	Actividad enzima liofilizada libre UK	Actividad enzima liofilizada inmovilizada UK
5.0	0.11×10^4	0.22×10^4
6.0	0.52×10^4	0.79×10^4
7.0	3.95×10^4	2.11×10^4
7.5	0.20×10^4	0.86×10^4
8.0	3.04×10^4	1.62×10^4
9.0	0.17×10^4	0.44×10^4

UK: Unidades Kunitz

Cuadro N° 14: Porcentaje de actividad de enzima Liofilizada libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 40°C

pH Sustrato	Porcentaje de actividad Enzima liofilizada libre	Porcentaje de actividad Enzima liofilizada inmovilizada
5.0	2.78	10.43
6.0	13.16	37.44
7.0	100	100
7.5	5.06	40.76
8.0	76.96	76.78
9.0	4.30	20.85

Cálculos: ver anexo 6

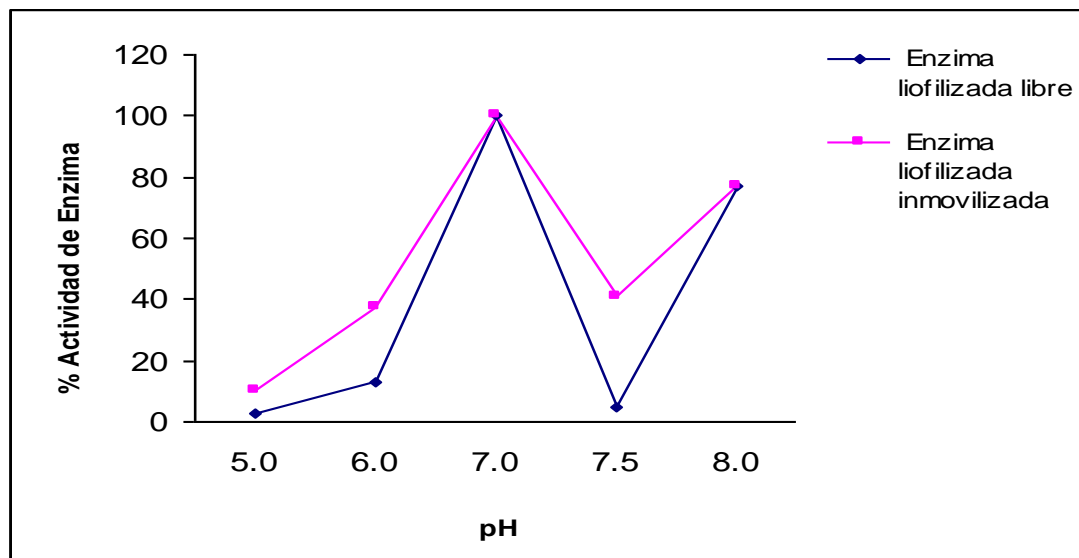


Figura N°4: Gráfica de Porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 40°C.

Interpretación de Resultados:

La figura N°4 representan las variaciones de pH contra el porcentaje de actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a una temperatura constante de 40°C ambas enzimas presentan dos máximos con un 100% de actividad a un pH 7 y un 76% a un pH de 8.0, por lo que a pH de 7.0 será utilizada para los ensayos de temperatura optima de actividad.

5.4 Determinación de Temperatura óptima de la enzima liofilizada libre e Inmovilizada pH= 7.0 y a diferentes temperaturas

Cuadro N° 15: Resultados de las lecturas de la absorbancia de la Enzima Liofilizada libre e inmovilizada a 280nm a pH 7.0 a diferente Temperatura

Temperatura (°C)	E ⁰	E ¹⁵	I ⁰	I ¹⁵
20	0.151	0.260	0.258	0.463
30	0.959	0.963	0.207	0.363
40	0.124	1.310	0.270	0.902
50	0.126	0.380	0.301	0.335
60	0.175	0.313	0.167	0.338

Cálculos: ver anexo 6

Cuadro N° 16: Actividad de la enzima liofilizada libre e inmovilizada a un pH= 7.0 a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Actividad enzima liofilizada libre UK	Actividad enzima liofilizada inmovilizada UK
20	0.36 x 10 ⁴	0.68 x 10 ⁴
30	0.01 x 10 ⁴	0.52 x 10 ⁴
40	3.95 x 10 ⁴	2.11 x 10 ⁴
50	0.85 x 10 ⁴	0.11 x 10 ⁴
60	0.46 x 10 ⁴	0.57 x 10 ⁴

UK: Unidades Kunitz

Cálculos: Ver anexo 6

Cuadro N° 17: Porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 7.

Temperatura (°C)	Porcentaje de actividad Enzima liofilizada libre	Porcentaje de actividad Enzima liofilizada inmovilizada
20	9.11	32.23
30	0.25	24.64
40	100	100
50	21.52	5.21
60	11.65	27.01

Cálculos: ver anexo 6

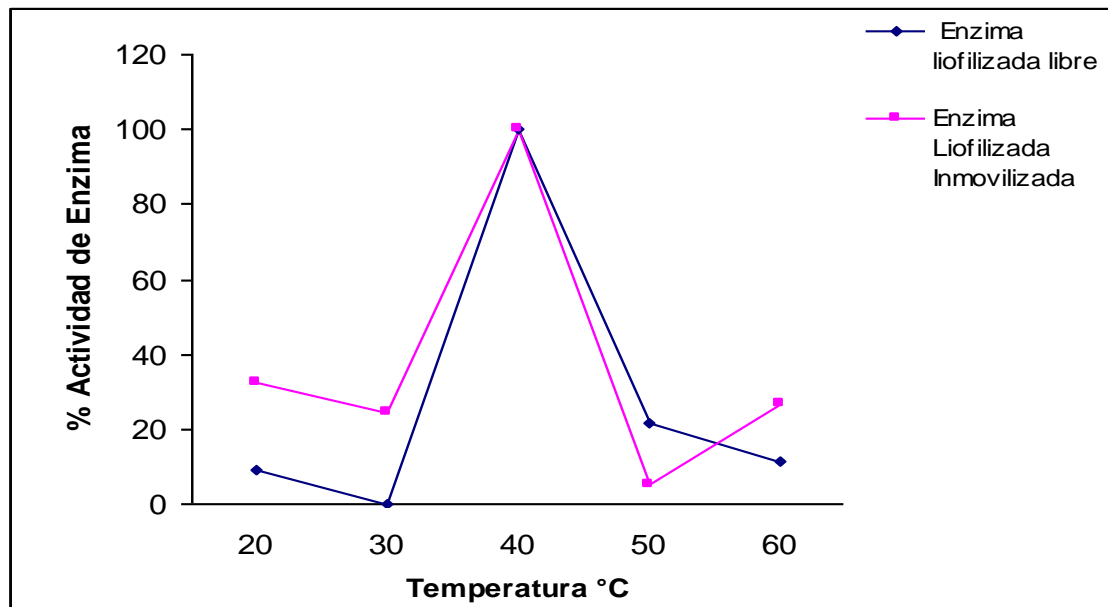


Figura N°5: Grafica de porcentaje de actividad de enzima liofilizada libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 7

Interpretación de Resultados

La figura N°5 muestra el porcentaje de actividad de las enzimas liofilizada libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y un pH constante de 7. Ambas enzimas a temperatura de 40°C presentan un 100% de actividad.

5.5 Determinación de pH óptimo de Enzima Comercial libre e Inmovilizada

Cuadro N°18: Resultados de las lecturas de la absorbancia de la enzima comercial libre e inmovilizada a 280 nm a 30°C.

pH	$E^{0'}$	E^{15}	$I^{0'}$	I^{15}
5.0	0.126	0.140	0.153	0.212
6.0	0.064	0.166	0.103	0.267
7.0	0.042	0.052	0.100	0.234
7.5	0.032	0.033	0.083	0.196
8.0	0.046	0.091	0.188	0.266
9.0	0.040	0.054	0.110	0.246

$E^{0'}$, E^{15} = Enzima en solución

$I^{0'}$, I^{15} = Enzima Inmovilizada

Cálculos: Ver anexo 6.

Cuadro N°19: Actividad de la enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 30°C.

pH Sustrato	Actividad enzima comercial libre UK	Actividad enzima comercial inmovilizada UK
5.0	0.05×10^{-4}	0.20×10^{-4}
6.0	0.34×10^{-4}	0.55×10^{-4}
7.0	0.03×10^{-4}	0.45×10^{-4}
7.5	0.003×10^{-4}	0.38×10^{-4}
8.0	0.15×10^{-4}	0.26×10^{-4}
9.0	0.05×10^{-4}	0.45×10^{-4}

UK: Unidades Kunitz

Cuadro N°20: Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 30°C

pH Sustrato	Porcentaje de actividad Enzima comercial libre	Porcentaje de actividad Enzima comercial inmovilizada
5.0	13.82	36.36
6.0	100	100
7.0	9.82	91.82
7.5	0.88	59.09
8.0	44.12	47.28
9.0	14.70	91.82

Cálculos: ver anexo 6

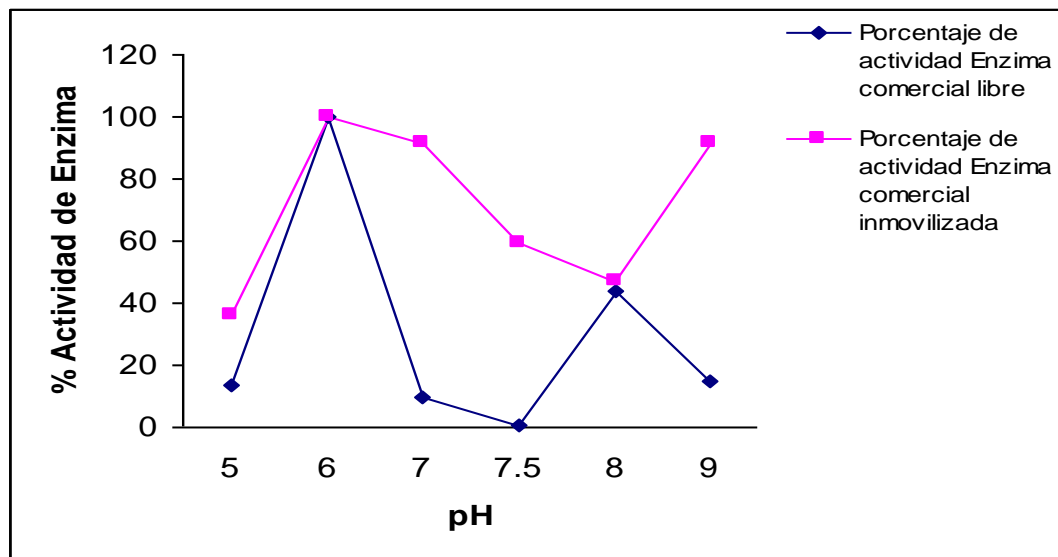


Figura N°6: Gráfica de Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes pH y a una temperatura constante de 30°C.

Interpretación de Resultados:

La figura N°6 muestra el porcentaje de actividad a diferente pH de la enzima Comercial libre e inmovilizada presentando un 100% de actividad por lo que se trabajo a este pH para posteriores ensayos. Además la enzima comercial libre presenta 91.82% a pH 7 y 9.0.

5.6 Determinación de Temperatura óptima de la enzima comercial libre e inmovilizada.

Cuadro N° 21: Absorbancias de enzima comercial libre e inmovilizada a 280 nm a pH= 6.0 y a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	E ⁰	E ¹⁵	I ⁰	I ¹⁵
20	0.089	0.121	0.111	0.114
30	0.064	0.166	0.153	0.212
40	0.081	0.112	0.150	0.197
50	0.137	0.145	0.135	0.138
60	0.081	0.148	0.150	0.200

Cálculos: ver anexo 6

Cuadro N° 22: Actividad de la enzima comercial libre e inmovilizada a un pH= 6 a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Actividad enzima comercial libre UK	Actividad enzima comercial inmovilizada UK
20	0.11 x 10 ⁴	0.10 x 10 ⁴
30	0.34 x 10 ⁴	0.20 x 10 ⁴
40	0.10 x 10 ⁴	0.16 x 10 ⁴
50	0.03 x 10 ⁴	0.01 x 10 ⁴
60	0.22 x 10 ⁴	0.17 x 10 ⁴

UK: Unidades Kunitz

Cálculos: Ver anexo 6

Cuadro N° 23: Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 6.

Temperatura (°C)	Porcentaje de actividad Enzima comercial libre	Porcentaje de actividad Enzima comercial inmovilizada
20	32.35	50.0
30	100	100
40	24.41	90.0
50	9.82	3.33
60	54.71	95.0

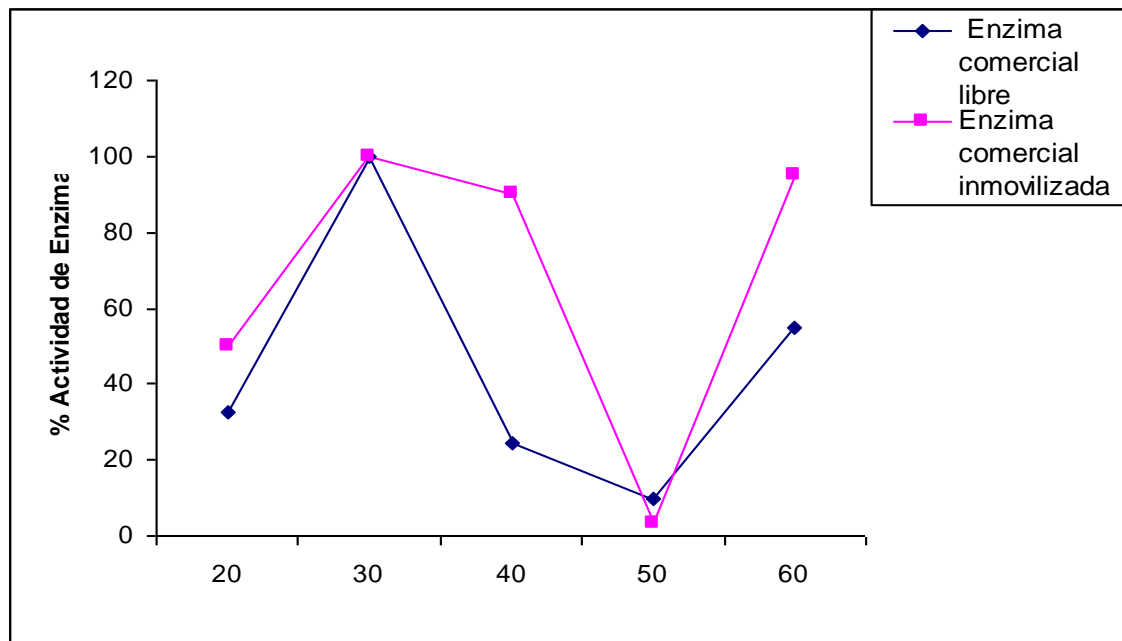


Figura N°7: Gráfica de Porcentaje de actividad de enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y a pH constante de 6

Interpretación de Resultados

La figura N°7 muestra el porcentaje de actividad de la enzima comercial libre e inmovilizada a diferentes temperaturas y un pH 6 constante ambas enzimas presentan un 100% de actividad a una temperatura de 30°C y una mínima actividad de 3.33 % a una temperatura de 50°C, evidenciando la desnaturalización de la enzima

5.7 Comparación de Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Libre

Cuadro N° 24: Actividad de Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Libre

pH Sustrato	Actividad de Enzima Cruda Libre UK	Actividad de Enzima Liofilizada Libre UK	Actividad de Enzima Comercial Libre UK
5.0	0.28×10^4	0.11×10^4	0.05×10^4
6.0	1.65×10^4	0.52×10^4	0.34×10^4
7.0	0.25×10^4	3.95×10^4	0.03×10^4
7.5	0.11×10^4	0.20×10^4	0.003×10^4
8.0	0.80×10^4	3.04×10^4	0.15×10^4
9.0	0.06×10^4	0.17×10^4	0.05×10^4

Cálculos: Ver anexos 6

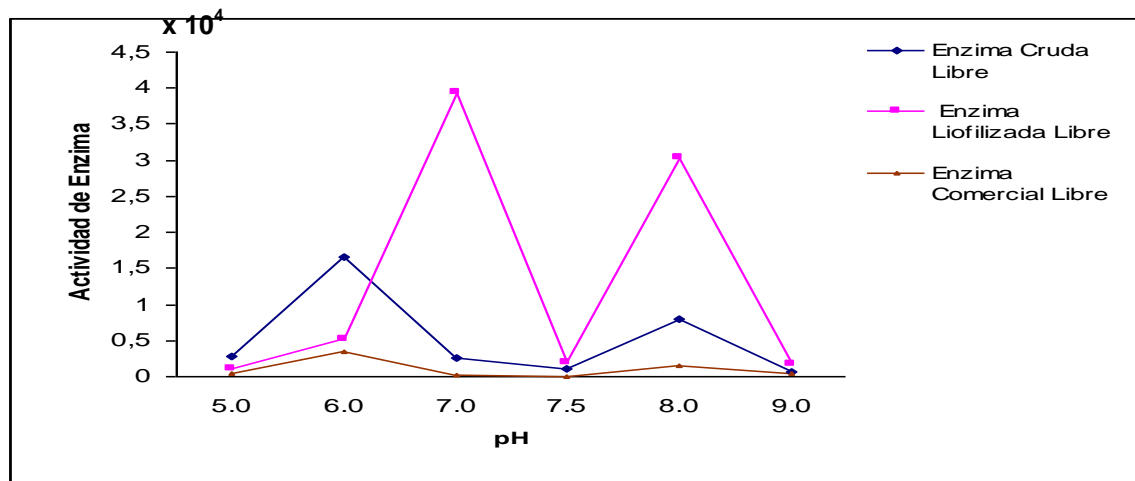


Figura N° 8: Grafica de Comparación de actividad de la Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Libre.

Interpretación de Resultados:

En la Figura N°8 se hizo una comparación de las tres enzimas libres, donde se puede observar que la enzima cruda libre presenta 1.65×10^4 UK de actividad a un pH 6.0, la enzima liofilizada libre presenta dos máximos de actividad de 3.95×10^4 a un pH 7.0 y 3.04×10^4 a un pH 8.0, y la enzima comercial libre presenta su máximo de actividad de 0.17×10^4 a pH 9.0, donde se puede observar que la presenta una mayor actividad de las tres es la enzima liofilizada libre, la comercial es la que presenta una actividad muy baja.

5.8 Comparación de Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Inmovilizada

Cuadro N° 25: Actividad de Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Inmovilizada

pH Sustrato	Actividad de Enzima Cruda Inmovilizada UK	Actividad de Enzima Liofilizada Inmovilizada UK	Actividad de Enzima Comercial Inmovilizada UK
5.0	0.06×10^4	0.22×10^4	0.20×10^4
6.0	2.36×10^4	0.79×10^4	0.55×10^4
7.0	0.59×10^4	2.11×10^4	0.45×10^4
7.5	0.19×10^4	0.86×10^4	0.38×10^4
8.0	0.37×10^4	1.62×10^4	0.26×10^4
9.0	0.03×10^4	0.44×10^4	0.45×10^4

Cálculos: Ver anexos 6

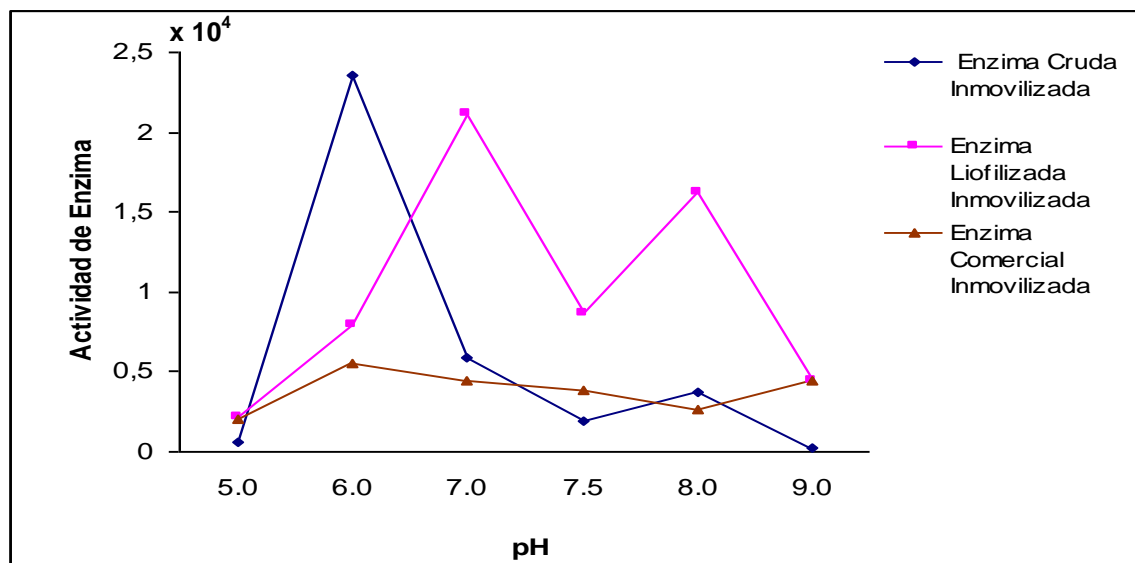


Figura N° 9: Grafica de Comparación de actividad de la Enzima Cruda, Liofilizada y Comercial Inmovilizada.

Interpretación de Resultados:

En la Figura N°9 se hizo una comparación de las tres enzimas inmovilizadas donde la enzima cruda inmovilizada presenta su máximo de actividad de 2.36×10^4 a pH 6.0, la enzima liofilizada presenta dos máximos de 2.11×10^4 a pH 7 y 1.62×10^4 a pH 8.0, la enzima comercial su máximo fue de 0.45×10^4 a pH 9.0; la que presentó mayor actividad de las tres fue la enzima cruda inmovilizada.

5.9 Determinación del tiempo de actividad de la enzima papaína cruda Inmovilizada en el Control de las aguas Residuales de Lecherías.

Para la aplicación de las enzimas en las aguas residuales de lechería se utilizo solamente la enzima cruda inmovilizada a un pH 6 y a una temperatura de 40°C y se midió el tiempo que dura la enzima activa.

Cuadro N° 26: Absorbancias antes y después del tratamiento de agua residual de Lecherías con enzima cruda inmovilizada y actividad de la enzima

Numero de muestra	Tiempo (minutos)	Actividad de enzima cruda inmovilizada
1	15	0.87×10^4
2	30	0.93×10^4
3	45	0.93×10^4
4	60	0.89×10^4
5	75	1.11×10^4
6	90	0.95×10^4
7	105	1.14×10^4
8	120	1.13×10^4
9	135	1.26×10^4 *
10	150	1.21×10^4 *
11	165	1.16×10^4
12	180	1.11×10^4
13	195	1.19×10^4
14	210	1.20×10^4
15	225	1.12×10^4
16	240	1.14×10^4
17	255	1.12×10^4
18	270	1.06×10^4
19	285	1.01×10^4
20	300	0.84×10^4 **
21	315	1.11×10^4
22	330	1.03×10^4
23	345	0.98×10^4
24	360	1.06×10^4
25	375	0.89×10^4 **
26	390	0.99×10^4
27	405	1.11×10^4
28	420	1.16×10^4
29	435	1.10×10^4
30	450	1.10×10^4
31	465	1.01×10^4
32	480	1.14×10^4

Cuadro N° 26: Continuación

Numero de muestra	Tiempo (minutos)	Actividad de enzima cruda inmovilizada
33	495	1.15 x 10 ⁴
34	510	1.14 x10 ⁴
35	525	1.12 x 10 ⁴
36	540	1.17 x 10 ⁴
37	555	1.17 x10 ⁴
38	570	1.17 x 10 ⁴

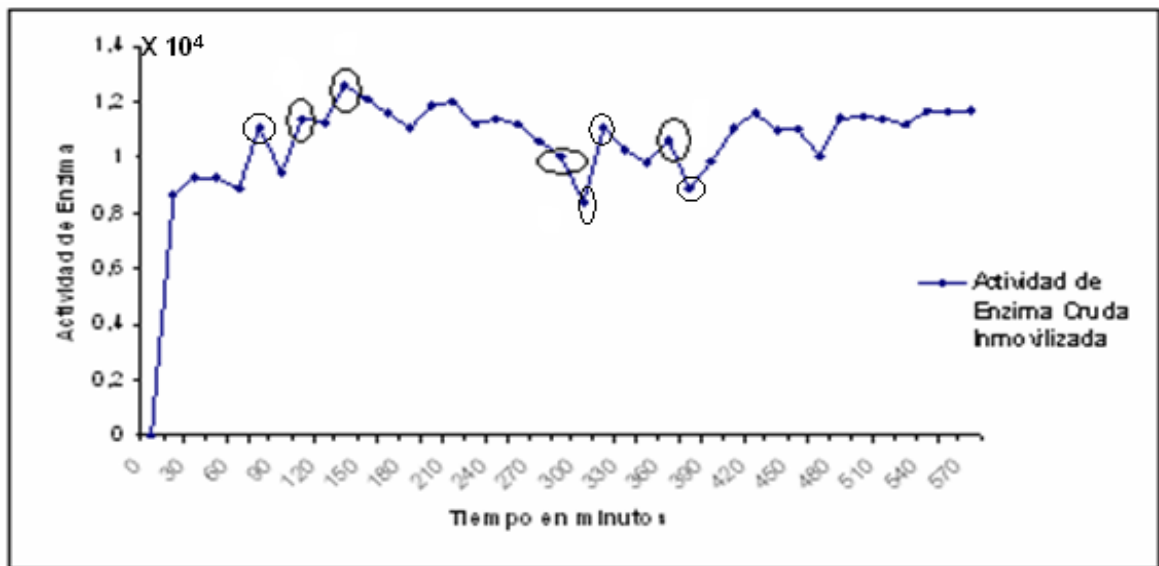


Figura N° 10: Grafica Actividad de la enzima cruda inmovilizada vrs tiempo en el tratamiento de las aguas Residuales de lecherías.

Interpretación de Resultados

La figura N°10 representa la aplicación de la enzima cruda inmovilizada sobre aguas residuales de vertidos lácteos. La enzima mantiene durante todo el proceso su actividad constante en las muestras 9 y 10 presentan una mayor actividad de 1.26 y 1.21×10^{-4} y las muestras 20 y 25 se redujo la actividad por lo que fue necesario realizarle lavados con buffer pH 6 mejorando la actividad y alargando el tiempo de actividad a 570 minutos.

5.10 Determinación del tiempo de actividad de la enzima papaína liofilizada Inmovilizada en el Control de las aguas Residuales de Lecherías.

Para la aplicación de las enzimas en las aguas residuales de lechería se utilizo solamente la enzima liofilizada inmovilizada a un pH 7 y a una temperatura de 40°C y se midió el tiempo que dura la enzima activa

Cuadro N°27: Absorbancias antes y después del tratamiento de agua residual de Lecherías con enzima liofilizada inmovilizada y actividad de la enzima

Numero de muestra	Tiempo (minutos)	Actividad de enzima liofilizada inmovilizada
1	15	0.73×10^4
2	30	0.83×10^4
3	45	0.89×10^4
4	60	1.03×10^4
5	75	1.03×10^4
* 6	90	1.14×10^4
7	105	1.09×10^4
8	120	1.12×10^4
9	135	1.08×10^4
10	150	1.15×10^4
11	165	1.16×10^4
12	180	1.21×10^4
13	195	1.19×10^4
14	210	1.21×10^4
15	225	1.08×10^4
16	240	1.15×10^4
17	255	1.11×10^4
18	270	1.13×10^4
19	285	1.15×10^4
20	300	1.11×10^4
21	315	1.14×10^4
22	330	1.09×10^4
23	345	1.14×10^4
**24	360	0.85×10^4
**25	375	0.87×10^4
26	390	1.04×10^4
**27	405	0.84×10^4
28	420	1.00×10^4
29	435	0.92×10^4

Cuadro N° 27: Continuación

Numero de muestra	Tiempo (minutos)	Actividad de enzima liofilizada inmovilizada
30	450	0.91×10^4
31	465	0.94×10^4
32	480	0.94×10^4
33	495	1.02×10^4
34	510	1.00×10^4
35	525	1.02×10^4
36	540	1.03×10^4
37	555	0.96×10^4
38	570	0.97×10^4
39	585	1.00×10^4
40	600	1.03×10^4
41	615	1.03×10^4
42	630	1.03×10^4

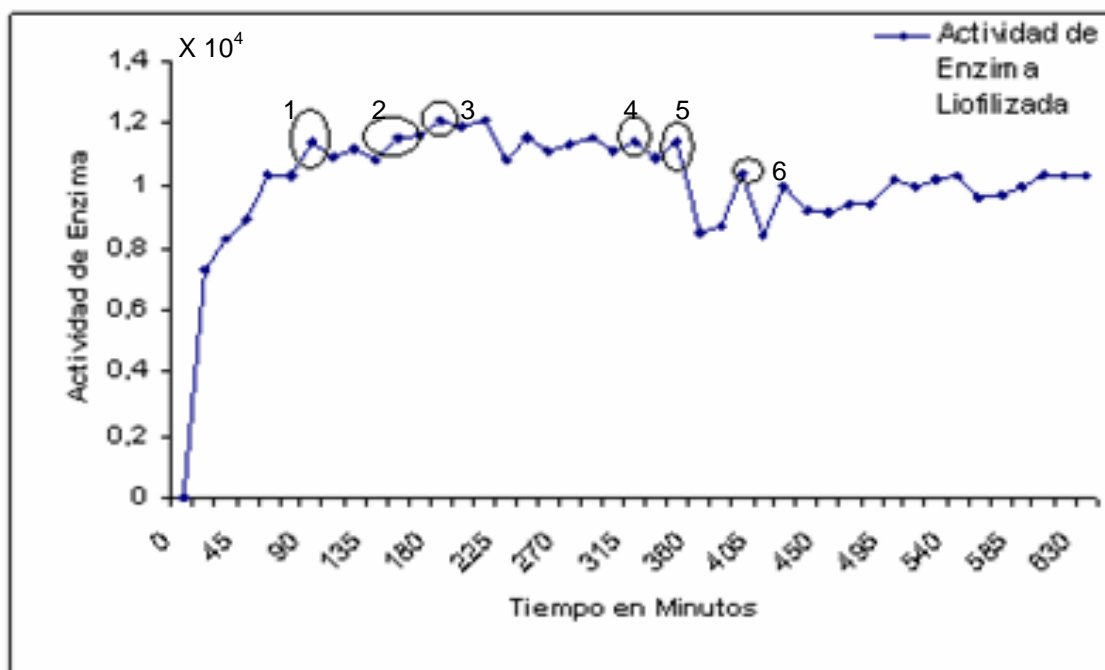


Figura N° 11: Grafica de Actividad de la enzima liofilizada inmovilizada vrs tiempo en el tratamiento de las aguas residuales de lecherías.

Interpretación de Resultados

La figura N°11 representa la aplicación de la enzima papaína liofilizada inmovilizada en el control de las aguas residuales de lechería. La enzima mantiene en la muestra 12 y 14 su mayor actividad de 1.21×10^{-4} y en las muestras 24, 25 y 27 sufre una disminución de la actividad por lo que fue necesario los lavados buffer con pH 7.0 alargando el tiempo de actividad de 630 minutos.

La enzima cruda presenta mayor actividad de 1.26×10^{-4} y la liofilizada con 1.21, con la ventaja de que la liofilizada presenta un mayor tiempo de actividad de 630 minutos contra 570 minutos de la enzima cruda.

Podemos decir que la enzima liofilizada además de presentar mayor actividad contra la enzima cruda tiene la ventaja de tener más vida útil para el tratamiento de las aguas residuales.

Capitulo VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las papayas cultivadas en El Salvador presentaron mayor cantidad de enzima papaína que las papayas importadas.
2. Los factores de pH y temperatura desnaturalizan a las proteínas como la papaína por lo que fue necesario determinar pH y temperatura optima a base de prueba y error.
3. Al comparar la enzima liofilizada con la enzima comercial el proceso de liofilización mejoro la actividad de la enzima liofilizada por lo que su mayor actividad fue de 2.11×10^{-4} a 40°C , y a un pH 7.0; en cambio la enzima comercial su máximo no así con la enzima comercial que su máximo de actividad fue 0.55×10^{-4} a 30°C y a un pH 6.0.
4. El proceso de liofilización es un método que ayudo a que el producto resultante (polvo), manejado fácilmente y con un mayor tiempo de vida útil.
5. Las enzimas papaína cruda y liofilizada presentan mayor actividad debido a los componentes principales : Papaína, Quimiopapaína y Lisozima, que la enzima comercial que presento menor actividad debido a que solo contiene un componente: Papaína.

6. El reactor semicontinuo es el indicado en el tratamiento de las aguas residuales, debido a que las proteínas son megamoléculas, y la enzima papaína necesita más tiempo para que realicen su función catalizadora.

7. Con los resultados obtenidos se confirmó que la enzima papaína cruda y liofilizada inmovilizada en gel de agar disminuye la actividad proteica por lo que puede ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales de la Industria lechera.

Capítulo VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Extraer la enzima de la papaya hacerlo en un lugar esterilizado, lavando bien la papaya con agua y jabón y luego con agua destilada porque la enzima es fácilmente degradada por microorganismos.
2. Utilizar papayas sazonas cultivadas en el país por su mayor contenido de látex.
3. Que en la extracción de la enzima papaína se debe utilizar materiales de acero inoxidable para evitar que el hierro que es un inhibidor degrade a la enzima papaína y evitar su contaminación.
4. Que la enzima papaína se extrae haciendo incisiones no profundas en fruto de la papaya aun cuando se encuentre en la planta.
5. Almacenar la enzima papaína en viales previamente esterilizados y almacenarlo en refrigeración para que la enzima tenga un mayor tiempo de actividad.
6. Realizar el moldeo la mezcla enzima-soporte con el agar-agar debe mantenerse a temperatura constante de 45°C para evitar la formación de grumos.

7. Almacenar la enzima papaína después de cada tratamiento de las aguas residuales, lavar enzima con agua destilada estéril
8. Realizar otras investigaciones utilizando la enzima papaína en otro tipo de aguas residuales de la industria alimentaría.
9. Promover la industrialización de producción de enzima papaína para darle un mayor agregado al cultivo de este fruto y así generar más fuentes de trabajo e ingreso de divisas por la exportación de esta enzima.
- 10 Tratar las aguas residuales de las industrias lecheras con la enzima papaína liofilizada inmovilizada antes de ser descartadas a los ríos para ir disminuyendo la contaminación de las aguas que estas industrias genera.
- 11 Realizar otras investigaciones para un mejor manejo en el método de extracción de la enzima papaína.
- 12 Utilizar el método de liofilización para obtener un mayor tiempo de vida útil.
- 13 Continuar con la investigación de la enzima papaína para determinar qué cantidad puede ser utilizada para tratar las aguas de residuales de lecherías a nivel industrial.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Albrecht, K., 1996. Papain, Department of Chemistry. UWEC Wisconsin, United States. Url: www.chem.uwec.edu/chem406/webpages/KAREN/Facts.html.
- 2 Boyer, Paul D. 1970. The Enzymes, 3rd Edition. New York, United States of America, Academic Press Inc. Vol III.
- 3 Burke D, Lewis S. Shafer. J.A. 1974 Two Step Procedure for Purification of papain from extract of papaya latex, Archives of Biochemistry and Biophysics,
- 4 Centro de Comercio Internacional, 1965. Análisis del Mercado de la papaína en los principales países importadores de la Europa Occidental, Ginebra
- 5 Chavéz Crisonino P., 1981. Estudio de Prefactibilidad para una planta de Papaína refinada, El Salvador, Trabajo de Graduación, Facultad de Ingeniería, Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- 6 Chang-Tren Ch, 1980. Comunicación Verbal. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria (CENTA).
- 7 Cuadra Zelaya, T.E. 2000. Normalización de la Enzima papaína inmovilizada por la Técnica de atrapamiento en gel, Trabajo de Graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- 8 García Víctor, Roldan Edwin, 2005, Ensayo de actividad de la enzima papaína inmovilizada y su aplicación en las aguas residuales de la Industria Alimenticia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- 9 Gutiérrez J.R. 1974. "Papain: Isolation, Properties and applications" Trabajo no publicado, basado en libros referentes a papaína de diversos autores, presentado en materia de "Enzyme Applications" en Kansas Statu University.
- 10 Hartmeies, W 1985. Inmovilized biocatalysts: from simple to complex systems, trines biotechnology.
- 11 Hultin, H.D., 1983 Current and Potential uses of Inmovilized Enzymes, Food Technology Magazine, Vol. 37 N° 10.
- 12 Instituto Salvadoreño de Fomento Industrial (INSAFI) 1971, Extracción de Papaína
- 13 Instituto Salvadoreño de Fomento Industrial (INSAFI) 1991, Extracción de Papaína
- 14 Kirk, R.E., 1961. Enciclopedia de Tecnología Química [Tr. Oscar G. Carrera, etc Al.]

- 15 Madrigal L. 1978. Efecto de algunas variables sobre el rendimiento de papaína cruda. Tesis de Grado, Universidad de Costa Rica.
- 16 Marrero M. y otros 1977. Obtención Industrial de papaína purificada a partir del látex del fruto de la "***Carica papaya***" Revista Cubana de Farmacia,
- 17 Martínez , K. y otro 1987. Inmovilization of enzymes; an approach to fundamental studies in biochemistry.
- 18 Ortiz A. 1978. Estudios sobre la actividad proteolítica y secado del látex de la papaya (*Carica papaya*) en Costa Rica, Tesis Grado, Universidad de Costa Rica.
- 19 Perlman, G.E., Lazlo L. 1970. Methods in enzymologist 1° Ed. New York, USA, Academia Press, Vol XIV.
- 20 Proyecto PNUD-ONUDI. 1979. Estudio de factibilidad para una empresa de producción de látex de papaya y de papaína refinada.
- 21 Taylor, R.F. 1991. Protein inmovilization; Fundamentals and applications, Marcel Dekker; New York.

22 Tainter M.L., 1951. et al. Papain, Analysis of the New York Academy of Science.

Vol 54.

23 Zaborsky, O. 1973. Inmovilizado enzymes, 1° Edition, Cleveland, Ohio, USA,

CRC, Press Inc.

24 Wingard, L.B 1972, Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.

25 Zismeg J.1952. El papayo Ediciones Oriente, 1° ed. México

26 [www. Contaminaciondelagua.htm](http://www.Contaminaciondelagua.htm)

27 www.inmovilizacion.com,pdf

28 www.liofilizacion.com

29 www.lapapaya-monografias.com.htm

30 <http://www.monografias.com/trabajos10/09teceenz.html>

31 www.papaya.com

32 www.suerodeleche.com

ANEXOS

ANEXO N° 1

Cuadro N°28: FORMATO DE RECOLECCION DE DATOS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

N° de muestra	Tiempo (días)	Volumen tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

ANEXO N° 2

Cuadro N° 29: PREPARACION DE REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD.

REACTIVO	MATERIALES	PROCEDIMIENTO
Sustrato de Caseína	a) 1 g de Caseína b) Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L. c) Agua Endurada a 30°DH.	1) Disolver la Caseína en 50 mL de Solución de Fosfato Trisódico. 2) Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05M o NaOH 0.2N. 3) Calentar por 15 minutos en agua hirviendo, enfriar a temperatura ambiente. 4) Colocar la solución en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con agua endurada a 30°DH. 5) Ajustar el pH 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05M o NaOH 0.2N.
Agua endurada artificialmente a 30°DH	a) 0.630g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. b) 0.466g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. c) 1 Litro de agua destilada o buffer a pH requerido.	Disolver el Cloruro de Calcio dihidratado y el Cloruro de magnesio hexahidratado en 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato de pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2g/L	a) 4.63g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. b) 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido	Disolver el Fosfato de Sodio dodecahidratado en 1 Litro de agua destilada o buffer al pH requerido.
Agua endurada artificialmente a 15°DH	a) 0.315 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. b) 0.233 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. c) 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido.	Disolver el Cloruro de Calcio y el Cloruro de magnesio en 1 litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2g/L en agua endurada a 15°DH	a) 9.26 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. b) 1 Litro de agua endurada a 15° DH	Disolver el Fosfato de Sodio en 1 Litro de agua endurada a 15°DH y ajustar a pH requerido con ácido cítrico 0.05M.
Solución Acido Tricloroacético	a) 5 g de ácido tricloroacético. b) 100 mL de agua destilada.	Disolver el ácido tricloroacético en agua y diluir a 100.0 mL.

ANEXO N° 3

Cuadro N° 30: PREPARACION DE BUFFER FOSFATO A pH 5.5, 6.0, 7.0,
7.5 y 8.0

REACTIVO	MATERIALES	PROCEDIMIENTO
Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M	a) 23.22 de KH_2PO_4 . b) Agua libre de CO_2 .	Disolver el KH_2PO_4 en agua libre de CO_2 y aforara a 1000.0 mL.
Buffer Fosfato pH 5.5	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M. b) 3.3 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2 .	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200.0 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2 .
Buffer Fosfato pH 6.0	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M. b) 5.6 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2 .	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200.0 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2 .
Buffer Fosfato pH 7.5	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M. b) 40.7 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2 .	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200.0 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2 .
Buffer Fosfato pH 8.0	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M. b) 46.1 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2 .	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M en un balón volumétrico de 200.0 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2 .

ANEXO N° 4

DETERMINACION DE LA CANTIDAD ENZIMA INMOVILIZADA NATURAL EQUIVALENTE A 1 mL DE SOLUCION DE PAPAÍNA.

Como se determinó la cantidad a pesar de enzima inmovilizada equivalente a la solución de papaína.

1. Pesar la mezcla enzima-soporte, ya inmovilizada
2. Determinar el peso de la enzima papaína, presente en un mL de la solución de papaína.
3. Determinar la cantidad a pesar de mezcla enzima – soporte equivalente al peso en 1 mL de solución de papaína.

PROCEDIMIENTO:

1. Peso mezcla enzima – soporte = 44.0g
2. 0.015g papaína \longrightarrow 50.0 mL de agua
X \longleftarrow 1.0 mL de agua
X= 0.0003 g enzima en 1 mL

3. 1.2 g enzima a inmovilizar \longrightarrow 44.0 g peso mezcla-soporte
0.0003 g enzima en 1 mL \longrightarrow X
X= 0.011 g de enzima inmovilizada

NOTA: Se pesa 0.011 g de la mezcla enzima – soporte, en el cual se encuentra un equivalente de 0.0003g de papaína.

ANEXO Nº 5

DETERMINACION DE LA CANTIDAD ENZIMA INMOVILIZADA LIOFILIZADA EQUIVALENTE A 1 mL DE SOLUCION DE PAPAÍNA.

Como se determinó la cantidad a pesar de enzima inmovilizada equivalente a la solución de papaína.

1. Pesar la mezcla enzima-soporte, ya inmovilizada
2. Determinar el peso de la enzima papaína, presente en un mL de la solución de papaína.
3. Determinar la cantidad a pesar de mezcla enzima – soporte equivalente al peso en 1 mL de solución de papaína.

PROCEDIMIENTO:

1. Peso mezcla enzima – soporte = 40.8 g
2. 0.015g papaína \longrightarrow 50.0 mL de agua
X \longleftarrow 1.0 mL de agua
X= 0.0003 g enzima en 1 mL
3. 1.2 g enzima a inmovilizar \longrightarrow 40.8 g peso mezcla-soporte
0.0003 g enzima en 1 mL \longrightarrow X
X= 0.010 g de enzima inmovilizada

NOTA: Se pesa 0.010 g de la mezcla enzima – soporte, en el cual se encuentra un equivalente de 0.0003g de papaína.

ANEXO N° 6

Cálculos para el método modificado de kunitz

Anexo N°6 Cálculos para el Método Modificado de Kunitz

- Actividad enzima solución $\frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4$

E^{15} = Absorbancia después de 15 minutos

$E^{0'}$ = Absorbancia inicial

C= Concentración solución enzimática original en mg/mL

10^4 = Constante del método

- Actividad enzima inmovilizada $\frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4$

I^{15} = Absorbancia después de 15 minutos

$I^{0'}$ = Absorbancia inicial

C= Concentración solución enzimática original en mg/mL

10^4 = Constante del método

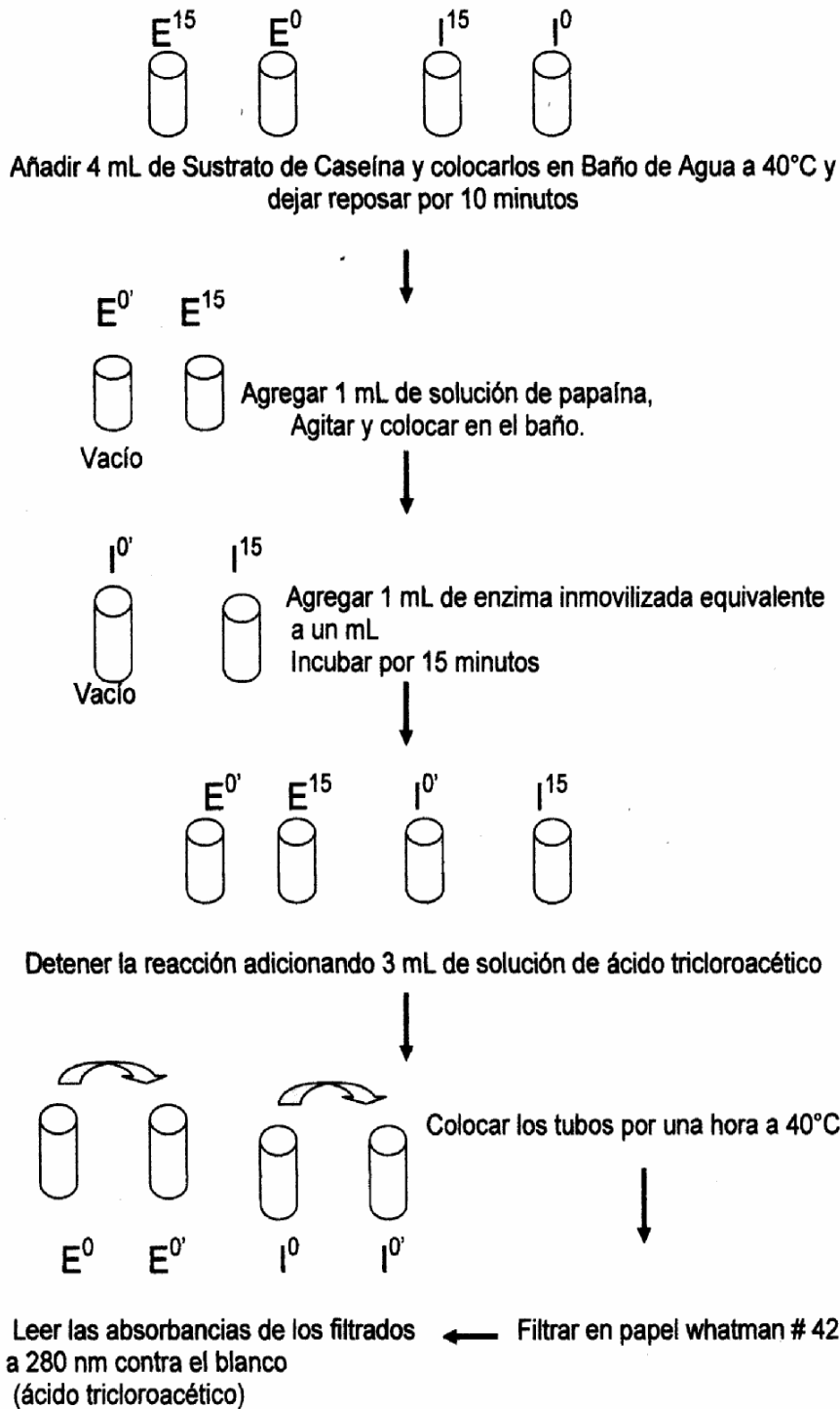


Figura N°12 Diagrama del método modificado de kunitz.

Modelo de cálculos de actividad

Actividad de la enzima natural libre e inmovilizada a diferentes pH a temperatura constante de 20°C.

pH 5.0

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.664 - 0.212}{0.3 \text{ mg/mL}} = 1.506 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.235 - 0.293}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.080 \times 10^4$$

pH 6.0

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.313 - 0.267}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.153 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.242 - 0.124}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.393 \times 10^4$$

pH 7.0

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.162 - 0.158}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.013 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.156 - 0.143}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.043 \times 10^4$$

pH 7.5

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.150 - 0.091}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.200 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.211 - 0.202}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.03 \times 10^4$$

pH 8.0

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.225 - 0.134}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.303 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.357 - 0.164}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.643 \times 10^4$$

pH 9.0

$$\text{Solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.203 - 0.176}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.090 \times 10^4$$

$$\text{Inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.289 - 0.153}{0.3 \text{ mg/mL}} = 0.453 \times 10^4$$

Cálculos para determinar porcentaje de actividad

1. Se toma el mayor valor de la actividad como 100%

Para enzima libre es 1.506×10^4

Para enzima inmovilizada es 0.643×10^4

2. Por regla de tres se determinara el porcentaje a cada pH

Ej:

$$\begin{array}{l} 1.506 \times 10^4 \longrightarrow 100\% \\ 0.153 \times 10^4 \longrightarrow x \end{array}$$

X = 10.16% de enzima libre

$$\begin{array}{l} 0.643 \times 10^4 \longrightarrow 100\% \\ 0.080 \times 10^4 \longrightarrow x \end{array}$$

X = 12.44% de enzima inmovilizada

ANEXO N° 7

Resultados de lecturas de La enzima cruda, liofilizada y comercial.

Anexo N°7: Resultados de lecturas de La enzima cruda, liofilizada y comercial.

Cuadro N°31: Resultados de Enzima Libre, Liofilizada y Comercial libre e inmovilizada a pH 5

Absorbancia	Temperatura				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
E ¹⁵ Solución de papaína natural	0.664	0.218	0.270	0.194	0.218
E ¹⁵ Solución de papaína Liofilizada	0.293	0.421	0.206	0.228	0.201
E ¹⁵ Solución de papaína comercial	0.187	0.140	0.153	0.270	0.267
E ⁰ Solución de papaína natural	0.212	0.192	0.185	0.167	0.204
E ⁰ Solución de papaína Liofilizada	0.245	0.268	0.173	0.192	0.173
E ⁰ Solución de papaína comercial	0.110	0.126	0.136	0.174	0.109
I ¹⁵ Enzima inmovilizada natural	0.235	0.349	0.243	0.745	0.261
I ¹⁵ Enzima inmovilizada liofilizada	0.413	0.253	0.326	0.171	0.252
I ¹⁵ Enzima inmovilizada comercial	0.290	0.267	0.248	0.213	0.152
I ¹⁵ Enzima natural	0.397	0.610	0.392	0.173	0.270
I ¹⁵ Enzima liofilizada	0.387	0.344	0.383	0.258	0.547
I ¹⁵ Enzima comercial	0.231	0.245	0.189	0.197	0.147
I ⁰ Enzima inmovilizada natural	0.209	0.199	0.226	0.197	0.224
I ⁰ Enzima inmovilizada liofilizada	0.217	0.226	0.259	0.162	0.211
I ⁰ Enzima inmovilizada comercial	0.206	0.103	0.181	0.092	0.148
I ⁰ Enzima natural	0.245	0.292	0.240	0.160	0.245
I ⁰ Enzima liofilizada	0.281	0.314	0.298	0.237	0.452
I ⁰ Enzima comercial	0.142	0.145	0.170	0.093	0.140

Cuadro N°32: Resultados de Enzima Libre, Liofilizada y Comercial libre e inmovilizada a pH 6

Absorbancia \ Temperatura	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
E ¹⁵ Solución de papaína natural	0.313	0.236	0.579	0.207	0.130
E ¹⁵ Solución de papaína Liofilizada	1.019	1.063	0.296	0.983	0.112
E ¹⁵ Solución de papaína comercial	0.121	0.166	0.112	0.145	0.148
E ⁰ Solución de papaína natural	0.267	0.127	0.085	0.187	0.115
E ⁰ Solución de papaína Liofilizada	0.138	0.177	0.140	0.106	0.123
E ⁰ Solución de papaína comercial	0.089	0.064	0.081	0.137	0.081
I ¹⁵ Enzima inmovilizada natural	0.236	0.242	0.962	0.279	0.200
I ¹⁵ Enzima inmovilizada liofilizada	0.318	0.162	0.348	0.303	0.219
I ¹⁵ Enzima inmovilizada comercial	0.114	0.212	0.197	0.138	0.210
I ¹⁵ Enzima natural	0.560	0.678	0.961	1.554	1.297
I ¹⁵ Enzima liofilizada	1.226	1.432	1.463	1.757	1.363
I ¹⁵ Enzima comercial	0.135	0.211	0.196	0.154	0.152
I ⁰ Enzima inmovilizada natural	0.136	0.124	0.255	0.200	0.161
I ⁰ Enzima inmovilizada liofilizada	0.244	0.129	0.109	0.299	0.141
I ⁰ Enzima inmovilizada comercial	0.111	0.153	0.150	0.135	0.150
I ⁰ Enzima natural	0.194	0.252	0.045	0.245	0.311
I ⁰ Enzima liofilizada	0.209	0.188	0.143	0.160	0.145
I ⁰ Enzima comercial	0.111	0.163	0.109	0.115	0.133

Cuadro N°33: Resultados de Enzima Libre, Liofilizada y Comercial libre e inmovilizada a pH 7

Absorbancia \ Temperatura	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
E ¹⁵ Solución de papaína natural	0.162	0.375	0.254	0.257	0.236
E ¹⁵ Solución de papaína Liofilizada	0.260	0.963	1.310	0.380	0.313
E ¹⁵ Solución de papaína comercial	0.144	0.052	0.084	0.070	0.168
E ⁰ Solución de papaína natural	0.157	0.344	0.180	0.227	0.228
E ⁰ Solución de papaína Liofilizada	0.151	0.959	0.124	0.126	0.175
E ⁰ Solución de papaína comercial	0.069	0.042	0.061	0.069	0.158
I ¹⁵ Enzima inmovilizada natural	0.156	0.359	0.282	0.346	0.263
I ¹⁵ Enzima inmovilizada liofilizada	0.463	0.363	0.902	0.335	0.338
I ¹⁵ Enzima inmovilizada comercial	0.284	0.234	0.168	0.276	0.252
I ¹⁵ Enzima natural	1.858	1.698	0.950	0.512	0.798
I ¹⁵ Enzima liofilizada	1.713	1.110	1.753	1.323	1.595
I ¹⁵ Enzima comercial	0.159	0.239	0.205	0.119	0.363
I ⁰ Enzima inmovilizada natural	0.143	0.342	0.103	0.278	0.184
I ⁰ Enzima inmovilizada liofilizada	0.258	0.207	0.270	0.301	0.167
I ⁰ Enzima inmovilizada comercial	0.198	0.100	0.155	0.181	0.225
I ⁰ Enzima natural	0.193	0.329	0.258	0.285	0.302
I ⁰ Enzima liofilizada	0.265	1.047	0.157	0.308	0.191
I ⁰ Enzima comercial	0.146	0.232	0.089	0.085	0.264

Cuadro N°34: Resultados de Enzima Libre, Liofilizada y Comercial libre e inmovilizada a pH 8

Absorbancia \ Temperatura	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
E ¹⁵ Solución de papaína natural	0.150	0.153	0.110	0.181	0.170
E ¹⁵ Solución de papaína Liofilizada	0.200	0.869	0.145	0.202	0.239
E ¹⁵ Solución de papaína comercial	0.139	0.033	0.154	0.074	0.156
E ⁰ Solución de papaína natural	0.091	0.098	0.076	0.136	0.139
E ⁰ Solución de papaína Liofilizada	0.109	0.127	0.084	0.169	0.110
E ⁰ Solución de papaína comercial	0.118	0.032	0.125	0.048	0.138
I ¹⁵ Enzima inmovilizada natural	0.211	0.179	0.221	0.248	0.323
I ¹⁵ Enzima inmovilizada liofilizada	0.502	0.407	0.473	0.391	0.500
I ¹⁵ Enzima inmovilizada comercial	0.328	0.196	0.198	0.143	0.294
I ¹⁵ Enzima natural	0.592	1.265	0.772	0.903	1.488
I ¹⁵ Enzima liofilizada	1.300	1.687	0.607	1.720	1.392
I ¹⁵ Enzima comercial	0.148	0.220	0.162	0.162	0.267
I ⁰ Enzima inmovilizada natural	0.202	0.174	0.062	0.163	0.228
I ⁰ Enzima inmovilizada liofilizada	0.148	0.219	0.216	0.188	0.260
I ⁰ Enzima inmovilizada comercial	0.117	0.083	0.160	0.093	0.135
I ⁰ Enzima natural	0.189	0.164	0.167	0.280	0.283
I ⁰ Enzima liofilizada	0.103	0.158	0.057	0.358	0.247
I ⁰ Enzima comercial	0.070	0.101	0.017	0.070	0.179

Cuadro N°35: Resultados de Enzima Libre, Liofilizada y Comercial libre e inmovilizada a pH 9

Absorbancia \ Temperatura	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
E ¹⁵ Solución de papaína natural	0.225	0.240	0.343	0.226	0.155
E ¹⁵ Solución de papaína Liofilizada	0.852	0.857	1.105	0.632	0.525
E ¹⁵ Solución de papaína comercial	0.096	0.091	0.093	0.067	0.126
E ⁰ Solución de papaína natural	0.134	0.191	0.102	0.112	0.142
E ⁰ Solución de papaína Liofilizada	0.151	0.142	0.194	0.163	0.125
E ⁰ Solución de papaína comercial	0.080	0.046	0.036	0.056	0.072
I ¹⁵ Enzima inmovilizada natural	0.357	0.310	0.306	0.284	0.190
I ¹⁵ Enzima inmovilizada liofilizada	0.253	0.352	0.776	0.463	0.372
I ¹⁵ Enzima inmovilizada comercial	0.156	0.266	0.120	0.149	0.183
I ¹⁵ Enzima natural	1.237	0.894	1.590	1.293	1.467
I ¹⁵ Enzima liofilizada	1.449	1.456	0.392	1.683	1.480
I ¹⁵ Enzima comercial	0.215	0.218	0.090	0.131	0.169
I ⁰ Enzima inmovilizada natural	0.164	0.150	0.196	0.203	0.143
I ⁰ Enzima inmovilizada liofilizada	0.168	0.325	0.289	0.167	0.209
I ⁰ Enzima inmovilizada comercial	0.110	0.188	0.102	0.127	0.145
I ⁰ Enzima natural	0.223	0.236	0.409	0.213	0.248
I ⁰ Enzima liofilizada	0.178	0.146	0.250	0.161	0.144
I ⁰ Enzima comercial	0.108	0.186	0.079	0.084	0.054

ANEXO Nº 8

Material, reactivos y equipo de laboratorio

Anexo Nº 8 Material, Reactivos y Equipo de Laboratorio

- Guantes
- Gabacha
- Mallas de asbesto
- Aro metálico
- Pinzas de sostén
- Pinzas de extensión
- Soporte
- Cuchillos de acero Inoxidable
- Espátulas
- Microespátulas
- Gradilla
- Papel de empaque
- Papel Whatman # 42
- Goteros
- Perillas
- Hielera
- Mechero Bunsen
- Papel pH
- Jeringa de hemodiálisis de 3cc
- Termómetro
- Embudos de vidrio
- Erlenmeyer de 100mL, 250mL, 1000 mL

- Pipetas volumétricas de 1mL y 3mL
- Tubos de ensayo con rosca
- Columna de vidrio
- Balón volumétrico de 25.0mL, 50.0mL, 100.0mL y 200.0mL
- Agitadores de vidrio
- Beaker de 30mL, 50mL, 100mL, 250mL y 1000mL
- Probetas de vidrio de 10mL, 25mL y 100mL

REACTIVOS

- Texapón
- Cloruro de benzalconio
- Alcohol isopropílico
- Agar-agar
- Caseína
- Fosfato trisódico
- Hidróxido de sodio
- Acido cítrico
- Cloruro de calcio dihidratado
- Cloruro de magnesio hexahidratado
- Fosfato de sodio dodecahidratado
- Acido tricloroacético
- Fosfato de sodio monobásico
- Agua estéril

- Agua destilada

EQUIPOS

- Baño Maria
- Balanza Granataria y Analítica
- Incubadora
- Autoclave
- Estufa
- Espectrofotómetro Spectronic 20
- Ultravioleta – visible
- Liofilizador Cryodos 50
- Freezer

ANEXO N° 9

Fotografías del diseño metodológico.

ANEXO N° 9. Fotografías del diseño metodológico

Extracción del látex de papaya (*Carica papaya*)



Figura N°13: Sanitización del Área de Trabajo



Figura N°14: Sanitizar las Papaya con agua y jabón y dejar secar.



Figura N°15: Incisiones en la Papaya y recolectarla en tubos estériles

Liofilización de la Enzima Papaína



Figura 16. Aparato Liofilizador Cryodos-50

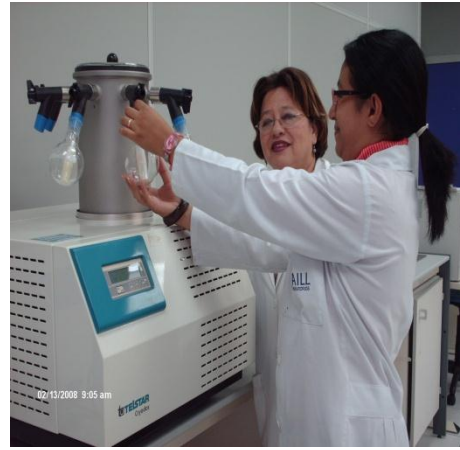


Figura N°17: Conectar los Balones al Liofilizador Testar Cryodos-50

Inmovilización de Enzima Papaína



Figura N°18: Moldeo de la Enzima Papaína

Ensayo de Actividad por el Método Modificado de Kunitz

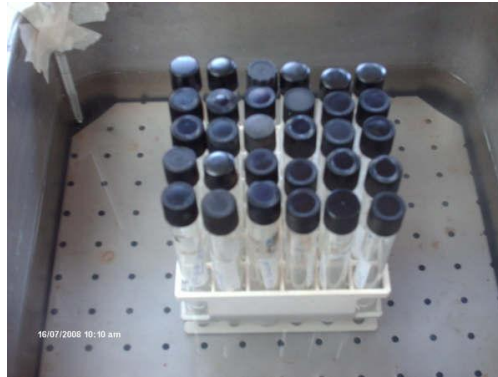


Figura N°19: Los tubos que contienen la Enzima Papaína en Baño Maria para permitir la coagulación completa de la proteína precipitada.



Figura 20: Filtrar en papel filtro Whatman # 42



Figura N°21: Leer las absorbancias de filtrados a 280 nm en el Espectrofotómetro Ultravioleta- Visible

Recolección de la Muestra



Figura N°22: Agua Residual (Suero) recolectada en Aguilares



Figura N°23: Frascos que se utilizaron para la recolección de la muestra

Análisis de la Muestra

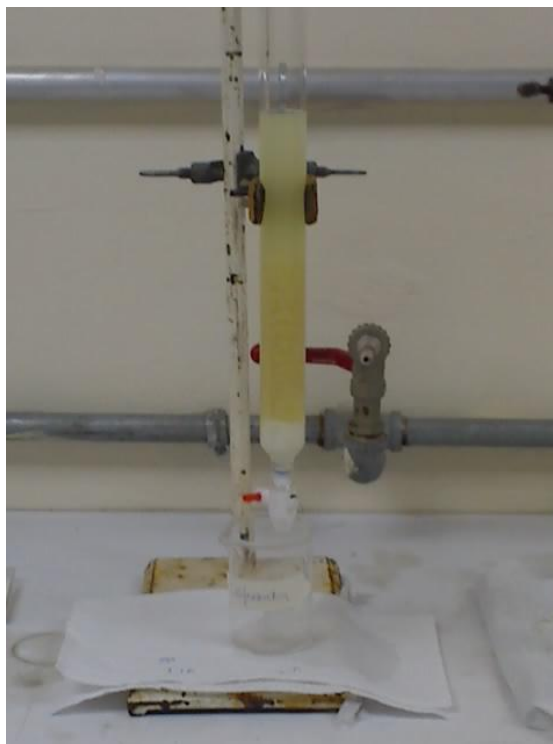


Figura N° 24: Reactor utilizado para el tratamiento de las aguas residuales utilizando el método semicontinuo.

ANEXO N° 10

Esquemas del diseño metodológico.

ANEXO Nº 10 Esquemas del diseño metodológico

EXTRACCION DEL LATEX DE PAPAYO

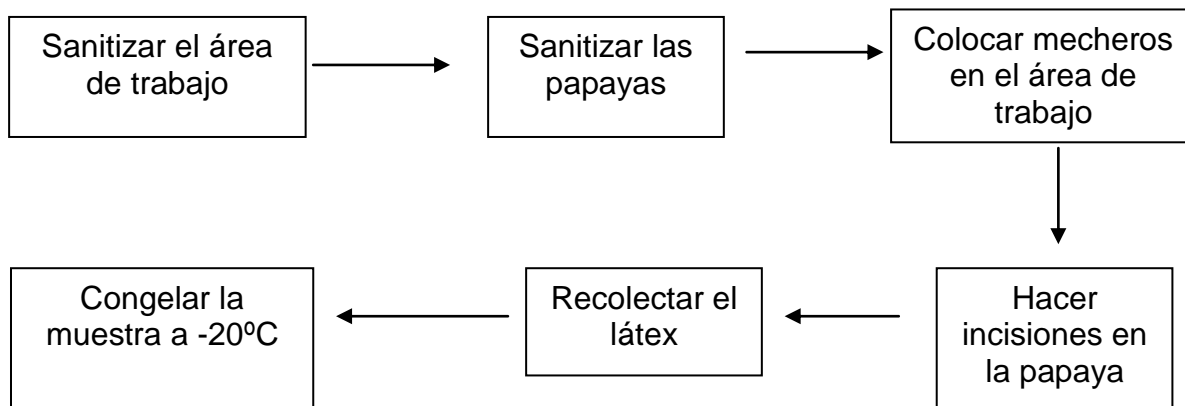


Figura Nº 25: Esquema de Extracción del látex de papayo

LIOFILIZACION DE LA ENZIMA PAPAÍNA

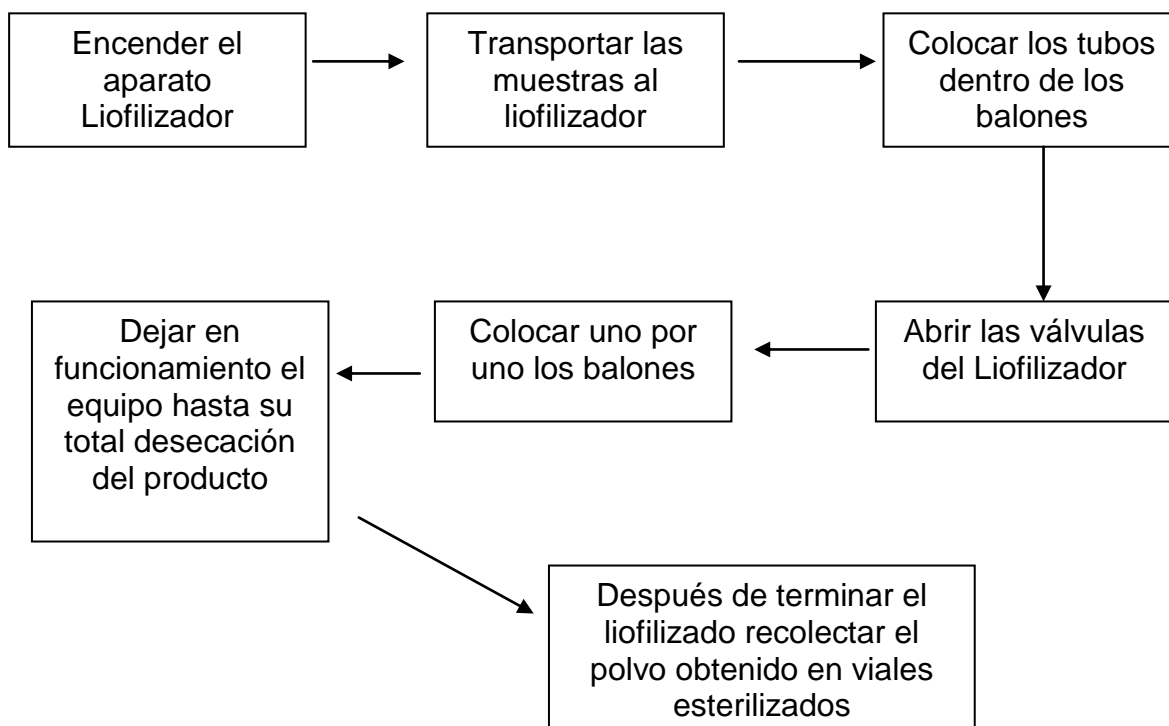


Figura Nº 26: Esquema de Liofilización de la Enzima Papaína

INMOVILIZACION DE LA ENZIMA PAPAINA

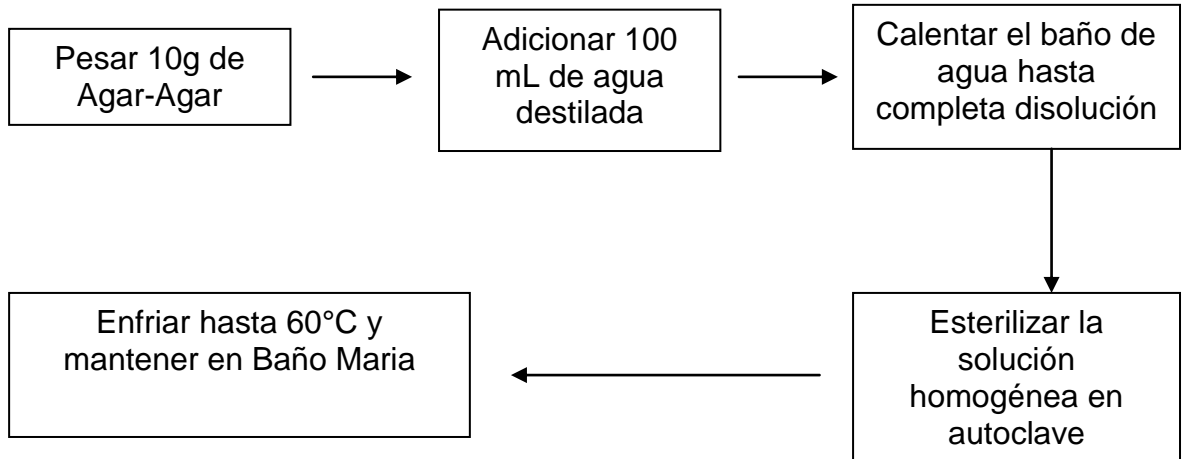


Figura N°27: Esquema de Inmovilización de la Enzima Papaína

MEZCLA ENZIMA-SOPORTE

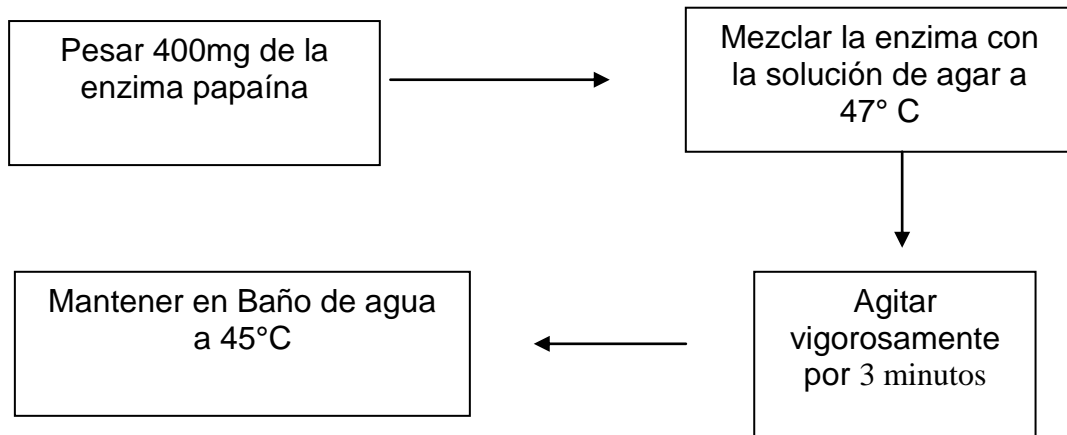


Figura N°28: Esquema de Mezcla Enzima-Soporte

MOLDEO DE LA ENZIMA

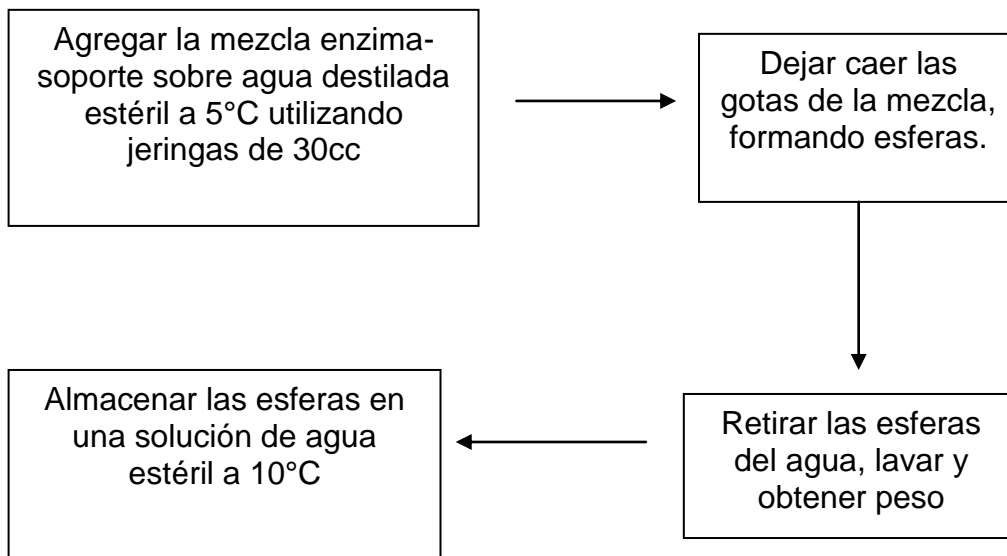


Figura N°29: Esquema de Moldeo de la Enzima

RECOLECCION DE LA MUESTRA (SUERO)

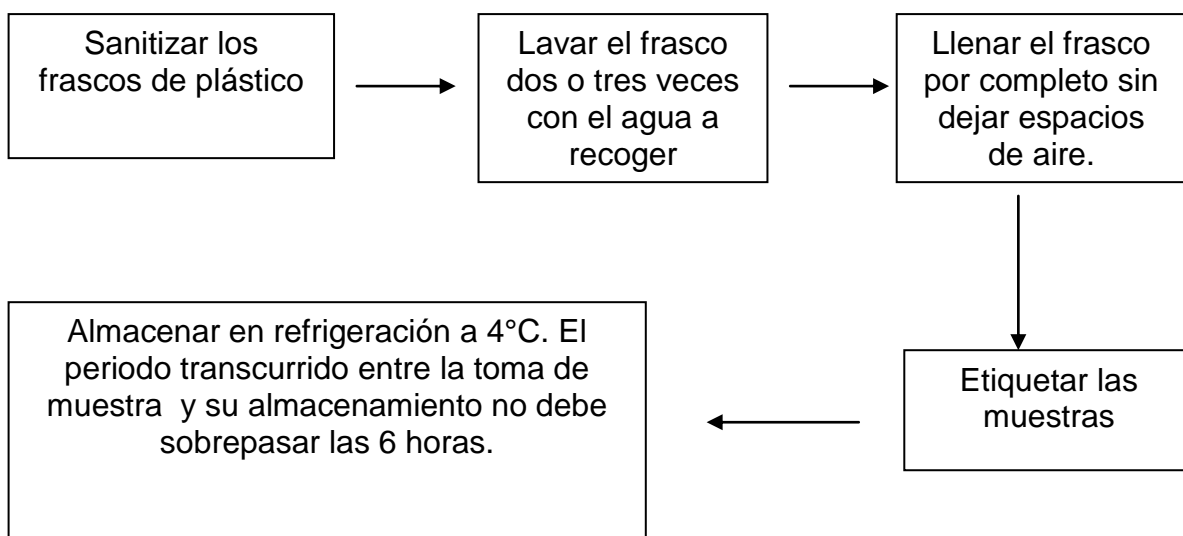


Figura N°30: Esquema de recolección de la Muestra (suero)