

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Extracción, Caracterización y Comparación de Látex Obtenido, en
Secado por Aspersión, de tres Variedades de Papaya (Carica papaya
L.)”.

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Pamela Alejandra Arana Guerra

María Fernanda Quijano Avilés

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2012

AGRADECIMIENTO

Mi gratitud principalmente a mi directora de tesis, Ing. Priscila Castillo por la confianza depositada en nosotras para la realización de este trabajo, y quien con sus conocimientos, experiencia y motivación ha logrado que culminemos nuestra etapa de estudios con éxito.

De igual manera agradezco a todas las personas que nos ayudaron a lo largo del desarrollo de esta tesis como son: PhD. Efrén Santos, PhD. Juan Manuel Cevallos, PhD Freddy Orellana, Ing. Remigio Crespo e Ing. Iván Chóez, sin su valiosa ayuda no hubiera sido posible la finalización de este trabajo.

Pamela

AGRADECIMIENTO

A mi directora de tesis, Ing. Priscila Castillo por la confianza que nos tuvo al considerarnos dignas de trabajar con ella en este proyecto. Al PhD. Efrén Santos y al PhD. Juan Manuel Cevallos quienes siempre aportaron buenos consejos y recomendaciones para enriquecer este trabajo. Agradezco, además por diversos motivos a las siguientes personas: Ing. Remigio Crespo, Simon Rowe, PhD. Freddy Orellana, Ing. Iván Chóez y Julio Cepeda.

Mafer

DEDICATORIA

A Dios, por toda la fuerza y paciencia que me dio para culminar mi carrera.

A mis padres, Antonio y Yolanda, como un testimonio de amor y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y por su diario sacrificio para lograr mi formación profesional.

A mis incondicionales amigos quienes me acompañaron en esta trayectoria de aprendizaje, por su apoyo, alegría y amistad.

Pamela

DEDICATORIA

A mis padres por darme la oportunidad de cumplir esta meta. A mi hermano por estar siempre presto a ayudarme incondicionalmente, a mi novio por su constante apoyo y aliento. A mi familia y mis amigos, los que cantaron Heroica Juventud y los que conformamos el equipo campeón Cool-Antros.

Mafer

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gustavo Guerrero M.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Priscila Castillo S.
DIRECTORA DE TESIS

PhD. Efrén Santos O.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Pamela Alejandra Arana Guerra

María Fernanda Quijano Avilés

RESUMEN

El objetivo de este proyecto de investigación fue comparar la papaína cruda obtenida de diferentes variedades de papaya cultivadas en el Ecuador con el fin de proponer la mejor materia prima para su extracción a nivel comercial. Para lo cual, se caracterizó y determinó el rendimiento del látex obtenido de las variedades de Carica papaya L. Maradol, Criolla y Golden.

El látex fue extraído a partir de frutos inmaduros de 2.5 a 3 meses de edad efectuando de 3 a 4 cortes longitudinales sobre la superficie del mismo de aproximadamente 2.0 a 2.5 milímetros de profundidad, realizados en intervalos de cada cuatro días. Para la conservación del látex se añadieron como preservantes citrato de sodio, bisulfito de sodio y EDTA. El látex fue centrifugado a 8000 rpm durante 60 minutos a 4°C y microencapsulado por medio de secado por aspersion a una temperatura de 130°C, usando goma arábica como agente encapsulante con el fin de obtener papaína cruda.

Se encontró diferencia estadística significativa en el rendimiento del látex en cuanto a variedad de papaya, siendo el látex de la variedad Criolla el de mayor

rendimiento con $2,036 \pm 0,69$ g látex/Kg fruto, mientras que la variedad Golden presentó valores muy bajos, por lo que se sugiere que no es factible realizar la extracción de látex en esta variedad de papaya.

La medición de la actividad proteolítica se realizó por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 280nm en unidades de TU/mg de proteína, para lo cual también se cuantificó el contenido proteico siguiendo el método de absorción ultravioleta a 280 nm. La actividad enzimática para las variedades Maradol y Criolla fue de $531,30 \pm 27,3$ TU/mg de proteína y $592,53 \pm 93,61$ TU/mg de proteína respectivamente, valores que no presentaron diferencia estadística significativa, con un nivel de confianza del 95%.

Además, se procedió a hacer un diseño experimental 2^2 por duplicado, con el fin de sustituir el bisulfito de sodio, el cual ejerce acción reductora y antimicrobiana, mediante la adición de cisteína y benzoato de sodio, obteniendo como resultado que sí es posible realizar esta sustitución usando concentraciones de 1% de cisteína y 0.5% de benzoato de sodio, superando en un 6% la actividad obtenida mediante el uso de bisulfito de sodio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES.....	5
1.1 Materia prima.....	5
1.1.1 Carica papaya Linn	5
1.1.2 Composición química y valor nutricional	9
1.1.3 Distribución y variedades de papaya que se cultivan en el país. ...	12
1.2 Látex.....	20
1.2.1 Definición	20
1.2.2 Propiedades y función.....	22
1.2.3 Proteasas presentes en el látex	23
1.3 Factores que afectan la actividad proteolítica.....	28
1.4 Tratamientos de pre secado	31

1.5	Secado por aspersión.....	33
1.5.1	Microencapsulación mediante secado por aspersión.....	34
1.6	Cuantificación de proteínas	37
1.6.1	Métodos para la cuantificación de proteínas	37
1.7	Medición de la actividad enzimática	39
1.7.1	Métodos de determinación de la actividad proteolítica.....	39
1.7.2	Unidades enzimáticas	41
1.7.3	Ensayos espectrofotométricos	45
1.8	Aplicación en la industria	46

CAPÍTULO 2

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1	Materiales, reactivos y equipos	49
2.2	Proceso de extracción experimental del látex.....	51
2.2.1	Caracterización de la materia prima para la extracción del látex ..	51
2.2.2	Recolección y tratamiento del látex.....	54
2.3	Caracterización del látex	59
2.3.1	Características físico-químicas del látex de papaya.....	59
2.4	Caracterización de papaína cruda.....	62
2.4.1	Procedimiento de secado del látex.....	62
2.4.2	Determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína	
	69	
2.4.3	Determinación de la actividad enzimática.	71
2.5	Diseño de experimentos	77
2.5.1	Variables y niveles para pruebas experimentales	77
2.5.2	Determinación de corridas experimentales	80

CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	82
3.1 Validación estadística de los resultados obtenidos	82
3.1.1 Validación de pruebas para látex: Rendimientos y caracterización. 82	
3.1.2 Validación de pruebas para papaína cruda: Actividad enzimática	111
3.2 Validación estadística para el diseño experimental 2^k	125
3.2.1 Tabla de datos y resultados	125
3.2.2 Análisis estadístico: ANOVA	126
3.2.3 Interpretación de resultados	129

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	134
--	-----

APÉNDICES

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
cm	Centímetro
g	Gramo
Ha	Hectáreas
Kg	Kilogramos
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
s	Segundos
µg	Microgramo
P	Probabilidad.
Tg	Temperatura del aire de calentamiento
Tl	Temperatura de la muestra
Tm	Tonelada métrica
UV	Ultravioleta
U	Unidad estándar de actividad enzimática
TU	Unidades de tirosina
MCU	Unidades de coagulación de la leche
FCC	Food Chemical Codex

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
CM	Cuadrados medios
F	F calculado
GL	Grados de Libertad
HCl	Ácido clorhídrico
Ho	Hipótesis nula
Hi	Hipótesis alterna
N	Número de Muestras
P	Valor P
SC	Suma de Cuadrados
%	Porcentaje
ϵ	Coefficiente de extinción molar
μ	Media aritmética

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. 1 Frutos Golden.....	17
FIGURA 1. 2 Frutos Maradol	18
FIGURA 1. 3 Frutos Tainún 1	19
FIGURA 1. 4 Frutos Criolla	20
FIGURA 1. 5 Látex exudado de papaya	21
FIGURA 1. 6 Etapas del proceso de secado por aspersion.....	34
FIGURA 2. 1 Extracción y recolección del látex.....	56
FIGURA 2. 2 Sellado al vacío del látex.....	57
FIGURA 2. 3 Metodología para el tratamiento del látex.....	58
FIGURA 2. 4 Carta de colores Munsell.....	61
FIGURA 2. 5 Centrifugación del látex	62
FIGURA 2. 6 Látex centrifugado	63
FIGURA 2. 7 Proceso de secado del látex	66
FIGURA 2. 8 Papaína cruda	68
FIGURA 2. 9 Preparación sustrato de caseína.....	73

FIGURA 2. 10 Preparación buffer cisteína.....	73
FIGURA 2. 11 Medición de actividad enzimática	75
FIGURA 2. 12 Diseño Factorial.....	78
FIGURA 3. 1 Gráfica de caja de Rendimiento de látex fresco.....	89
FIGURA 3. 2 Rendimiento de látex fresco por recolección	90
FIGURA 3. 3 Látex centrifugado	91
FIGURA 3. 4 Proceso de obtención del látex de la variedad Maradol	96
FIGURA 3. 5 Proceso de obtención del látex de la variedad Criolla	97
FIGURA 3. 6 Gráfica de caja de Densidad (g/ml)	100
FIGURA 3. 7 Gráfica de caja de ° Brix	102
FIGURA 3. 8 Gráfica de caja de % de Materia Seca	105
FIGURA 3. 9 Gráfica de caja de pH.....	107
FIGURA 3. 10 Gráfica de caja de Acidez titulable	109
FIGURA 3. 11 Gráfica de caja de concentración de proteínas	114
FIGURA 3. 12 Curva de calibración.....	117
FIGURA 3. 13 Gráfica de caja. Actividad enzimática.....	123
FIGURA 3. 14 Gráfica de residuos para Actividad enzimática.....	129
FIGURA 3. 15 Diagrama de Pareto para Actividad enzimática.....	130
FIGURA 3. 16 Efectos principales para Actividad enzimática.....	131
FIGURA 3. 17 Interacción de efectos para Actividad enzimática.....	132

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación taxonómica.....	7
Tabla 2 Contenido de nutrientes en 100 g de pulpa fresca de papaya	11
Tabla 3 Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad	38
Tabla 4 Métodos para la determinación de actividad proteolítica	41
Tabla 5 Equivalencias de las principales unidades comerciales de medición de actividad enzimática.....	44
Tabla 6 Caracterización de la papaya como materia prima	53
Tabla 7 Parámetros del proceso de secado	64
Tabla 8 Concentraciones usadas para la elaboración de la curva de tirosina	72
Tabla 9 Factores y niveles del diseño de experimentos	79
Tabla 10 Corridas experimentales	81
Tabla 11 Rendimiento de látex fresco de la variedad Golden.....	83
Tabla 12 Rendimiento de látex fresco de la variedad Maradol	85
Tabla 13 Rendimiento de látex fresco de la variedad Criolla	86
Tabla 14 Prueba T e IC de dos muestras: Rendimiento. Variedad.....	88
Tabla 15 Prueba T e IC de dos muestras: Sobrenadante. Variedad.....	92
Tabla 16 Rendimientos de látex seco	93
Tabla 17 Prueba T e IC de dos muestras: Secado. Variedad.....	95
Tabla 18 Prueba T e IC de dos muestras: Densidad (g/ml). Variedad.....	99
Tabla 19 Prueba T e IC de dos muestras: °Brix. Variedad.....	101
Tabla 20 Prueba T e IC de dos muestras: % de MATERIA SECA.VARIEDAD	104

Tabla 21 Prueba de Mann-Whitney e IC: MARADOL. CRIOLLA	106
Tabla 22 Prueba T e IC de dos muestras: Acidez titulable. Variedad	108
Tabla 23 Características del látex de papaya	110
Tabla 24 Contenido proteico de la papaína cruda	111
Tabla 25 Prueba T e IC de dos muestras: Concentración de proteínas. Variedad	113
Tabla 26 Prueba T para concentración de proteínas (mg/ml)	115
Tabla 27 Absorbancia para curva de tirosina	116
Tabla 28 Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración (ug/ml)	118
Tabla 29 Actividad proteolítica del látex variedad Criolla	119
Tabla 30 Actividad proteolítica del látex variedad Maradol	120
Tabla 31 Prueba T e IC de dos muestras: Actividad enzimática. Variedad	121
Tabla 32 Prueba T para actividad enzimática (TU/mg de proteína)	124
Tabla 33 Características de la papaína cruda	125
Tabla 34 Actividad enzimática del diseño factorial	126
Tabla 35 Modelo Lineal General	127
Tabla 36 Análisis de Varianza para Actividad enzimática	127

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de las enzimas en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia, pues las ventajas de las enzimas en la producción industrial son evidentes frente a los catalizadores no biológicos, principalmente porque tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas energéticamente posibles sin que se consuman en la reacción, no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la misma, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces.

Una enzima de gran interés lo constituye la papaína, la cual es obtenida del látex de la papaya (*Carica papaya* L.). Esta enzima tiene un sinnúmero de aplicaciones en la industria alimenticia -como son su uso en la tenderización y ablandamiento de carne y en la clarificación de cerveza-, así como tiene un gran uso en otros tipos de industrias como la farmacéutica por sus propiedades digestivas y en la industria cosmética por su poder desmachador y cicatrizante. La importancia económica de esta enzima es considerable puesto que representa las dos terceras partes del mercado de enzimas.

La obtención de esta enzima en el país resulta una idea muy atractiva para darle valor agregado a la fruta, pues el Ecuador es un país caracterizado por su clima cálido y húmedo que permite el cultivo de diversas frutas tropicales de gran calidad y, de acuerdo a la FAO, el Ecuador ocupa la posición diecinueve dentro de los países productores de papaya con una producción de 42.796 toneladas lo que representa el 1% de la producción mundial de papaya.

Es así, que en el presente trabajo de investigación se realizó una caracterización del látex extraído de tres variedades de papaya que se cultivan comercialmente en el Ecuador para evaluar cual variedad es la más apropiada para la obtención de esta enzima.

Para la elaboración de este proyecto se seleccionaron las variedades de papaya Maradol, Criolla y Golden; se caracterizó la fruta y el látex obtenido de cada una, se calculó el rendimiento en gramos de látex de cada variedad de papaya por kilogramo de fruto, se analizó el contenido de proteínas y actividad enzimática y se las comparó para determinar cuál variedad tiene las mejores características para la extracción del látex.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué efecto tienen las variedades comerciales de papaya Maradol, Solo Golden y Criolla en el rendimiento y calidad de papaína cruda extraída de frutos inmaduros de *Carica papaya* L. cultivados en el Ecuador?

HIPÓTESIS DEL PROYECTO

Las diferentes variedades de *Carica papaya* tienen efecto sobre el rendimiento y la calidad de papaína cruda extraída, ya que existen diferencias significativas en la composición del fruto dependiendo de la variedad del mismo, y es de suponer que el látex será más abundante en unas variedades que en otras y que unas contendrán papaína con mayor actividad proteolítica que otras.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la papaína cruda proveniente de tres variedades de *Carica papaya* a través de la medición de la actividad enzimática y el rendimiento gravimétrico con el fin de proponer la mejor materia prima para la extracción de látex a nivel comercial.

Objetivos Específicos

- Extraer látex de frutos de *Carica papaya* de 2.5 a 3 meses de edad de las variedades Maradol, Solo Golden y Criolla y secarlo mediante el método de secado por aspersion para obtener papaína cruda.
- Caracterizar el látex y la papaína cruda mediante análisis físico-químico.
- Determinar el rendimiento de látex y papaína cruda mediante análisis gravimétrico.
- Medir la actividad enzimática por medio de espectrofotometría expresado en TU/mg de proteína.
- Diseñar un experimento factorial 2^k con el fin de analizar el efecto de los tratamientos de pre secado sobre la actividad enzimática.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Materia prima

1.1.1 *Carica papaya* Linn

La papaya pertenece a la familia botánica *Caricaceae* y su nombre científico es *Carica Papaya* Linn. La familia *Caricaceae* comprende cuatro géneros: *Carica*, *Jacarilla*, *Cylicomorpha* y *Jacaratia* y 71 especies siendo el género *Carica* el de mayor número con 57 especies; *Jacarilla* con 10 especies, *Cylicomorpha* con 2 especies y *Jarilla* con 2 especies [1]. En la Tabla 1, se detalla la clasificación taxonómica de la papaya.

La planta de papaya es herbácea y de crecimiento rápido. Se clasifica como una especie perenne, ya que puede llegar a vivir unos 20 años. Se considera una hierba arborescente porque es muy poco lignificada. Por estas razones, en el caso de la papaya el término árbol no es botánicamente apropiado [2].

Esta planta se puede cultivar en cualquier época del año, la floración ocurre 5 meses después de la siembra, los primeros frutos están listos para ser cosechados cuando las plantas tienen una edad de 10 meses aproximadamente y la cosecha se hace de forma manual [2].

Tabla 1

Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophytina
Clase	Magnoliatae
Subclase	Dilleniidae
Orden	Violales
Suborden	Carinicineae
Familia	<i>Caricaceae</i>
Género	<i>Carica</i>
Especie	<i>Carica papaya</i> Linn

Fuente: Mederos, 1991

El fruto es una baya de tamaño, peso y forma variable, dependiendo de la variedad o selección. Mide de 10 a 60 cm de largo y llega a pesar varios kilogramos. El color de la pulpa también depende de la selección, normalmente amarilla o rojo-anaranjada, de textura suave y de un espesor de 3 a 5 cm. La superficie del fruto suele tener 5 surcos poco profundos [2].La

cáscara se torna de verde oscuro a verde claro y luego amarillo-dorado. Las semillas están en la cavidad interna del fruto. La planta puede producir unos 100 frutos por año. Las semillas son esféricas, pequeñas y negras. Están envueltas en una capa mucilaginosa llamada sarcotesta o cubierta. Un fruto bien polinizado llega a tener de 300 a 700 semillas [2].

La papaya pertenece a un grupo de especies de plantas conocidas como plantas laticíferas. Estas plantas contienen una serie de células ramificadas e interconectadas que forman una matriz de tubos complejos [3], dispersos a lo largo de la mayoría de los tejidos de las plantas, que secretan una sustancia conocida como "látex". En conjunto, estos compuestos se cree que están implicados en la defensa de la planta contra una amplia variedad de plagas y herbívoros [4].

El látex es extraído de frutas completamente desarrolladas pero no maduras, cuya piel contiene numerosos laticíferos. La fruta de papaya madura no contiene látex [5], posiblemente porque

las células productoras de látex dejan de funcionar o se averían con la edad.

1.1.2 Composición química y valor nutricional

Dentro de su composición química debemos destacar su riqueza en vitaminas C y en provitamina A, en forma de carotenos dentro de las cuales tiene principalmente: betacarotenos, gamma carotenos, épsilon carotenos y criptoxantina, un compuesto que además de transformarse en vitamina A en nuestro organismo, presenta propiedad antioxidante, atribuyéndosele acción preventiva frente al cáncer y la enfermedad cardiovascular. También destaca la presencia de vitaminas del grupo B como son vitamina B1, B2 y B3. En cuanto a los minerales, la papaya es rica en potasio y contiene cantidades apreciables de calcio, magnesio, fósforo y hierro [6].

También es una buena fuente de fibra (principalmente insoluble), que mejora el tránsito intestinal, evitando el estreñimiento y protege frente al cáncer de colon y la

enfermedad cardiovascular [6]. La papaya contiene una alta proporción de agua, siendo por el contrario su contenido en nutrientes energéticos (hidratos de carbono, proteínas y grasa) muy bajo.

En papayas de pulpa roja, el pigmento o colorante natural más importante es el licopeno. En papayas de pulpa más amarillenta, los pigmentos más abundantes son el grupo de las criptoxantinas. La intensidad del color depende de la concentración del pigmento, la cual varía de una localidad a otra. En pulpas rojizas, los carotenos constituyen un 10% de los pigmentos, mientras que en pulpas anaranjadas alcanzan un 30%. La pulpa contiene muy pocos ácidos orgánicos (0.099%) y éstos son una mezcla de 50% de ácido cítrico y 50% de ácido málico [2].

En la Tabla 2 se presentan los contenidos de humedad, proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas de la papaya.

Tabla 2
Contenido de nutrientes en 100 g de pulpa fresca de papaya

COMPONENTES	UNID. MED.	VERDE	MADURO
Calorías			
Valor energético	Cal	28.0	32.0
Componentes mayores			
Humedad	%	91.6	90.7
Proteína	gr	0.8	0.5
Grasa	gr	0.1	0.1
Carbohidratos totales	gr	6.9	8.3
Fibra	gr	0.8	0.6
Minerales			
Calcio	mg	41.0	20.0
Fósforo	mg	22.0	13.0
Hierro	mg	0.3	0.4
Vitaminas			
Caroteno (A)	mg	trazas	110.0
Tiamina (B1)	mg	0.04	0.03
Riboflavina (B2)	mg	0.04	0.04
Ácido Ascórbico (C)	mg	36.0	46.0
Niacina (B5)	mg	0.2	0.3
Porción no comestible			
Cáscara	%	18.0	25.0
Semillas	%	6.0	19.0

Fuente: USDA, 2000.

Los compuestos volátiles determinan el olor y el sabor de las frutas. Se han detectado unos 134 compuestos volátiles en la papaya, la mayoría identificados desde 1985. Los compuestos volátiles más importantes de la pulpa de la papaya son el linool, el bencil isotiocianato y el ácido butanóico en la pulpa,

encontrándose otros 20 compuestos de menor importancia [2]. El bencil isotiocianato le da a la papaya su olor fuerte característico. El linool es responsable del sabor y el aroma de la pulpa madura. Casi todos estos compuestos se encuentran conjugados en el fruto, liberándose cuando las células se rompen durante el corte o consumo de las frutas [2].

1.1.3 Distribución y variedades de papaya que se cultivan en el país

Las principales zonas de cultivo de papaya en el Ecuador se encuentran en las siguientes zonas:

- Manabí (Portoviejo y Chone)
- Guayas (Yaguachi, Naranjito y Milagro)
- Santa Elena (San Rafael, Chanduy, Río Verde)
- Santo Domingo (Vía Quevedo)
- Los Ríos (Vía a Quevedo)
- El Oro (Huaquillas)
- Esmeraldas (Quinindé y San Lorenzo)

El cultivo de papaya en Ecuador se está desarrollando aceleradamente, especialmente en las zonas de Santo Domingo, vía Quevedo, Guayas, Santa Elena, entre las zonas más relevantes, siendo una de las razones de la expansión de este cultivo su alto consumo como fruta y las oportunidades de exportación que se le están abriendo [8]. Los principales lugares donde siembran papaya en la provincia de Santa Elena son la comuna San Rafael (Hacienda Las Marías, Hacienda Anacardo) Saya, El Azúcar, Villingota, Chanduy, Río Verde [8]. De acuerdo a las estadísticas de producción del 2005, la provincia de Manabí, dispone del mayor hectareaje a nivel nacional, con 958 has sembradas, seguido por Pichincha con 610 has y Los Ríos con 563 has. En relación a nivel de producción, Manabí mantiene el primer lugar con 12.459 Tm, Pichincha 9.128 Tm. y Los Ríos 6.608 Tm. Por su parte, en relación al nivel de rendimiento, Pichincha con 14.96 Tm/Ha es la zona más productiva del Ecuador, seguido por Carchi con 14.33 Tm/Ha y Cañar con 14.17 Tm/Ha [8].

Las variedades de papaya son muy pocas debido a que una variedad definida, producida por selección y polinización controlada, puede perderse en pocas generaciones, produciéndose una serie de variaciones, sino se tiene el cuidado de mantener lotes de producción de semilla pura [9].

En el país se producen tres tipos de papaya: las híbridas, la hawaiana y la conocida como Maradol. Todas tienen propiedades diferentes, pero los usos son comunes [8].

Grupo Solo o Hawaiano: Este grupo de selecciones fue desarrollado en Hawaii a partir de una fruta pequeña comprada por G.P. Wilder en un mercado de Barbados en 1910. La palabra castellana Solo fue adoptada para bautizar esta serie de selecciones, indicando que es sólo para una persona o para comer una sola vez. Los frutos provenientes de plantas hermafroditas tienen forma similar a la pera mientras que los generados por flores femeninas son redondeados [2]. Una de las desventajas de las variedades Solo es que su

comportamiento es fuertemente dependiente de las condiciones de suelo y clima. A nivel mundial, el grupo Solo constituye el conjunto más importante de variedades de papaya de exportación [2].

➤ **Solo Sunrise**

La fruta de Sunrise tiene superficie suave, mide unos 10 a 15 cm de largo y pesa entre 400 y 600 g. La cáscara es relativamente gruesa y al madurar es amarillo-rojiza. La pulpa es de color rojo-anaranjado o rosado oscuro, de unos 2 cm de grueso, firme de sabor excelente y muy dulce. Se adapta mejor a zonas con baja humedad relativa y lluvias escasas, pero requiere riego para alcanzar una alta productividad [2].

➤ **Solo Sunset**

Los frutos tienen un peso medio de 400 g. La pulpa es de color rojo-anaranjada de piel lisa, firme, resistente al transporte y de larga vida comercial. Produce de media

40 tm/ha con el inicio de la recolección a los 8 meses realizada la plantación [10].

➤ **Solo Golden**

Es un mutante de la papaya “Sunrise Solo”, posee coloración de cáscara más clara y se consume cuando la cáscara tiene una coloración amarilla completa. Su pulpa es de color salmón lo que le da un aspecto muy atractivo frente a otras variedades [11].

En la Figura 1.1 se pueden observar frutos verdes de esta variedad de papaya.



FIGURA 1. 1Frutos Golden

Fuente: Rilesa

Maradol

La variedad de papaya Maradol, fue obtenida en Cuba durante el período 1938 – 1956. El nombre surge al unir parte de los nombres de sus creadores, Adolfo Rodríguez Rivera y su esposa María Luisa Nodals Ochoa [12]. El fruto (Figura1.2) es de maduración lenta, pulpa suave y gran consistencia, piel lisa, gruesa y resistente, presentando larga vida de anaquel [13].

Es una variedad con dos selecciones de frutos con pulpa amarilla y roja, cilíndricos (alargados) y redondos, el largo oscila entre los 22 cm y 27 cm y su diámetro está entre los 9 cm y 13 cm. La cavidad (diámetro) mide entre los 3 cm y 4.5 cm [14].



FIGURA 1. 2Frutos Maradol

Fuente: Rilesa

Papayas híbridas

➤ **Thainung 1, Tainung 1, Tainún 1 o Formosa**

Se obtuvo en la isla de Taiwán también conocida como Formosa de donde lleva su nombre, del cruce de la variedad Solo y una selección de Costa Rica. Los frutos son alargados (hermafroditas) o redondeados (femeninas), de fruto mediano a grande, con peso de

aproximadamente un kg (Figura 1.3). La pulpa es de color anaranjada-rojizo. Tiene muy buen sabor. Es apropiado para consumo local y exportación a ciertos mercados [2].

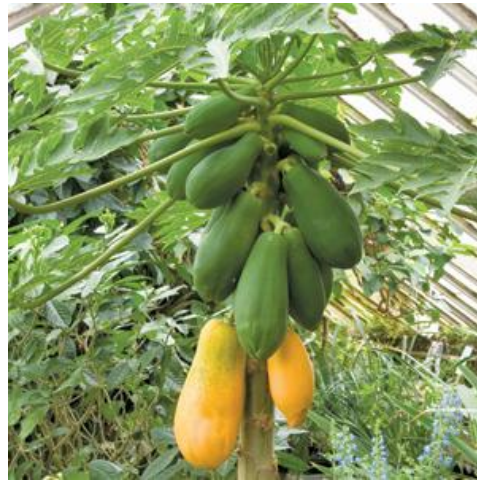


FIGURA 1. 3Frutos Tainún 1

Fuente: Rilesa

➤ **Criolla**

La papaya criolla (Figura 1.4) tiene una amplia tradición de cultivo en los pequeños productores. Este nombre es dado a tipos de papaya genéticamente mezclados, descendientes de híbridos comerciales o del cruce no controlado de selecciones comerciales [2].



FIGURA 1. 4 Frutos Criolla

Fuente: Rileasa

1.2Látex

1.2.1 Definición

El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene en suspensión o en solución, una mezcla compleja de componentes [15]. Los botánicos designan el látex como el citoplasma de los laticíferos (las células vivas especializadas que lo contienen) y por lo tanto, éste presenta una variedad de organelas celulares, como núcleos,

mitocondrias, ribosomas, plastidios, vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático [4] y moléculas orgánicas como enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres [15]. Los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, por lo cual, una incisión sobre éstos, resulta en una rápida emisión del látex hacia el exterior [16].

La Figura 1.5 presenta una fotografía de una papaya a la que se le han realizado varias incisiones para obtener su látex.



FIGURA 1. 5Látex exudado de papaya

Fuente: Rilesa

1.2.2 Propiedades y función

Los principios activos del látex, responsable de su valor en muchas aplicaciones industriales, son las enzimas proteolíticas papaína y quimopapaína. Se ha demostrado que la conversión de la forma inactiva a la activa, ocurre cuando el látex es expelido y alcanza un máximo de actividad proteolítica en menos de dos minutos, después del corte o pinchazo en la superficie del fruto. Paralelamente a este proceso, se hacen visibles los síntomas de coagulación del látex, lo que evidencia que este elemento es un factor de primera línea de defensa en plantas, pues los coágulos de látex sellan las heridas y evitan el ingreso de patógenos [17]. El látex desecado constituye lo que se denomina papaína cruda constituida por una mezcla de enzimas proteolíticos, papaína propiamente dicha, quimopapaínas y en menor proporción papayaproteinasa W y otros [18].

1.2.3 Proteasas presentes en el látex

Desde hace muchos años se sabe de la presencia de enzimas proteolíticas en el látex. La función de estas proteasas, en cambio, aún no ha sido elucidada. Se ha planteado que intervienen en la degradación de proteínas durante el desarrollo de los laticíferos o como se mencionó anteriormente, en la promoción de la coagulación como un proceso vital para la defensa de la planta contra el posible ataque de patógenos [19].

Las proteasas o peptidasas son un tipo de enzimas hidrolíticas (de la clase de las hidrolasas) capaces de escindir los enlaces peptídicos de las proteínas modificando su estructura y en el caso de las enzimas, su actividad catalítica. La hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción energéticamente favorable, pero extremadamente lenta [20]. Generalmente, las proteasas son sintetizadas como proenzimas inactivas para evitar la degradación en el lugar y sitio equivocados [21]. De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

(UIBBM), las proteasas reciben el código EC 3.4, por ser hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos [22].

Se reconocen cinco clases catalíticas de proteasas determinadas por el rol primario llevado a cabo por un grupo serin, treonin, cistein, asparto o metal en la catálisis enzimática, por lo tanto las proteasas se clasifican en serinproteasas, treoninproteasas, cisteinproteasas, aspartoproteasas y metaloproteasas [20].

El látex de papaya contiene un complejo de enzimas proteolíticas pertenecientes al grupo de las cisteinproteasas (EC 3.4.22) también conocidas como proteasas sulfhidrúlicas o tiólicas, enzimas cuya actividad proteolítica depende del grupo tiol (-SH) de un residuo de cisteína en su sitio activo. Han sido reportadas varias enzimas cisteínicas vegetales extraídas del látex de *Carica papaya* una de las más importantes y la de mayor uso a nivel industrial es la papaína, de esta planta han sido también aisladas la quimopapaína, la caricaína y la

glycilendopeptidasa; aunque la papaína es la enzima en menor proporción en el látex es la más estudiada ya que es la de más fácil purificación y mayor uso industrial [23].

Papaína (EC 3.4.22.2): La papaína pura, es una proteína constituida de 212 residuos aminoacídicos. Estos residuos se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre de un residuo de cisteína, de ahí su nombre de cistein-proteasa. Esta molécula, similar a la proteasa humana, se estabiliza gracias a la presencia de puentes disulfuro generados por enlace de aminoácidos cisteína en su estructura. Estos puentes disulfuro le confiere alta resistencia al calor presentando una alta estabilidad a temperaturas de 60°C hasta 90°C siendo la temperatura óptima de acción de la papaína 65°C [24].

La papaína es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos, leucina, glicina, así como sobre arginina,

lisina y fenil-alanina (son en enlaces próximos al grupo carboxilo de la fenilalanina). Esta enzima, al revés de la pepsina, actúa en medio neutro o alcalino, el pH óptimo de esta proteasa se encuentra entre 6 y 7; mientras que su punto isoeléctrico corresponde a un pH de 9.6 [25].

Es activada por la cisteína (aa), el tiosulfato (compuesto de azufre) y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (zinc, cadmio, hierro, plomo), oxidantes (H_2O_2 , radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico) [18].

Quimopapaína (EC 3.4.22.6): La quimopapaína, con características similares a la anterior, está constituida por 218 aminoácidos y es la cisteinproteasa más abundante en el látex de la papaya. Según se recoge en Martindale: “es una enzima proteolítica aislada del látex de la papaya (*Carica papaya*) que se diferencia de la papaína en la movilidad electroforética, la solubilidad y la especificidad del sustrato”.

La quimopapaína existe como una mezcla de dos formas, llamadas *A* y *B*, estas dos formas de la quimopapaína son inmunológicamente indistinguible [27] y tienen una secuencia de aminoácidos idéntica, sin embargo las dos formas difieren de su reactividad [28]. Son inhibidores de la quimopapaína iones de algunos metales pesados, como Ag, Cu y Zn. En cambio, la cisteína, el dimercaptopropanol y el ácido tio glicólico son activadores de este enzima [22]. El pH óptimo de la quimopapaína para la digestión de la caseína y la hemoglobina es de 7.2 con un máximo de 9 [22].

Caricaína (EC 3.4.22.30): También conocida como papaya peptidasa II, la caricaína digiere las proteínas, rompiendo los enlaces peptídicos. Comparado con otras enzimas presentes en la papaya, la caricaína se considera extremadamente alcalina. Al igual que otras enzimas de la papaya, la caricaína es un antiinflamatorio y es eficaz para romper proteínas complejas en simples aminoácidos [29].

Glicilendopeptidasa (EC 3.4.22.25): Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos con preferencia por Gly-XXa en proteínas y de pequeñas moléculas de sustrato. La enzima, miembro de la familia C1 de las peptidasas, es aislada de la planta de papaya, *Carica papaya*. No es inhibida por la cistatina del pollo (inhibidor proteico de las proteasas cisteínicas), a diferencia de la mayoría de los otros homólogos de la papaína [27].

1.3 Factores que afectan la actividad proteolítica

Oxidación química: Agentes oxidantes como yodo, bromo, peróxido de hidrógeno, el oxígeno y los metales pesados inactivan la enzima. Esto se explica debido a la participación de sulfhidrilos en la acción catalítica de la enzima, que se activa en estado reducido y se inactiva al oxidarse [18].

Coagulación: Debido a la naturaleza proteica y a la presencia de peptonas y albuminoides en el látex fresco, este tiende a coagular después de su extracción [18].

La coagulación es el proceso en el que el látex es desestabilizado coloidalmente de tal manera que sucede una agregación o unión de las partículas de la fase dispersa, separándose del medio de dispersión [30].

Cambios de pH: Una de las peculiaridades de la papaína, es que mantiene su actividad proteolítica en un amplio margen de pH, desde pH 3 hasta pH 12, presentando mayor actividad a pH entre 6 y 7. El pH óptimo para que la enzima actúe, depende del tipo de sustrato sobre el cual ejerce su acción, ya que coincide con el punto isoeléctrico del sustrato [18].

Oxidación por luz: Se inactiva con luz ultravioleta, oxidándose rápidamente por exposición a los rayos solares y el oxígeno [18].

Crecimiento microbiano: Debido a la naturaleza proteica del látex y a la forma de recolección, está propenso a contaminación por microorganismos, que realizan sobre éste acción putrefactiva [18].

Hora de recolección: Existen diferentes criterios, siendo el más corriente que la recolección debe hacerse a horas tempranas del día para evitar la fuerte acción de los rayos solares [18].

Métodos de secado: Al ser la papaína un compuesto fácilmente alterable por agentes tales como el oxígeno, la luz solar y la temperatura, el sistema de secado determina la calidad de la enzima. El secado solar, rinde un producto de baja actividad proteolítica, por lo que no se recomienda utilizar [18]. El secado por corrientes de aire caliente, rinde un producto de mejor calidad que el método anterior, más claro y con mayor actividad proteolítica. El secado al vacío, rinde un producto de alta actividad proteolítica, blanco, cremoso. Su actividad es mayor debido a que durante el proceso de secado, el producto no está en contacto con el aire [18]. La papaína en polvo secada por aspersion es de alta calidad aunque es más susceptible a la pérdida de actividad proteolítica si se almacena por largos periodos de tiempo. El secado por liofilización permite obtener un producto con una actividad proteolítica superior a los métodos anteriores.

1.4 Tratamientos de pre secado

EDTA:El ácido etilendiaminotetraacético o EDTA, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal. La función del EDTA es secuestrar metales que estén presentes en los extractos vegetales que aún no han podido ser removidos y que pueden interferir en la actividad de estas peptidasas. Los metales pesados pueden inhibir a las endopeptidasas cisteínicas por formación de mercáptidos [31].

Benzoato de sodio: El benzoato de sodio, también conocido como benzoato de sosa es una sal del ácido benzoico, blanca, cristalina o granulada, de fórmula $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$. Es un agente antimicrobiano efectivo contra levaduras y bacterias y de poca acción contra los hongos. La acción antimicrobiana se basa en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de la célula de los microorganismos. En muchas bacterias y levaduras resultan inhibidas enzimas que controlan el metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa, parece intervenir en varios sitios del ciclo del ácido cítrico, especialmente en el ácido Beta-cetoglutarico y el ácido succínico

deshidrogenasa. Además de sus efectos inactivadores de enzimas, actúa también sobre la pared celular. Para que pueda ejercer su efecto dentro de la célula tiene que penetrar a través de la pared celular [32].

Bisulfito de sodio: Su efecto antimicrobiano es ejercido contra microorganismos especialmente en los mostos, su espectro de acción incluye mohos, levaduras y bacterias. Es especialmente eficaz en medio ácido. Ayuda a evitar la oxidación de los materiales, de modo que actúa sobre enzimas llamadas oxidasas; su efecto básicamente radica en la ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas, haciendo que se inactiven las enzimas [33].

Citrato de sodio: Es la sal sódica del ácido cítrico. Se obtiene en forma de cristales blancos, inodoros y con un sabor salino refrescante. Los citratos cumplen varias funciones. Ellos incrementan la actividad de varios antioxidantes y adicionalmente exhiben por sí mismos cierta actividad antioxidante. Como anticoagulante actúa impidiendo que el calcio se ionice, evitando así la coagulación.

Cisteína:La cisteína es un aminoácido que contiene azufre conteniendo un grupo tiol (-SH). Este aminoácido ejerce función antioxidante sobre la papaína. Al momento de la extracción del látex, ponemos a la proteína en presencia de oxígeno, con lo que los grupos tiólicos se pueden oxidar, y la proteína perder su funcionalidad. Para evitar esto se añade cisteína para mantener el medio reductor, evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas.

1.5 Secado por aspersión

La operación de secado por aspersión consiste en la transformación de una alimentación en estado líquido a un producto sólido y seco, al poner en contacto dicha alimentación en forma de gotas finas con una corriente de aire caliente. El tiempo de contacto es muy corto y en consecuencia el daño debido al calor también es mínimo [34].

El secado por aspersión consiste en cuatro etapas [34].

- A. Atomización.
- B. Contacto aire – gota.

- C. Evaporación.
- D. Recuperación del producto seco

La Figura 1.6 muestra las etapas del proceso de secado por aspersion

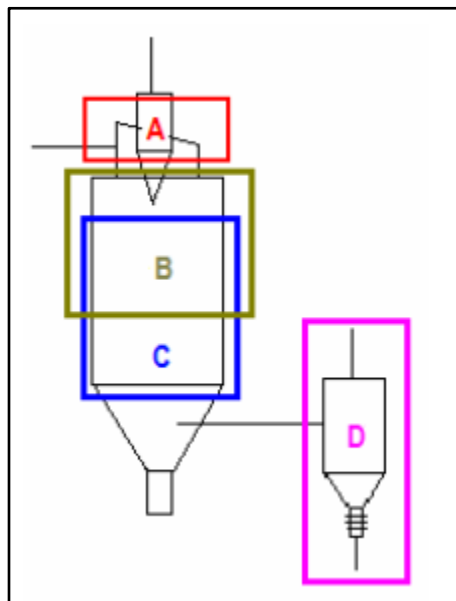


FIGURA 1. 6 Etapas del proceso de secado por aspersion
Fuente: Mendoza *et, al*, 2003

1.5.1 Microencapsulación mediante secado por aspersion

La microencapsulación es una técnica en la que un compuesto o producto activo (core) es rodeado por una cubierta (shell) de ciertos polímeros para proporcionarle protección frente a

radicales libres, humedad, oxidación debido a la luz o al oxígeno u otras condiciones que son desfavorables para su estabilidad [37].

El principio del secado por aspersión es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante [38].

Una de las principales ventajas de utilizar el secado por aspersión como método de encapsulación es que los tiempos de secado son muy cortos (5 a 30 s), es decir, materiales termosensibles como las enzimas pueden ser secados satisfactoriamente sin provocar un daño tan severo en su estructura [39]. Además de los bajos tiempos de residencia que se emplean, provee un efecto refrigerador debido a la evaporación, ya que a pesar del aporte de aire caliente, este sustrae calor por la vaporización del disolvente.

Uno de los problemas que presentan los materiales que contienen alto contenido de azúcares y ácidos orgánicos en el proceso de secado por aspersión, es el aglomerado de las partículas ya que estos compuestos tienen temperaturas de transición vítrea bajas lo que conlleva a la existencia de un estado pseudo líquido (gomoso) del material amorfo lo que causa esta aglomeración de partículas ocasionando bajas producciones del producto y problemas operacionales. Una solución a este problema de pegajosidad es el uso productos ayudantes de secado como los encapsuladores que mezclados con la muestra líquida evitan la pegajosidad y aglomeración del producto obtenido [40].

Los principales encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábica, mezquite, guar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya,

caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación [37,41].

1.6 Cuantificación de proteínas

1.6.1 Métodos para la cuantificación de proteínas

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

La Tabla 3 muestra un resumen de las características de los principales métodos de cuantificación de proteínas con sus rangos de sensibilidad.

Tabla 3
Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad

Método	Rango de sensibilidad (μg)	Coefficiente de extinción o cálculo de la concentración
Métodos de Absorción		
A_{280}	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ ml/mg cm}$
A_{205}	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ ml/mg cm}$
$A_{280} - A_{260}$	100-3000	Proteína (mg/ml) = $(1,55A_{280} - 0,76A_{260})$
$A_{235} - A_{280}$	25-700	Proteína (mg/ml) = $(A_{235} - A_{280})/2,51$
$A_{224} - A_{236}$	5-180	Proteína ($\mu\text{g/ml}$) = $144(A_{215} - A_{225})$
$A_{215} - A_{225}$	2-45	
Métodos derivados colorimétricos		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0,06 \text{ ml/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm	usar curva estándar
	2-30 a 660 nm	
	1-2 a 750 nm	
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ ml/mg cm}$
BCA	0.5-10	usar curva estándar
Métodos derivados fluorimétricos		
o-ftalaldehído	1-5 $\lambda_{\text{excitación}}$ a 340 nm	usar curva estándar
	$\lambda_{\text{emisión}}$ a 475 nm	

Fuente: Fernández, 2002.

El método que se va a usar es el de absorción UV a 280nm, el cual se explica a continuación:

Método de absorción a 280nm: Este método permite estimar cuantitativamente dicha concentración en una muestra, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, puesto que las proteínas poseen un máximo de absorción aproximadamente a una longitud de onda de 280nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, fundamentalmente tirosina, fenilalanina y triptófano [42]. Al ser la técnica no destructiva, la cantidad de muestra empleada para la estimación cuantitativa, puede ser devuelta a la muestra original [41].

1.7 Medición de la actividad enzimática

1.7.1 Métodos de determinación de la actividad proteolítica

Existen tres grupos generales de métodos para la determinación de la actividad proteolítica, según Chaverri (1983). El primer grupo consiste en la hidrólisis de sustratos sintéticos, de bajo peso molecular. Este método es muy exacto, pero poco práctico y funcional.

El segundo se basa en la capacidad de la enzima de coagular la leche. Este método es muy impreciso y poco reproducible, de acuerdo con Chaverri (1983), ya que depende del contenido de proteína de la leche utilizada en la prueba. El tercero consiste en la hidrólisis de proteínas, para el cual se utilizan diferentes sustratos (gelatina, carne, etc.). Dentro de ese grupo se incluye el método del Food Chemical Codex (1972), el cual consiste en medir la cantidad de tirosina liberada por minuto, a partir de un sustrato de caseína. Cabe mencionar que éste último es uno de los métodos más utilizados, debido a su reproducibilidad y precisión [18].

En la Tabla 4, se indican los métodos mas usados para la determinación de la actividad proteolítica con sus respectivas unidades.

Tabla 4
Métodos para la determinación de actividad proteolítica

Principio	Sustrato	Unidad
Sustratos Sintéticos	BAPA (benzol-arginine-p-nitroanilide)	mU BAPA/mg
	BAEE (benzoyl-arginine-ethylester)	FIP units/mg
Coagulación de la leche (Balls and Hoover)	Leche	MCU/mg
Hidrólisis de proteínas	Gelatina	GDU/mg
	Hemoglobina	HDU/mg
	Caseína	TU/mg
		USP units/mg
		FCC-PU/mg

Fuente: Referencia [44]

1.7.2 Unidades enzimáticas

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma [22]. La actividad enzimática se expresa habitualmente en micromoles (μmol) de sustrato convertido en producto por minuto, en determinadas condiciones de ensayo especificadas. Una unidad estándar de actividad enzimática (U) es aquella

actividad que cataliza la transformación de $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de sustrato. La actividad específica de una preparación enzimática se define como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ o U/mg de proteína) [45].

La papaína se vende por las siguientes actividades:

FIP units/mg: 1 FIP unidad de papaína es la cantidad de enzima que hidroliza bajo condiciones estándares 1 mmole de BAEE por minuto [46].

mU BAPA/mg: Una unidad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1mmol de BAPA por minuto bajo las condiciones de ensayo [46].

USP units/mg: 1 USP unidad de actividad de papaína es la actividad que libera el equivalente de $1 \mu\text{g}$ of tirosina de un sustrato específico de caseína bajo las condiciones del ensayo,

usando la concentración de enzima que libera 40 µg of tirosina por ml de la solución de la prueba [46].

FCC-PU:La unidad de papaína (PU) se define comola cantidad de enzima que libera el equivalente a 1 microgramo de tirosina por hora bajo las condiciones del análisis [47].

TU/mg:Una unidad de potencia puede ser definida como launidad que al actuar sobre el sustrato de caseína bajo las condiciones específicas produce un microgramo de tirosina por minuto[47].

MCU/mg:Una unidad de coagulo de leche (MCU) es la cantidad de actividad en un ml que hará coagular 5ml de sustrato de leche en 60 segundos a 40°C [48].

GDU/mg: Una unidad GDU libera la misma cantidad de 1mg de amino nitrógeno a partir de gelatina en 20 minutos a 45°C, pH 4.5 [47].

En la Tabla 5 se muestran las equivalencias de las principales unidades de medición de actividad enzimática.

Tabla 5
Equivalencias de las principales unidades comerciales de medición de actividad enzimática

700 TU/mg	≈	3,75 FIP units/mg
700 TU/mg	≈	7,65 mU BAPA/mg
700 TU/mg	≈	1500 MCU/mg
700 TU/mg	≈	9000 GDU/mg
700 TU/mg	≈	13500 HDU/mg
700 TU/mg	≈	42000 FCC PU/mg
700 TU/mg	≈	45000 USP units/mg

Fuente: Referencia [44,49]

1.7.3 Ensayos espectrofotométricos

En los ensayos espectrofotométricos puede seguirse el curso de una reacción mediante la observación de la cantidad de luz absorbida por la solución, en la que se está dando la reacción de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer. En óptica, la Ley de Lambert-Beer es una relación empírica que combina la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

La Ecuación 1 expresa la relación entre la absorbancia y la concentración de una sustancia en una solución.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde:

A es la absorbancia.

ε es el coeficiente de extinción, en $(\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$.

c es la concentración de sustancia absorbente en la muestra, en mg/ml.

l es la distancia que la luz atraviesa por muestra, en cm.

La ley establece que existe una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si se conoce el coeficiente de extinción (ϵ) de una molécula determinada y la distancia (l) que el rayo de luz atraviesa por la muestra, la concentración de la molécula puede ser calculada al medir la absorbancia de la solución que la contiene [22]. Para poder utilizar un ensayo de este tipo, debe haber entre los sustratos o los productos alguno que absorba luz a una longitud de onda determinada, y que sea la única molécula de la mezcla de reacción que lo hace a esa longitud de onda; de esta forma se puede observar el aumento o la disminución de la absorbancia con el transcurso del tiempo [50].

1.8 Aplicación en la industria

La papaína tiene un sinnúmero de aplicaciones en la industria alimenticia, en la tenderización y ablandamiento de carne y en la clarificación de cerveza, así como tiene un gran uso en otros tipos de

industrias como la farmacéutica por sus propiedades digestivas y en la industria cosmética por su poder desmachador y cicatrizante. A continuación se describe su uso en las principales industrias de aplicación [51].

Industria cervecera

La industria cervecera utiliza el 75% de los suministros totales de papaína. El aclarado y el mantenimiento de la claridad de la cerveza pueden realizarse como etapas separadas del proceso durante las etapas principales de preparación de la cerveza: malteado, fermentación en braceado, "lagerización", embotellado, enlatado o trasvase a barriles. Surgen problemas en el proceso con el desarrollo de turbiedades no biológicas de la cerveza. La papaína se utiliza al inmunizar la cerveza a los cambios de temperatura, proceso en el cual las turbiedades por ácido tánico causadas por la formación de complejos de fenol polihídrico proteínico (polifenol) durante la destilación y durante el enfriamiento se degradan mediante la papaína, de forma que las partículas del complejo son demasiado pequeñas para formar una turbiedad.

En el proceso, la papaína se utiliza en forma líquida o en polvo. El líquido se puede añadir directamente al proceso, y el polvo deshidratado por aspersion se suele envasar en sacos solubles en agua hechos de alcohol vinílico. Las diferentes cervezas necesitan cantidades distintas de papaína, según su duración de almacenado; así, la cerveza de barril, que se vende con relativa rapidez, necesita menos papaína que una cerveza con una duración de almacenado de 3 a 6 meses.

Industrias cárnicas

Existen varias patentes sobre el proceso de ablandamiento de la carne con papaína. Van desde las inyecciones de papaína antes de la matanza hasta una solución helada de papaína después del sacrificio. La papaína se utiliza en diversas cantidades en cada uno de esos procesos, puede utilizarse en combinación con bromelina o ficina, y se puede emplear sucedáneo, como enzimas bacteriales y de hongos. La papaína también puede incorporarse en una sal ablandadora que se pone a la carne antes de cocinarla.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas experimentales de este trabajo de investigación se desarrollaron en los laboratorios de Bromatología y Operaciones unitarias de la carrera de Ingeniería en Alimentos y en las áreas de Biología Molecular y Bioproductos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

2.1 Materiales, reactivos y equipos

Los aditivos agregados al látex en la recolección fueron bisulfito de sodio, EDTA y citrato de sodio, todos de grado alimenticio. Los aditivos agregados en sustitución del bisulfito de sodio fueron –

cisteína para fines bioquímicos (Merck Millipore) y benzoato de sodio de grado alimenticio.

El látex fue centrifugado en una Centrífuga refrigerada marca ThermoFisher SCIENTIFIC, Alemania. La microencapsulación se llevó a cabo en un secador en spray marca SD Basic de LabPlant y se utilizó como agente encapsulante goma arábica de grado alimenticio. La medición de la humedad se realizó en una Termo-balanza marca Kern.

La medición de la actividad enzimática se llevó a cabo en un espectrofotómetro de haz de luz simple marca Spectronic Génesis 5. Como sustrato se utilizó caseína de leche bovina marca Sigma-Aldrich. Para la preparación de la enzima y del sustrato se utilizó fosfato disódico anhídrido (Baker Analyzed, U.S.A.) grado analítico, L – cisteína para fines bioquímicos (Merck Millipore), EDTA (Baker Analyzed, U.S.A.) grado analítico, ácido cítrico monohidratado, ácido tricloroacético 30% (Baker Analyzed, U.S.A.) grado analítico.

Para la elaboración de la curva de calibración de tirosina se utilizó L – tirosina para fines bioquímicos (Merck Millipore) y ácido clorhídrico 0.1N.

Los datos recopilados en este trabajo fueron procesados mediante el paquete estadístico MINITAB, versión 16.0 en español para sistemas operativos Windows.

2.2 Proceso de extracción experimental del látex

2.2.1 Caracterización de la materia prima para la extracción del látex

Con el fin de obtener un proceso estandarizado, se deben caracterizar las materias primas a ser utilizadas. De acuerdo a Chaverri (1986), las características que debe tener el fruto para la extracción del látex son:

- ✓ Color del fruto: Verde

- ✓ Edad del fruto: 2.5 a 3 meses de edad (al final de la etapa de crecimiento y antes del comienzo de la maduración).
- ✓ Edad de la planta: Hasta 5 años de edad (después de los 5 años los frutos se vuelven más pequeños y por lo tanto más improductiva).
- ✓ Densidad de la siembra: La variedad Maradol tiene una densidad de 1500 plantas/hectárea, la Criolla 1111 plantas/hectárea y la variedad Golden 2222 plantas/hectárea. Estos datos se tomaron de la hacienda donde se trabajó, cuya densidad es obtenida de datos bibliográficos.

Se utilizaron además, los métodos de análisis descritos a continuación.

- ✓ Acidez titulable: Se evaluó con la técnica de titulación con hidróxido de sodio al 0.1 N usando fenolftaleína como indicador y los resultados se expresaron en porcentaje de ácido málico por 100g de pulpa siguiendo el método AOAC 22.060.

- ✓ Grados Brix: Se determinaron con un refractómetro manual con escala del 0 al 30 siguiendo la técnica de la AOAC 31.011.
- ✓ Relación SST/Acidez: Esta proporción muestra la cantidad de partes de azúcar (como porcentaje de sólidos solubles), en una parte ácida (como porcentaje total de ácido), (NELSON, 1984a).

Los parámetros de caracterización de la materia prima se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6
Caracterización de la papaya como materia prima

Parámetro	Valoración		
	Maradol	Golden	Criolla
SST (°Brix)	10.00 ± 1.60	11.00 ± 2.1	9.20 ± 1.80
Acidez (% ácido málico)	0.140 ± 0.030	0.156 ± 0.025	0.131 ± 0.021
Índice de madurez (SST/Acidez)	71.42 ± 2.60	70.51 ± 3.45	70.22 ± 4.71

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

2.2.2 Recolección y tratamiento del látex

Los frutos fueron obtenidos de plantas cultivadas en la comuna San Rafael, Provincia de Santa Elena, Ecuador. Las variedades utilizadas para el experimento fueron Maradol, Golden y Criolla. Se escogieron 20 plantas sanas para cada variedad de papaya seleccionando frutos inmaduros de 2.5 a 3 meses de edad para la extracción del látex. La hora de recolección fue a las 07h00 am para evitar el sol, ya que los rayos ultravioleta oxidan el látex.

El proceso de recolección y extracción del látex se realizó en intervalos de cada tres a cuatro días como se describe a continuación:

1. Previamente se limpiaron las papayas que fueron utilizadas para el proceso con agua destilada y se las secó bien con papel toalla, esto con el fin de eliminar materia orgánica o cualquier tipo de impurezas que se encuentra adherida a la superficie del fruto.

2. Se usó guantes plásticos y gafas protectoras durante la recolección del látex para evitar el contacto de este con la piel u ojos.
3. Se realizaron de tres a cuatro incisiones longitudinales en el pericarpio del fruto utilizando una hoja de acero inoxidable. La profundidad de las incisiones no sobrepasó los 3mm, ya que cuando esto ocurre, los jugos y almidones de la pulpa se mezclan con el látex, afectando su calidad.
4. Las gotas de látex líquido y el látex coagulado fueron recogidos en bolsas de polietileno de alta densidad con la ayuda de un embudo plástico como se muestra en la Figura 2.1. Al momento de retirar el látex coagulado hay que hacerlo con mucha precaución para evitar la incorporación de trozos de corteza.



FIGURA 2. 1 Extracción y recolección del látex

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

5. Inmediatamente después de la recolección del látex, se pesaron las muestras y se adicionaron los aditivos: bisulfito de sodio, citrato de sodio y EDTA en concentraciones de 1%, 4% y 0.2% en peso respectivamente.
6. Posteriormente las fundas fueron selladas, empacadas al vacío y almacenadas a refrigeración durante el transporte como lo muestra la Figura 2.2



FIGURA 2. 2 Sellado al vacío del látex
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

En la Figura 2.3 se muestra un diagrama que indica la metodología seguida para el tratamiento del látex desde su recolección hasta la obtención de papaína cruda.

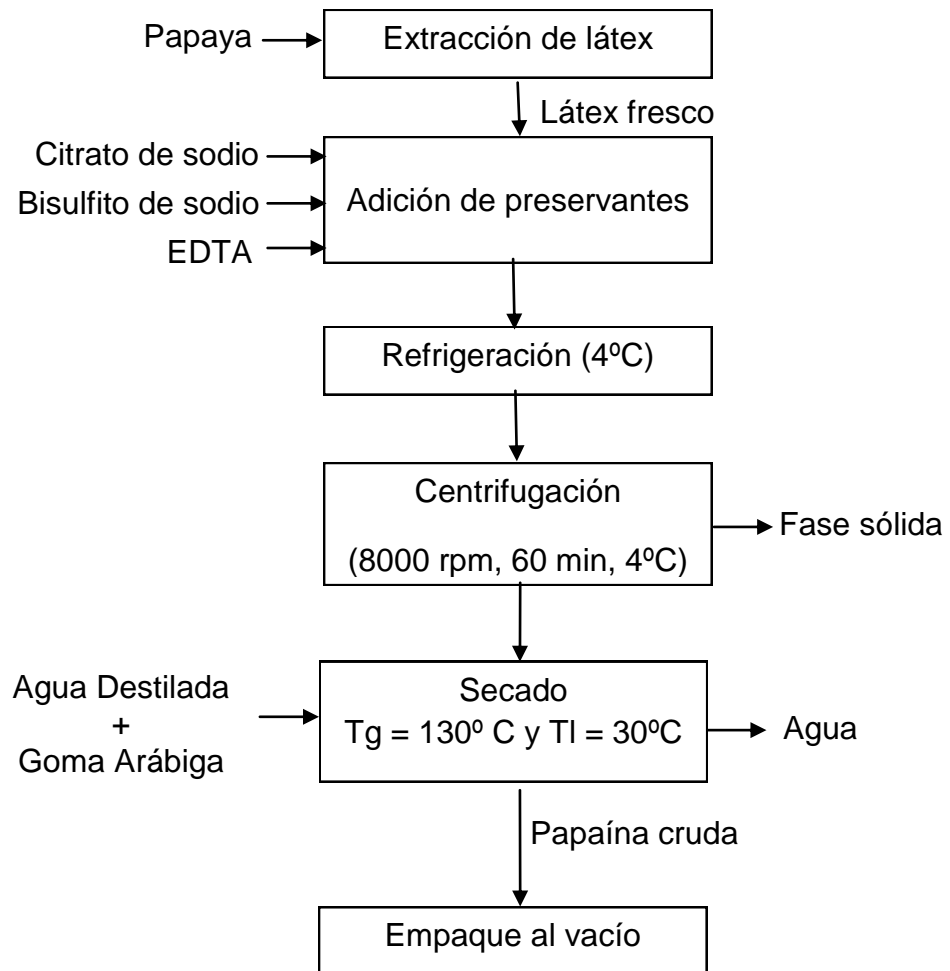


FIGURA 2. 3 Metodología para el tratamiento del látex
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

2.3 Caracterización del látex

2.3.1 Características físico-químicas del látex de papaya

Se consideraron los siguientes parámetros para la caracterización del látex:

Rendimiento: Se determinó el rendimiento promedio en gramos de látex extraídos por kg de fruto para cada variedad de papaya.

Densidad: Para la determinación de la densidad aparente se utilizaron recipientes de aluminio de forma cilíndrica, a los cuales, previamente se les determinó su volumen. La densidad aparente fue calculada relacionando el peso del látex con el volumen del recipiente.

Materia Seca: Se pesaron 2 gramos de muestra y se colocaron en la termobalanza marca Kern a una temperatura de 101°C. Se calculó el % de Materia seca con la siguiente ecuación:

$$\% MS = 100 - \% humedad \quad Ec. 2$$

Grados Brix: Se efectuó siguiendo la técnica de la AOAC 31.011.

pH: Se pesó 10 gramos de la muestra y se homogenizó con 20 ml de agua destilada. La mezcla se calentó hasta ebullición y se añadió 20 ml más de agua destilada al homogenizado y una vez enfriado a 20°C se mide el pH.

Acidez titulable: Se usó la técnica de titulación con hidróxido de sodio al 0.1 N usando fenolftaleína como indicador y los resultados se expresaron en porcentaje de ácido cítrico siguiendo el método AOAC 22.060.

Color: Para la determinación del color se usó el sistema Munsell, el cual describe todos los posibles colores en términos de tres coordenadas: matiz (Hue) que mide la composición cromática de la luz que alcanza el ojo, claridad (Value), el cual

indica la luminosidad u oscuridad de un color en relación a una escala de gris neutro y pureza (Chroma) que indica el grado de saturación del gris neutro por el color del espectro.

La tabla Munsell está compuesta de hojas (Figura 2.4) representando cada una de estas un matiz (Hue) específico que aparece en la parte superior derecha de la página. Cada hoja contiene una serie de plaquitas que representan la claridad (Value) y la pureza (Chroma). La claridad se presenta en sentido vertical y la pureza en sentido horizontal en la parte inferior de la hoja. Para describir el color se utilizó dos parámetros: el color Munsell y la notación Munsell.

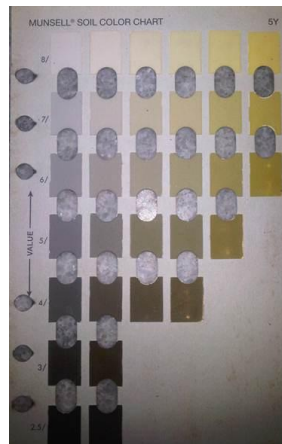


FIGURA 2. 4 Carta de colores Munsell
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

2.4 Caracterización de papaína cruda

2.4.1 Procedimiento de secado del látex

El látex fue centrifugado a 8000 rpm durante 60 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada marca ThermoFisher SCIENTIFIC, (Alemania) como lo muestra la Figura 2.5.

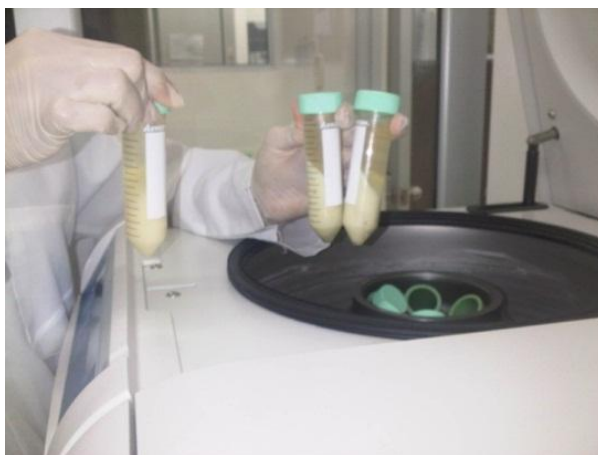


FIGURA 2. 5Centrifugación del látex

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Dos fases claramente distintas se formaron en el recipiente luego de la centrifugación: el sedimento, que contiene gomas y materiales vegetales insolubles el cual fue desechado, y el sobrenadante (Figura 2.6) que se procedió a pesar para

obtener el rendimiento por variedad de papaya en esta etapa del proceso.



FIGURA 2. 6Látex centrifugado
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

La papaína cruda fue microencapsulada usando goma arábica mediante un secador de aspersion con boquilla de dos fluidos (Spray Dryer SD Basic LabPlant, UK). Las condiciones a las que fue operado el equipo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7
Parámetros del proceso de secado

Temperatura de entrada del aire	130°C
Temperatura de entrada de la muestra	30°C
Flujo de alimentación	3.5 ml/min.
Caudal del aire de secado	70m ³ /h
Diámetro de la boquilla de alimentación	0.5mm
Suministro de aire comprimido	50ml/min a 4 bar

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

La técnica de microencapsulación se realizó de acuerdo al método descrito por Reyes Nava, 2010. La preparación de la mezcla látex centrifugado – goma arábica se realizó en una proporción 80:20 respectivamente. La preparación de goma arábica se realizó a una concentración del 25% p/v disolviéndola en agua destilada a 70°C, una vez disuelta se dejó enfriar y se mezcló con el látex centrifugado.

El proceso de secado de la mezcla de látex centrifugado – goma arábica se realizó como se describe a continuación:

1. Se encendió el interruptor del ventilador y el interruptor del calentador y se ajustó en el display digital la temperatura del aire a la entrada de la columna de secado.
2. Se introdujo la goma de silicona de la bomba peristáltica hasta el fondo de un vaso de precipitado con agua destilada.
3. Se esperó hasta alcanzar la temperatura seleccionada y se procedió a encender el compresor de aire.
4. Se encendió el interruptor de alimentación principal para poner en marcha la aspiración del agua.
5. Se ajustó el caudal de la bomba peristáltica de alimentación a 3.5ml/min.

6. Una vez que la temperatura de salida alcanzó el estado estacionario, se cambió la goma de silicona de la bomba peristáltica del vaso con agua al vaso de precipitado que contiene la muestra a secar.
7. Cuando el proceso de atomización y secado se inicia el polvo cae hacia el recipiente de recolección como se observa en la Figura 2.7.



FIGURA 2. 7 Proceso de secado del látex

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

8. Una vez que ha pasado toda la muestra a atomizar se cambió la goma de silicona de la bomba peristáltica al vaso de precipitado con agua destilada. Se esperó unos

minutos hasta que se limpió la goma de silicona y la tobera de atomización, se ajustó el caudal de la bomba peristáltica a cero y se detuvo la bomba de alimentación e inmediatamente se apagó el compresor.

9. Se ajustó la temperatura del aire de entrada a 30°C y se desconectó la calefacción.
10. Se apagó la aspiración y se apagó el equipo. Se procedió a abrir el recipiente de recogida de polvo. Con la ayuda de un pincel se recogió todo el polvo que se encontraba adherido en el interior del ciclón.
11. El producto en polvo obtenido (Figura 2.8) se recogió en bolsas de polietileno de alta densidad, convenientemente etiquetadas, se pesó y se sellaron al vacío almacenándolas en un lugar en refrigeración y protegidos de la luz.



FIGURA 2. 8 Papaína cruda

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se realizaron los siguientes análisis a la papaína cruda obtenida con el fin de caracterizar el producto final

Humedad: Se pesaron 5 gramos de muestra y se colocaron en la termobalanza a una temperatura de 101°C.

Rendimiento: Se determinó el rendimiento promedio de papaína cruda para cada variedad de papaya, mediante la razón:

$$\frac{\text{peso de látex seco (g)}}{\text{peso de látex fresco (g)}}$$

Ec. 3

Color: Se usó la tabla Munsell para la determinación de color de la papaína cruda.

2.4.2 Determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína

Para la determinación del contenido proteico en la papaína cruda se utilizó el método de absorción ultravioleta a 280 nm descrito por Warburg y Christian (1941). Se procedió a preparar un extracto acuoso de 50 mg/ml a partir de látex seco para lo cual se colocó 500 mg del polvo de látex en un matraz de 10ml y se añadió tampón fosfato 50mM y pH 7.5 hasta aforarlo. Se colocó el matraz en refrigeración durante 24 horas para la solubilización de las proteínas. Se filtró y se tomó el filtrado el cual se colocó en un tubo de vidrio. Para realizar la medida de absorbancia de las muestras fue necesario diluir 1 parte del extracto acuoso en 9 partes de la solución tampón.

La absorbancia fue medida en el espectrofotómetro de la siguiente manera:

- a) Se seleccionó la longitud de onda de 280 nm.
- b) Se puso en la cubeta del espectrofotómetro 2ml de la solución buffer fosfato 50mM para tomar la lectura del blanco, se secó y limpió bien por fuera para introducirla en el espectrofotómetro.
- c) Una vez dada la lectura de absorbancia del blanco, se taró el equipo para que ese valor sea sustraído de los valores de absorbancia de las muestras.
- d) Se tomaron 2ml de muestra y se midió la absorbancia de los extractos de papaína cruda.

La Ecuación 3 fue utilizada para calcular la concentración de proteína.

$$[P] = \frac{DO_{280} \frac{f}{L}}{\varepsilon} \quad Ec. 4$$

Dónde:

$[P]$ es la concentración de proteína soluble, en mg/ml.

DO_{280} es la densidad óptica medida a 280 nm.

f es el factor de dilución.

L es la longitud del paso de la luz en la celda, en cm.

ϵ es el coeficiente de extinción de la enzima a 280 nm, cuyo valor se considera igual a $1.0 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.3 Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el Método Analítico de la Unidad de Tirosina (TU/g), cuyo procedimiento se detalla en el Anexo A.

Lo primero que se procedió a hacer fue la curva de calibración, la cual fue hecha usando L-tirosina y ácido clorhídrico 0.10N como diluyente. Para la elaboración de la solución madre se disolvió 100mg de L-tirosina en HCL 0.10N y se diluyó en un matraz aforado de 1 L. Posteriormente se prepararon 3 soluciones usando HCL 0.10N como diluyente con el fin de obtener 4 puntos de diferente concentraciones para la curva de calibración

La Tabla 8 muestra los datos de concentración final obtenidos de la dilución de la solución madre de tirosina.

Tabla 8
Concentraciones usadas para la elaboración de la curva de tirosina

Concentración Final	Dilución de la Solución Madre de Tirosina
25,0 µg/ml	25ml/100ml
50,0 µg/ml	50ml/100ml
75,0 µg/ml	75ml/100ml
100,0 µg/ml	-

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

La absorbancia se determinó a 280nm usando HCl 0.10N para iniciar el instrumento en cero. Se graficó la absorbancia obtenida contra la concentración de tirosina y se determinó la pendiente, la cual debe caer en una rango de 0.0064 y 0.0076.

Para la medición de la actividad enzimática se usó caseína como sustrato, cuya preparación se indica en la Figura 2.9.

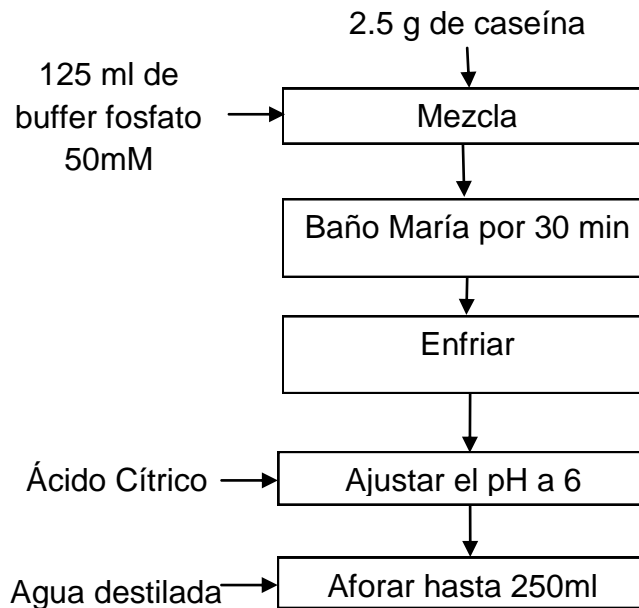


FIGURA 2. 9Preparación sustrato de caseína

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Para diluir la enzima se preparó una solución buffer de cisteína cuyo procedimiento se indica en la Figura 2.10.

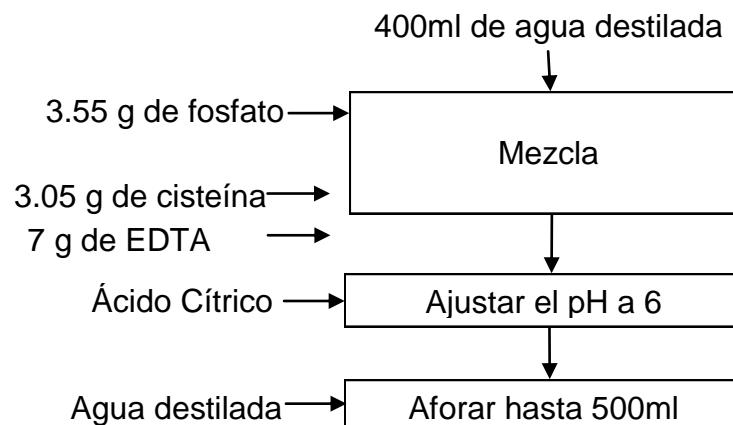


FIGURA 2. 10Preparación buffer cisteína

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

La preparación de la enzima se realizó a una concentración de 50mg/ml de acuerdo al procedimiento descrito por Sigma-Aldrich (2008) para enzimas ligadas a gomas, usando buffer cisteína como medio disolvente.

La Figura 2.11 muestra el procedimiento seguido para la medición de la actividad enzimática. Cada ensayo consiste en dos pruebas de enzima y un blanco.

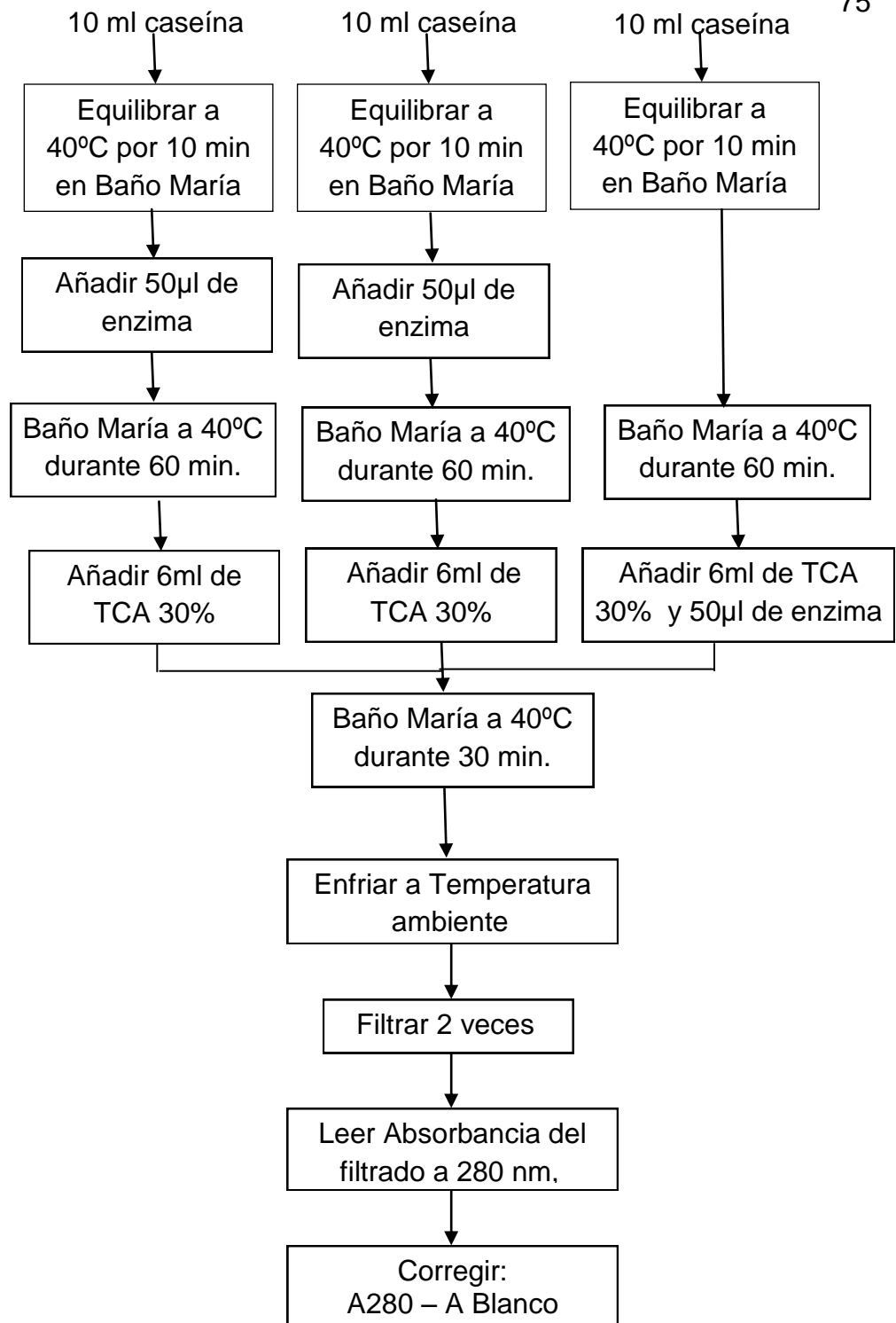


FIGURA 2. 11 Medición de actividad enzimática

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Para calcular la actividad enzimática se usó la Ecuación 4.

$$\frac{TU}{ml} = DO_{280} \times \frac{V_{total}}{(V_{enzima})(tiempo)} \times \frac{1}{pendiente} \times FD \quad Ec. 5$$

Dónde:

TU/ml: es la actividad enzimática expresada en unidades de tirosina

DO₂₈₀: es la densidad óptica medida a 280 nm menos la densidad óptica del blanco

V_{total}: es el volumen del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA)

tiempo: duración de la hidrólisis en minutos

pendiente: pendiente obtenida de la curva de tirosina.

FD: es el factor de dilución usado cuando los valores de absorbancia dieron valores mayores a 1.

El cálculo de la actividad enzimática específica se realizó mediante la Ecuación 5 (Chávez y otros, 1990), que define la actividad enzimática por cantidad de proteína presente en el extracto.

$$A_{esp} = \frac{AE}{[P]} \quad Ec.6$$

Dónde:

A_{esp} : es la actividad enzimática específica expresada en unidades de tirosina por miligramo de proteína (TU/mg)

AE : actividad enzimática, en TU/ml

$[P]$: concentración de proteína, en mg/ml

2.5 Diseño de experimentos

2.5.1 Variables y niveles para pruebas experimentales

Los factores o variables independientes del experimento, que se analizaron son los tratamientos de pre secado añadidos al látex al momento de la recolección en sustitución del bisulfito de sodio.

Es decir que como factores o variables independientes, se consideraron:

- 1) Cisteína, empleada como agente reductor.
- 2) Benzoato de sodio, usado como agente antimicrobiano.

Las variables fijas o variables controladas del experimento fueron:

- 1) Variedad de papaya: Maradol
- 2) Citrato de sodio (4% p/p), usado como anticoagulante.
- 3) EDTA (0.2% p/p), empleado como agente quelante

La variable de respuesta o variable dependiente del experimento fue la actividad enzimática expresada en unidades de tirosina (TU/ml).

La Figura 2.12 muestra un esquema del diseño factorial.



FIGURA 2. 12Diseño Factorial

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Los niveles a experimentar fueron 2, representados como nivel alto (2) y nivel bajo (1). La Tabla 9 muestra los factores y niveles del diseño experimental.

Tabla 9
Factores y niveles del diseño de experimentos

Factores		
Niveles	Cisteína	Benzoato de sodio
1	0,5%	0,1%
2	1%	0,5%

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Por lo tanto, en la elaboración de este proyecto se realizó un modelo factorial 2^2 por duplicado, el cual también puede ser expresado usando el modelo de la Ecuación 6.

$$y_{k(ij)} = \mu + C_i + B_j + CB_{ij} + \varepsilon_{k(ij)} \quad \text{Ec. 7}$$

Los subíndices i, j están asociados al tratamiento y el subíndice k está asociado a la repetición dentro de cada tratamiento.

Dónde:

$y_{k(ij)}$: corresponde al valor de la variable de respuesta en la repetición k de los tratamientos i, j .

μ : es la media general del experimento.

C_i : es el efecto del tratamiento i : 1,2.

B_j : es el efecto del tratamiento j : 1,2.

CB_{ij} : es el efecto de las interacciones de los factores de los tratamientos i, j .

$\varepsilon_{k(ij)}$: es el error experimental en la repetición k : 1,2 de los tratamientos i, j .

De acuerdo al modelo de la *Ec. 6* las hipótesis del experimento son:

$$H_0: C_i = 0 \text{ vs } H_1: C_i \neq 0$$

$$H_0: B_j = 0 \text{ vs } H_1: C_j \neq 0$$

$$H_0: CB_{ij} = 0 \text{ vs } H_1: CB_{ij} \neq 0$$

2.5.2 Determinación de corridas experimentales

Se estableció un diseño factorial 2^2 lo que dio 4 experimentos por réplica y como se tiene 2 réplicas, el número final de experimentos realizados es de 8, los cuales fueron completamente aleatorios, tal y como se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10**Corridas experimentales**

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	Cisteina	Benzoato de sodio
6	1	1	2	1	2
5	2	1	2	1	1
7	3	1	2	2	1
8	4	1	2	2	2
2	5	1	1	1	2
4	6	1	1	2	2
3	7	1	1	2	1
1	8	1	1	1	1

Fuente: Minitab 16

La columna OrdenEst muestra el orden estándar o el orden de Yates de las corridas. La columna OrdenCorrida muestra el orden de las corridas del experimento si éste se ejecuta en orden aleatorio. El orden que sigue este diseño se conoce como OrdenCorrida, y cada fila indica el tratamiento que se dará a la unidad experimental.

CAPÍTULO 3

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Validación estadística de los resultados obtenidos

3.1.1 Validación de pruebas para látex: Rendimientos y caracterización

Rendimientos:

Se presenta a continuación una comparación de los resultados obtenidos en los rendimientos de cada etapa del proceso.

Extracción

De acuerdo a la Tabla 11, la variedad Golden obtuvo un rendimiento promedio de $0,82 \pm 0,10$ g látex/ Kg fruta. Se procedió a rayar solo 6 plantas ya que al ser el rendimiento tan poco, se consideró que no era factible realizar la extracción de látex en esta variedad, por tal motivo, se descartó esta variedad en esta etapa del proyecto y se continuó trabajando con las variedades Maradol y Criolla.

Tabla 11

Rendimiento de látex fresco de la variedad Golden

RENDIMIENTO VARIEDAD GOLDEN (g látex/Kg fruto)					
Planta	Número de frutos	Peso total de los frutos (Kg)	Látex fresco Primera recolección	Látex fresco Segunda recolección	Rendimiento Total
1	12	3,6	0,56	0,33	0,89
2	16	5,6	0,54	0,36	0,89
3	12	4,8	0,58	0,34	0,93
4	14	4,2	0,42	0,24	0,65
5	11	3,3	0,53	0,23	0,76
6	10	3	0,50	0,27	0,77
PROMEDIO		0,33 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,30±0,05	0,82 ± 0,10

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

De acuerdo a los datos de la Tabla 12 y 13, el rendimiento de la variedad Maradol es de $1,57 \pm 0,75$ g de látex/Kg fruta mientras que para la variedad Criolla es de $2,31 \pm 0,69$ g de látex/Kg fruta.

Tabla 12
Rendimiento de látex fresco de la variedad Maradol

RENDIMIENTO VARIEDAD MARADOL (g látex/Kg fruto)						
Planta	Número de frutos	Peso total de los frutos (Kg)	Látex fresco Primera recolección	Látex fresco Segunda recolección	Látex fresco Tercera recolección	Rendimiento Total
1	22	22	0,77	0,50	0,31	1,59
2	10	30	0,5	0,33	0,20	1,03
3	19	38	0,84	0,55	0,30	1,69
4	9	27	0,52	0,34	0,21	1,06
5	7	21	0,257	0,17	0,12	0,54
6	8	24	0,983	0,64	0,62	2,24
7	14	14	1,515	0,99	0,64	3,39
8	8	24	0,116	0,08	0,05	0,24
9	8	24	0,221	0,14	0,08	0,45
10	4	12	0,948	0,62	0,19	1,76
11	13	39	0,744	0,48	0,17	1,40
12	7	21	0,952	0,62	0,24	1,81
13	11	22	0,955	0,62	0,50	2,08
14	9	27	0,778	0,56	0,41	1,74
15	13	13	0,938	0,62	0,46	2,02
16	20	20	1,190	0,80	0,70	2,69
17	10	30	0,494	0,32	0,20	1,01
18	8	24	0,905	0,59	0,32	1,81
19	20	60	0,727	0,47	0,17	1,37
20	10	10	0,740	0,48	0,30	1,52
PROMEDIO		2,40±0,88	0,75±0,33	0,49±0,22	0,31±0,18	1,57±0,75

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Tabla 13

Rendimiento de látex fresco de la variedad Criolla

RENDIMIENTO VARIEDAD CRIOLLA (g látex/Kg fruto)						
Planta	Número de frutos	Peso total de los frutos (Kg)	Látex fresco Primera recolección	Látex fresco Segunda recolección	Látex fresco Tercera recolección	Rendimiento Total
21	7	35	1,34	0,40	0	1,74
22	12	36	1,39	0,42	0	1,81
23	10	35	1,86	0,57	0	2,43
24	11	44	1,57	0,48	0	2,05
25	4	24	1,25	0,38	0,14	1,76
26	7	21	1,81	0,57	0,22	2,60
27	10	30	1,67	0,50	0,25	2,41
28	4	10	1,90	0,60	0,47	2,97
29	8	32	1,34	0,41	0,16	1,91
30	3	21	2,00	0,62	0,27	2,89
31	9	15	1,07	0,33	0,12	1,52
32	6	30	1,07	0,33	0,12	1,52
33	6	30	1,50	0,47	0,1	2,07
34	16	48	0,65	0,19	0	0,83
35	3	18	2,00	0,61	0	2,61
36	7	18	1,50	0,50	0,11	2,11
37	9	45	2,31	0,71	0,58	3,60
38	10	35	2,11	0,66	0,4	3,17
39	11	33	2,06	0,64	0,36	3,06
40	6	36	2,06	0,64	0,36	3,06
PROMEDIO		4,08±1,45	1,62±0,42	0,50±0,13	0,18±0,17	2,31±0,69

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en el rendimiento del látex extraído de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

H₀: El rendimiento del látex de la variedad Maradol es igual al rendimiento del látex de la variedad Criolla.

H₁: El rendimiento del látex de la variedad Maradol no es igual al rendimiento del látex de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice A) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice A), mostrando los resultados en la Tabla 14.

Tabla 14

Prueba T e IC de dos muestras: Rendimiento. Variedad

T de dos muestras para Rendimiento				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Maradol	20	1,572	0,750	0,17
Criolla	20	2,306	0,694	0,16
Diferencia = μ (Maradol) - μ (Criolla)				
Estimado de la diferencia: -0,734				
IC de 95% para la diferencia: (-1,196. -0,272)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -3,21				
Valor P = 0,003 GL = 38				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,7225				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P menor a 0.05 (valor-P = 0.003), se tiene suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 es decir, existe diferencia significativa en el rendimiento entre las dos variedades de papaya, con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto la variedad Criolla tiene un mayor rendimiento de látex que la variedad Maradol, esto se explica debido a que el tamaño de los frutos difiere según la variedad, consecuentemente se puede alegar que a mayor tamaño del fruto mayor será el rendimiento del látex.

La Figura 3.1 muestra un diagrama de cajas donde se puede apreciar la diferencia existente entre el rendimiento de látex por variedad de papaya.

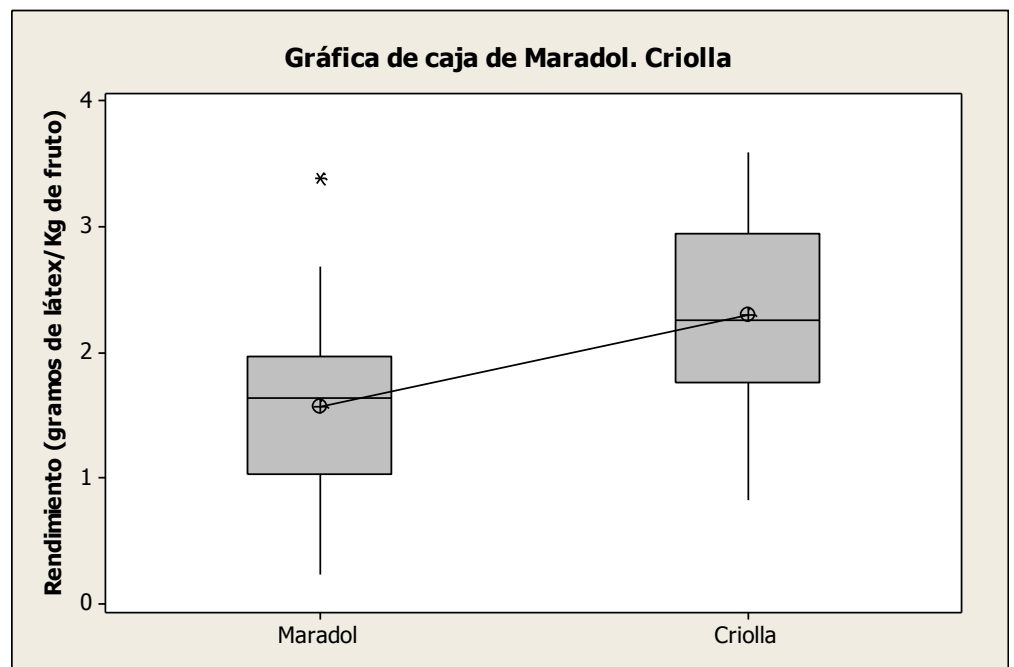


FIGURA 3. 1 Gráfica de caja de Rendimiento de látex fresco
Fuente: Minitab 16

En la Figura 3.2 se muestra una gráfica del rendimiento de látex por variedad de papaya de acuerdo al número de recolección, donde se observa que hay una disminución significativa del látex extraído, principalmente para la variedad Criolla. Se recomienda no realizar más de tres recolecciones

de látex, ya que después de la tercera recolección, los frutos empiezan a desarrollar manchas amarillas, índice de que comienza a madurar. La cantidad de látex y la concentración de enzimas disminuyen grandemente, esto es debido a que el proceso de maduración supera al proceso de recuperación del flujo de látex en las frutas.

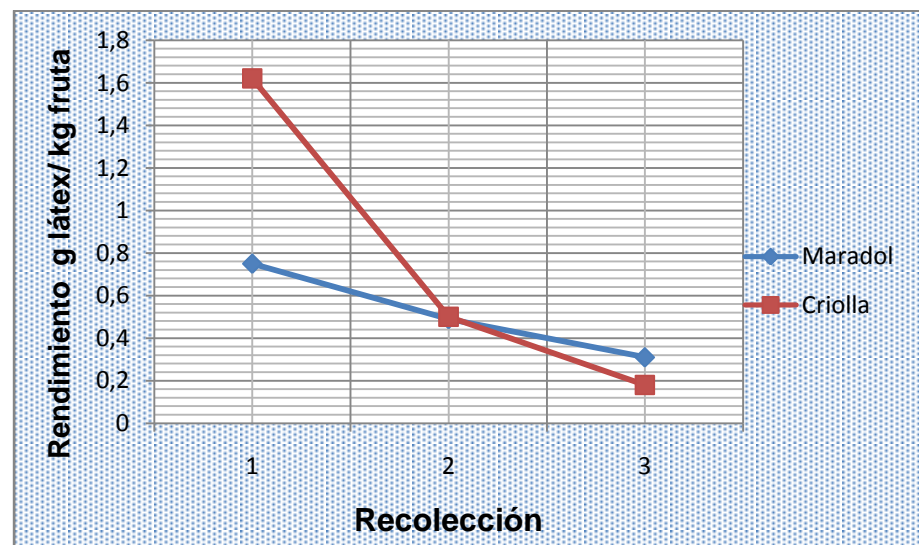


FIGURA 3. 2 Rendimiento de látex fresco por recolección

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Centrifugación

La Figura 3.3 muestra los porcentajes de sobrenadante y precipitado obtenido del látex de las variedades de papaya

Criolla y Maradol en donde se observa que existe un mayor porcentaje de sobrenadante en ambas variedades, siendo para la variedad Criolla del 63.2% y para la variedad Maradol 64.5%.

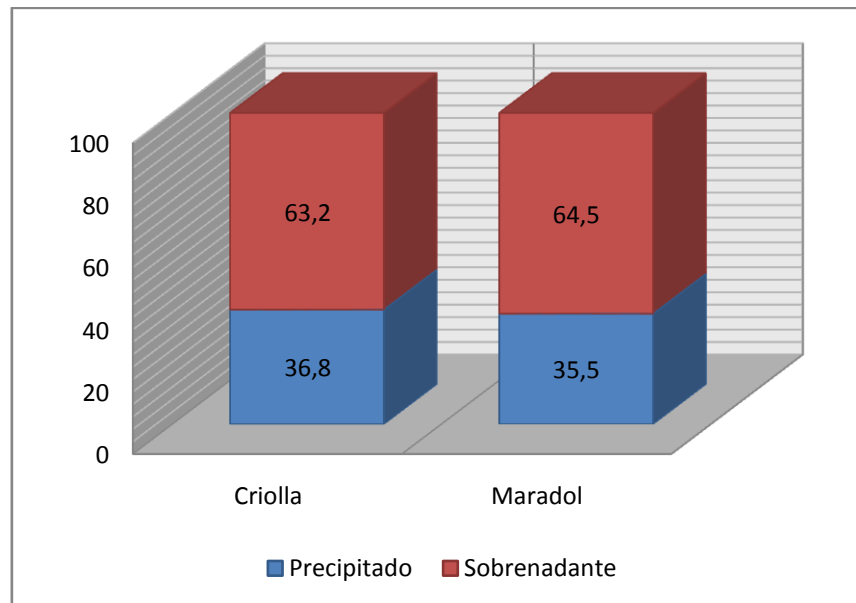


FIGURA 3. 3Látex centrifugado

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en el porcentaje del látex centrifugado de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

H₀: El sobrenadante del látex de la variedad Maradol es igual al sobrenadante del látex de la variedad Criolla.

Hi: El sobrenadante del látex de la variedad Maradol no es igual al sobrenadante del látex de la variedad Criolla.

Tabla 15

Prueba T e IC de dos muestras: Sobrenadante. Variedad

T de dos muestras para Criolla vs. Maradol				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	63,19	3,93	1,8
Maradol	4	64,53	3,23	1,6
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -1,34				
IC de 95% para la diferencia: (-7,13. 4,44)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -0,55				
Valor P = 0,600 GL = 7				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 3,6458				

Fuente: Minitab 16

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice B) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice B), mostrando los resultados en la Tabla 15.

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.600) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto no existe diferencia significativa en el porcentaje de

sobrenadante de las muestras, con un 95% de nivel de confianza. Fue importante determinar si existía diferencia significativa entre las dos variedades, ya que a mayor cantidad de sobrenadante se obtiene mayor rendimiento de papaína cruda.

Secado

De acuerdo a los datos de la Tabla 16, el rendimiento en la etapa de secado de la variedad Maradol es de $0,068 \pm 0,005g$ de látex seco/g látex fresco mientras que para la variedad Criolla es de $0,071 \pm 0,005g$ de látex seco/g látex fresco.

Tabla 16
Rendimientos de látex seco

Criolla	Maradol
<i>Làtex seco (g)</i> <i>Làtex fresco (g)</i>	<i>Làtex seco (g)</i> <i>Làtex fresco (g)</i>
0.071	0.060
0.063	0.068
0.079	0.076
0.070	0.067
0.071	0.062
0,071 ± 0,005 g	0,068 ± 0,005 g

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en el rendimiento del secado de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

H₀: El rendimiento del secado del látex de la variedad Maradol es igual al rendimiento del secado del látex de la variedad Criolla.

H₁: El rendimiento del secado del látex de la variedad Maradol no es igual al rendimiento del secado del látex de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice C) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice C), mostrando los resultados en la Tabla 17.

Tabla 17

Prueba T e IC de dos muestras: Secado. Variedad

T de dos muestras para Criolla vs. Maradol				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	0,07080	0,00567	0,0025
Maradol	5	0,06860	0,00598	0,0027
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: 0,00220				
IC de 95% para la diferencia: (-0,00630. 0,01070)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 0,60				
Valor P = 0,567 GL = 8				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0058				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0,567), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 es decir, no existe diferencia significativa en el rendimiento de la etapa de secado entre las dos variedades, con un nivel de confianza del 95%.

En las Figuras 3.4 y 3.5 se muestra un diagrama del proceso de la extracción y tratamiento del látex para obtener 1 Kg de papaína cruda.

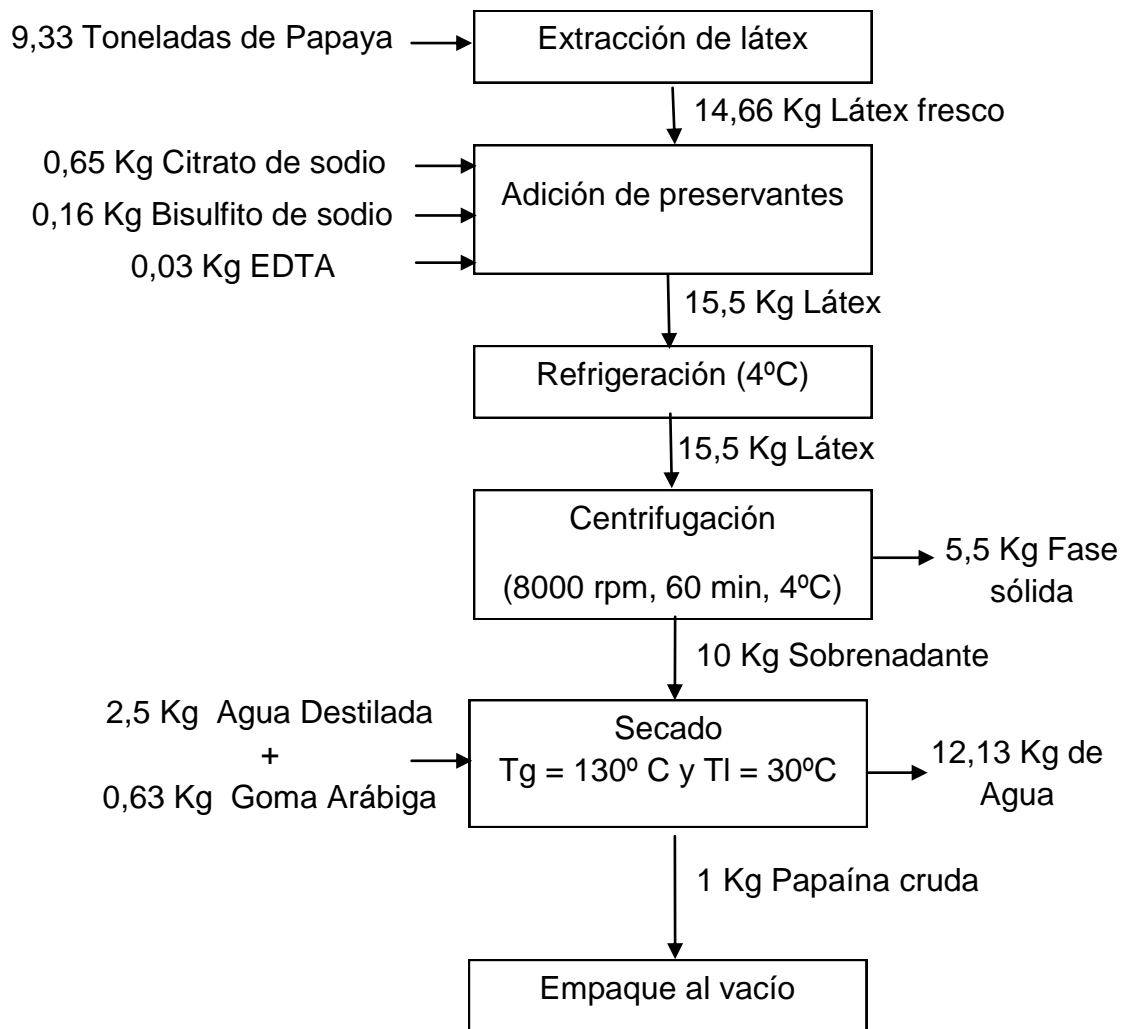


FIGURA 3. 4Proceso de obtención del látex de la variedad Maradol
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

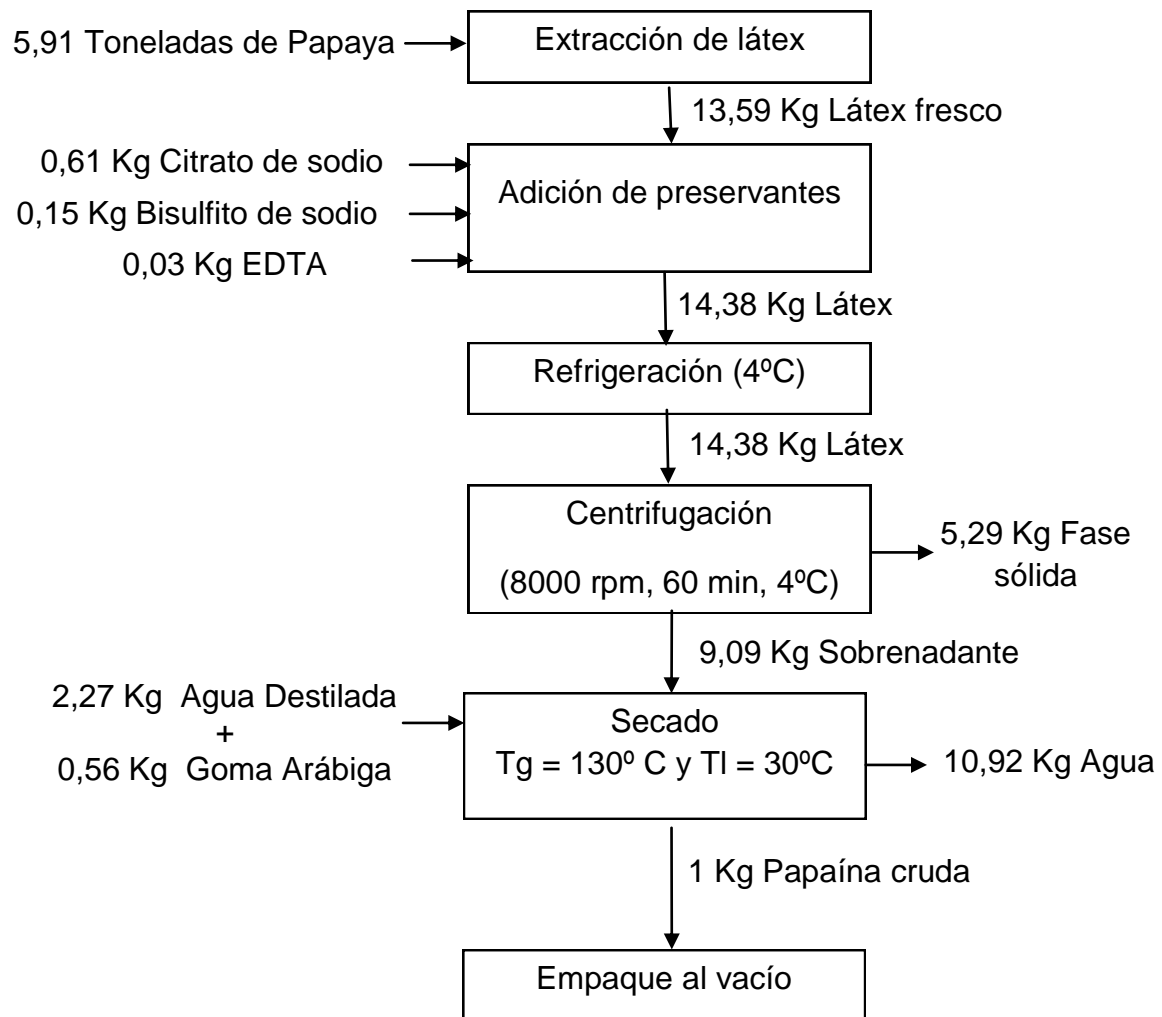


FIGURA 3. 5Proceso de obtención del látex de la variedad Criolla
Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Caracterización:

A continuación se muestra una comparación de los resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos del látex de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

Prueba de hipótesis para Densidad

H₀: La densidad del látex de la variedad Maradol es igual a la densidad del látex de la variedad Criolla.

H₁: La densidad del látex de la variedad Maradol no es igual a la densidad del látex de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice D) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice D), mostrando los resultados en la Tabla 18.

Tabla 18

Prueba T e IC de dos muestras: Densidad (g/ml). Variedad

T de dos muestras para Densidad (g/ml)				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	7	1,0257	0,0291	0,011
Maradol	8	1,0478	0,0425	0,015
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -0,0220				
IC de 95% para la diferencia: (-0,0633. 0,0192)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,15				
Valor P = 0,270 GL =13				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0369				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.270), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 es decir, no existe diferencia significativa en la densidad de látex entre las dos variedades.

La Figura 3.6 muestra mediante un diagrama de cajas que no existe diferencia significativa entre las medias de la densidad del látex por variedad de papaya.

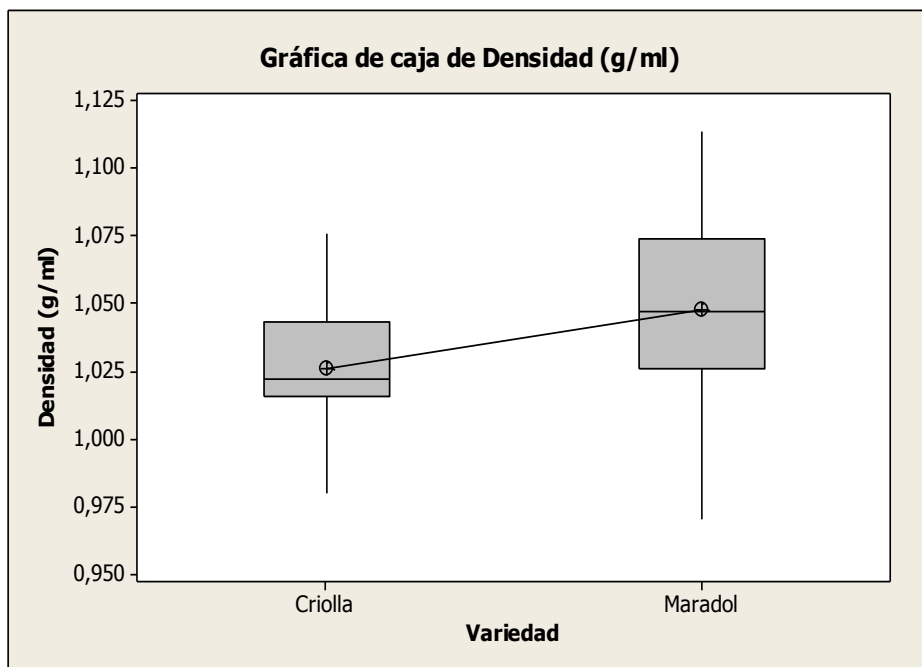


FIGURA 3. 6 Gráfica de caja de Densidad (g/ml)

Fuente: Minitab 16

Prueba de hipótesis para °Brix

H₀:: Los °Brix del látex de la variedad Maradol es igual a los °Brix del látex de la variedad Criolla.

H_i: Los °Brix del látex de la variedad Maradol no es igual a los °Brix del látex de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice E) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras

independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice E), mostrando los resultados en la Tabla 19.

Tabla 19

Prueba T e IC de dos muestras: °Brix. Variedad

T de dos muestras para °Brix				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	8	14,48	2,03	0,72
Maradol	8	17,74	1,64	0,58
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -3,265				
IC de 95% para la diferencia: (-5,240. -1,290)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -3,55 Valor P = 0,003 GL =14				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 1,8416				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P menor a 0.05 (valor-P = 0.003), se tiene suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1 es decir, existe diferencia significativa en los °Brix del látex entre las dos variedades por lo que se puede afirmar que el látex de la variedad Maradol tiene un mayor contenido de °Brix, con un 95% de nivel de confianza.

La Figura 3.7 muestra mediante un diagrama la diferencia existente entre las medias de los °Brix del látex por variedad de papaya.

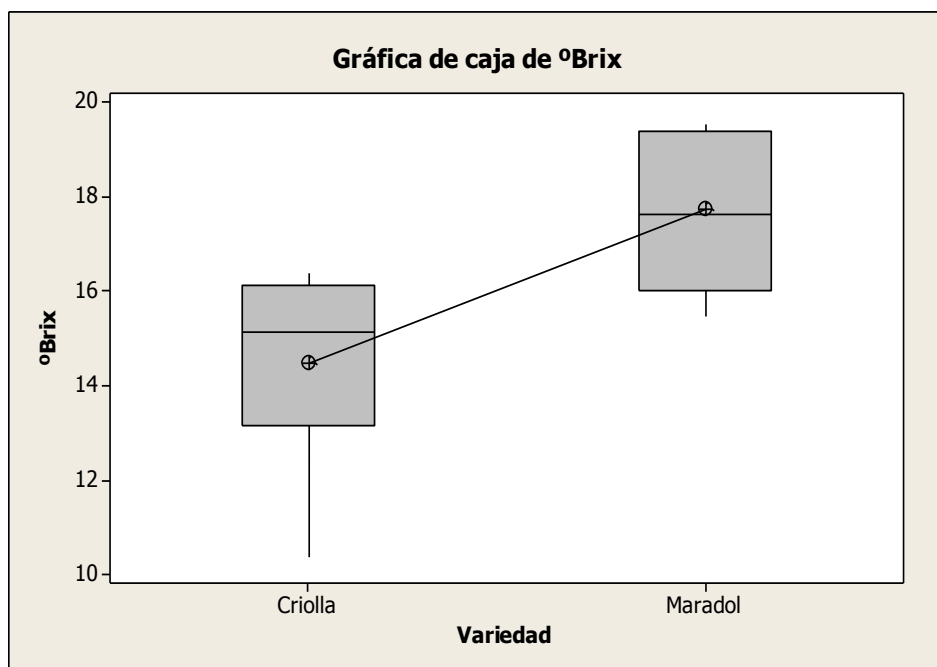


FIGURA 3. 7 Gráfica de caja de ° Brix
Fuente: Minitab 16

La variedad de papaya Maradol, es una variedad diseñada genéticamente para tener un alto grado de dulzor, por lo tanto el fruto listo para consumir tiene valores de sólidos solubles de aproximadamente 12°Brix, superior al de otras variedades de

papaya. Siendo el látex, uno de los productos de excreción de las plantas, está encargado de elaborar, acumular y eliminar sustancias que la planta no utiliza en sus funciones vitales. Estas sustancias pueden ser productos o residuos del metabolismo; entre ellas tenemos los lípidos, alcaloides, taninos, almidones, azúcares, entre otros. La composición del látex depende de la variedad de la planta, por lo tanto era de esperarse que el látex de la variedad Maradol presente mayor contenido de grados Brix que la variedad Criolla.

Prueba de hipótesis para % de Materia Seca

H₀: El % de materia seca del látex de la variedad Maradol es igual al % de materia seca del látex de la variedad Criolla.

H₁: El % de materia seca del látex de la variedad maradol no es igual al % de materia seca del látex de la variedad criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice F) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras

independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice F), mostrando los resultados en la Tabla 20.

Tabla 20

**Prueba T e IC de dos muestras: % de MATERIA SECA.
VARIEDAD**

T de dos muestras para % de MATERIA SECA				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	7	22,55	1,98	0,75
Maradol	9	23,53	1,46	0,49
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -0,982				
IC de 95% para la diferencia: (-2,820. 0,856)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,15 Valor P = 0,271 GL = 14				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 1,7003				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.271), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_i es decir, no existe diferencia significativa en el % de materia seca del látex entre las dos variedades.

La Figura 3.8 muestra un diagrama de cajas donde se puede observar que no existe diferencia significativa entre el % de Materia Seca del látex por variedad de papaya.

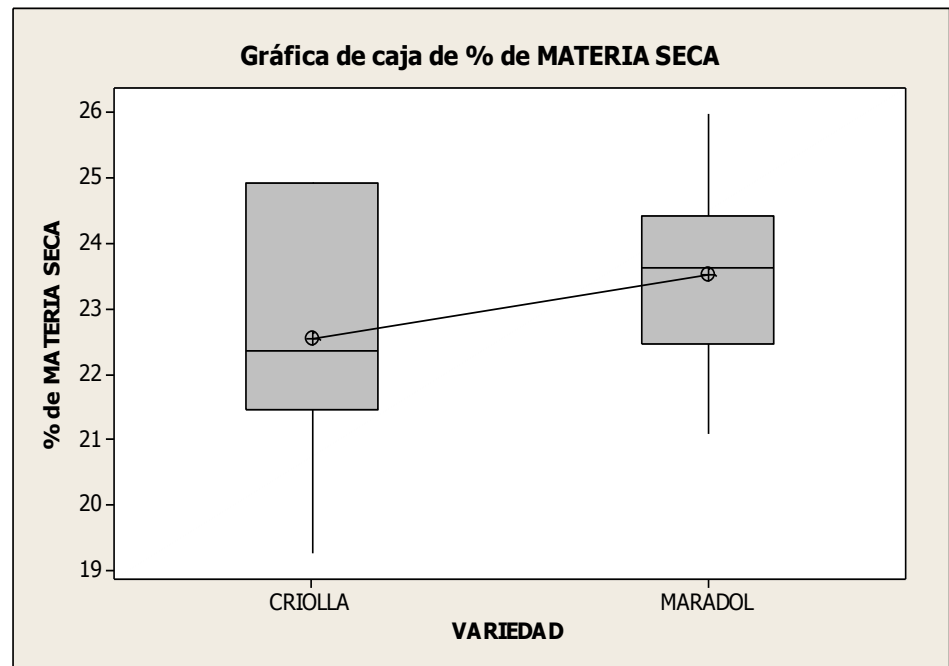


FIGURA 3. 8 Gráfica de caja de % de Materia Seca
Fuente: Minitab 16

Prueba de hipótesis para pH

H₀: El pH del látex de la variedad Maradol es igual al pH del látex de la variedad Criolla.

H_i: El pH del látex de la variedad Maradol no es igual al pH del látex de la variedad Criolla.

Como los datos de pH de la variable Maradol no siguen una distribución normal (ver ApéndiceG) se procedió a usar la prueba de Mann-Whitney, mostrando los resultados en la Tabla 21.

Tabla 21

Prueba de Mann-Whitney e IC: MARADOL. CRIOLLA

Variedad	N	Mediana
MARADOL	9	6,1000
CRIOLLA	6	6,0000
La estimación del punto para ETA1-ETA2 es 0,1000		
96,1 El porcentaje IC para ETA1-ETA2 es (0,1000.0,2001)		
W = 81,5		
Prueba de ETA1 = ETA2 vs. ETA1 no es = ETA2 es significativa en 0,2888		
La prueba es significativa en 0,2640 (ajustado por empates)		

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.288), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_i es decir, no existe diferencia significativa en el pH del látex entre las dos variedades.

La Figura 3.9 muestra mediante un diagrama de cajas que no existe diferencia significativa entre el pH del látex por variedad de papaya.

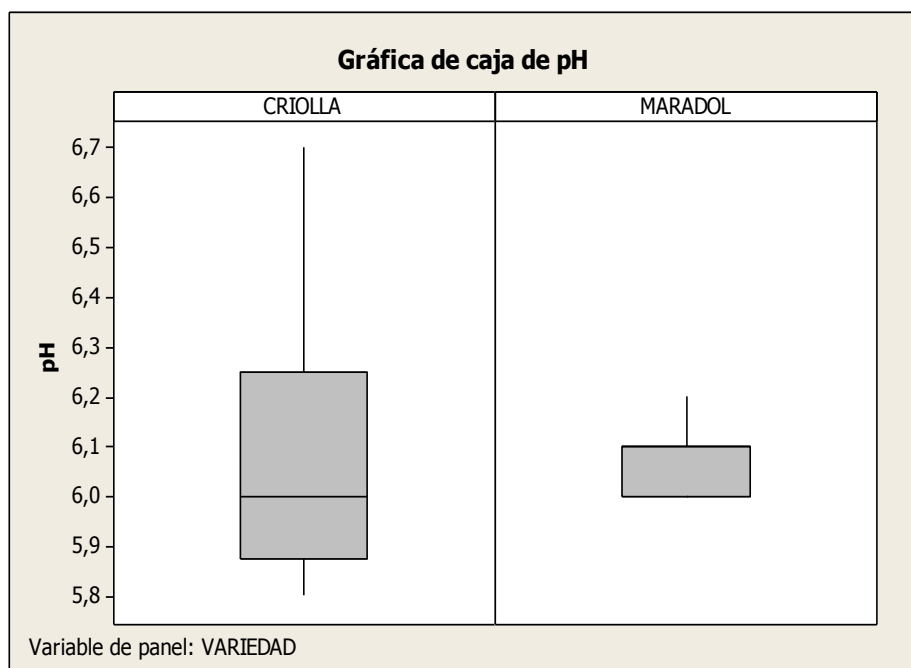


FIGURA 3. 9 Gráfica de caja de pH

Fuente: Minitab 16

Prueba de hipótesis para Acidez Titulable

H₀: La acidez titulable del látex de la variedad Maradol es igual a la acidez titulable del látex de la variedad Criolla.

H₁: La acidez titulable del látex de la variedad Maradol no es igual a la acidez titulable del látex de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice H) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice H), mostrando los resultados en la Tabla 22.

Tabla 22

Prueba T e IC de dos muestras: Acidez titulable. Variedad

T de dos muestras para Acidez titulable (% ácido cítrico)				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	0,09190	0,00663	0,0030
Maradol	5	0,09976	0,00483	0,0022
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -0,00786				
IC de 95% para la diferencia: (-0,01632. 0,00060)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -2,14 Valor P = 0,065 GL = 8				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,0058				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.065), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_1 es decir, no existe diferencia significativa en el % de ácido cítrico del látex entre las dos variedades.

La Figura 3.10 muestra un diagrama donde se aprecia que no existe diferencia significativa entre las medias de la acidez titulable del látex por variedad de papaya.

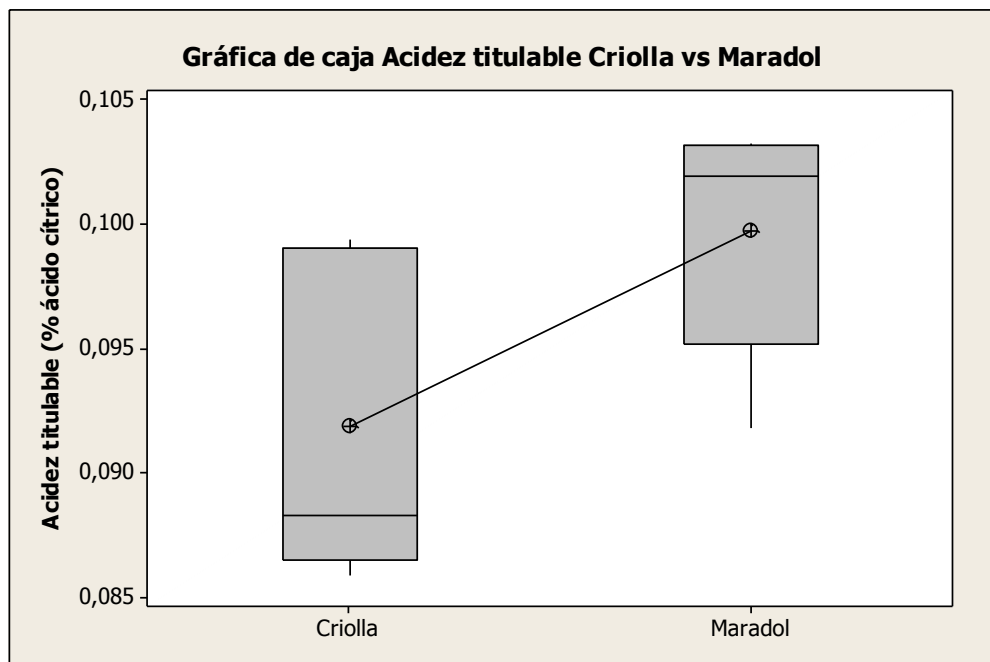


FIGURA 3. 10 Gráfica de caja de Acidez titulable

Fuente: Minitab 16

En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización del látex de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

Tabla 23
Características del látex de papaya

Parámetro	Variedad		Método
	Maradol	Criolla	
Densidad (g/ml)	1.0478 ± 0.0425	1.0257 ± 0.0291	Indirecto
*SST (°Brix)	17.74 ± 1.64	14.48 ± 2.03	Refractometría (AOAC 22.024)
Materia Seca (%)	23.53 ± 1.46	22.55 ± 1.98	Termogravimétrico (AOAC 967.19)
pH	6.0	6.1	Potencimétrico (AOAC 981.12)
Acidez titulable (%ácido cítrico)	0.0919 ± 0.00483	0.0998 ± 0.0066	Volumétrico (AOAC 22.060)
Color (moda)	5Y 8/2	5Y 8/1	Munsell

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

*Presenta diferencia estadística significativa a un nivel de confianza del 95%

3.1.2 Validación de pruebas para papaína cruda: Actividad enzimática

Se presenta a continuación los resultados obtenidos en las pruebas de cuantificación de proteínas y actividad proteolítica realizadas a las muestras de papaína cruda.

Cuantificación de proteínas:

De acuerdo a la Tabla 24, la variedad Criolla obtuvo una concentración de proteínas promedio de $1.902 \pm 0,3714$ mg/ml y la variedad Maradol obtuvo una concentración de proteínas promedio de $2.136 \pm 0,1592$ mg/ml.

Tabla 24

Contenido proteico de la papaína cruda

Criolla		Maradol	
Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)
0,144	1,44	0,220	2,2
0,165	1,65	0,201	2,01
0,219	2,19	0,196	1,96
0,234	2,34	0,236	2,36
0,189	1,89	0,215	2,15
Promedio	1,902± 0.3714	Promedio	2,136± 0.1592

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en la concentración de proteínas entre las dos variedades de papaya.

H₀: La concentración de proteínas de la papaína cruda de la variedad Maradol es igual a la concentración de proteínas de la variedad Criolla.

H₁: La concentración de proteínas de la papaína cruda de la variedad Maradol no es igual a la concentración de proteínas de la papaína cruda de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice I) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes asumiendo varianzas poblacionales iguales (ver Apéndice I), mostrando los resultados en la Tabla 25.

Tabla 25
Prueba T e IC de dos muestras: Concentración de
proteínas. Variedad

T de dos muestras para Concentración de proteínas (mg/ml)				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	1,902	0,371	0,17
Maradol	5	2,136	0,159	0,071
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -0,234				
IC de 95% para la diferencia: (-0,651. 0,183)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -1,29				
Valor P = 0,232 GL = 8				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 0,265				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.232), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_i es decir, no existe diferencia significativa en el contenido proteico entre las dos variedades, con un 95% de nivel de confianza.

La Figura 3.11 muestra un diagrama de cajas donde se puede apreciar la diferencia existente en el contenido proteico de papáina cruda por variedad de papaya.

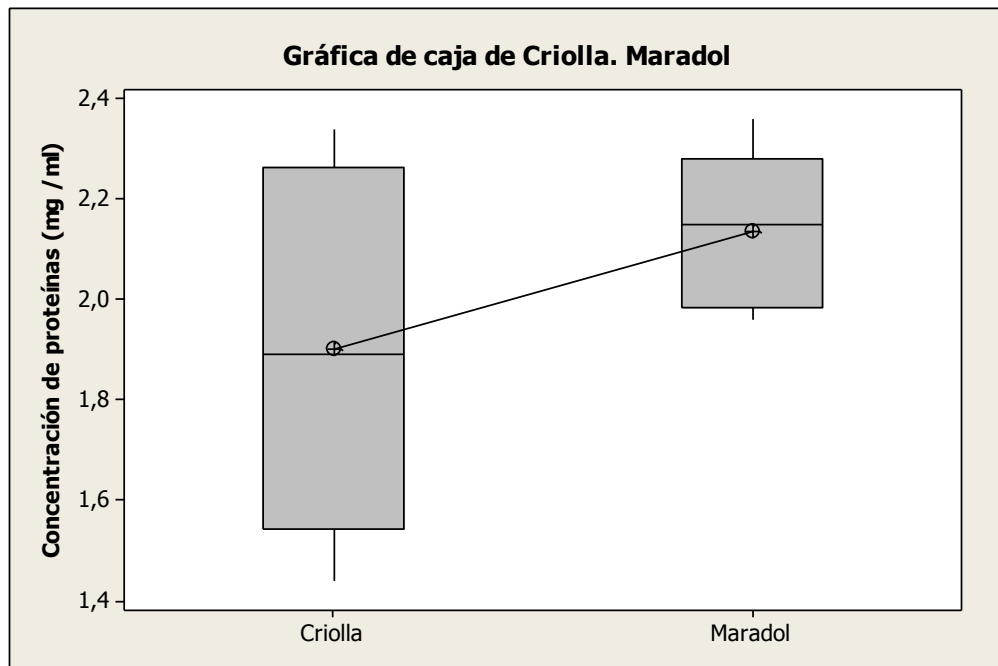


FIGURA 3. 11 Gráfica de caja de concentración de proteínas

Fuente: Minitab 16

El error estándar de la media, es una medida del error que se comete al tomar la media calculada en una muestra como estimación de la media poblacional, por lo tanto, para saber si un experimento se ha llevado a cabo correctamente, la media de los datos sumado a su error estándar debe caer dentro del intervalo de confianza de la media poblacional.

Tabla 26

Prueba T para concentración de proteínas (mg/ml)

T de una muestra: Criolla (mg/ml). Maradol (mg/ml)					
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC del 95%
Criolla (mg/ml)	5	1,902	0,371	0,17	(1,441. 2,363)
Maradol (mg/ml)	5	2,136	0,159	0,071	(1,9384. 2,3336)

Fuente: Minitab 16

De acuerdo a los datos de la Tabla 26, el intervalo de confianza para la media poblacional de la variedad Criolla es de (1.441, 2.363). Si a la media muestral de los datos de la variedad Criolla se le suma su error estándar da un valor de 2,07 y si se le resta es de 1,732, se puede ver que estos valores se incluyen en los intervalos a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los datos analizados para estimar a la media poblacional son confiables.

La Tabla 26 nos da el intervalo de confianza para la media poblacional de la variedad Maradol el cual es de (1.9384, 2.336). Nuevamente, si a la media muestral de los datos de la

variedad Maradol se le suma su error estándar da un valor de 2,207 y si se le resta es de 2,065 donde se puede ver que estos valores se incluyen en los intervalos a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los datos analizados para estimar a la media poblacional de la variedad Maradol también son confiables.

Curva de Tirosina:

En la Tabla 27 se muestran los resultados de absorbancia obtenidos para la elaboración de la curva de tirosina.

Tabla 27
Absorbancia para curva de tirosina

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
25	0,107
50	0,287
75	0,416
100	0,686

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Con los datos de la Tabla 27 se construyó la curva que se indica en la Figura 3.12.

De la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta:

$$A = mC + b$$

Dónde:

A: Absorbancia

m: pendiente de la curva de calibración

C: concentración (µg/ml)

b: la intersección del valor de absorbancia o del eje "y"

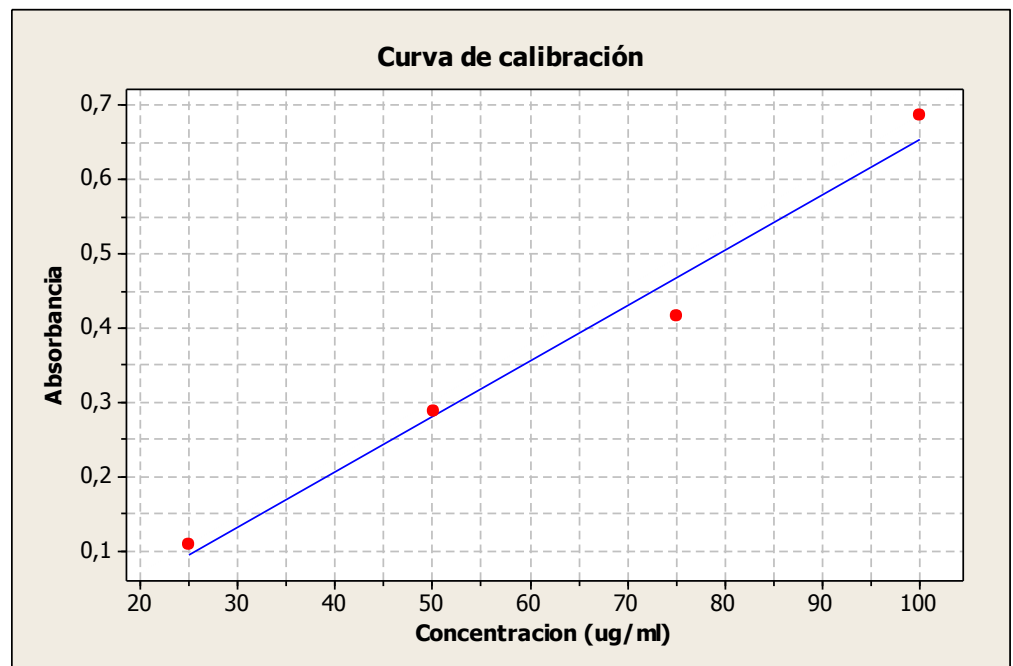


FIGURA 3. 12 Curva de calibración

Fuente: Minitab 16

Se hizo un análisis de regresión lineal entre absorbancia y concentración de tirosina, cuyos resultados se indican en la Tabla 28.

Tabla 28

Análisis de regresión: Absorbancia vs. Concentración (ug/ml)

La ecuación de regresión es: Absorbancia = - 0,0925 + 0,00746 Concentración (µg/ml)				
Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constante	-0,09250	0,05386	-1,72	0,228
Concentración (ug/ml)	0,0074640	0,0007867	9,49	0,011
S = 0,0439784 R-cuad. = 97,8% R-cuad.(ajustado) = 96,7%				

Fuente: Minitab 16

De acuerdo a los datos de la Tabla 28, el valor de pendiente de la curva de calibración es de 0.00746 el cual es significativamente diferente de cero (valor-P = 0.011) con un nivel de confianza del 95%. Además, este valor cae dentro del rango establecido por el método analítico de la unidad de tirosina, el cual indica que la pendiente debe estar dentro del rango de 0.0064 y 0.0076.

El valor R indica el 97.8% de variabilidad de los datos, el cual es mayor al 70%, por lo tanto el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto.

Actividad enzimática:

De acuerdo a la Tabla 29, la variedad Criolla obtuvo una actividad enzimática específica promedio de $592,53 \pm 93,61$ TU/mg de proteína y de acuerdo a la tabla 30, la variedad Maradol obtuvo una actividad enzimática específica promedio de $531,30 \pm 27,90$ TU/mg de proteína.

Tabla 29

Actividad proteolítica del látex variedad Criolla

Criolla					
A	B	TU/ml A	TU/ml B	TU/ml Prom	TU/mg proteína
0,722	0,693	1043,97	1002,036	1023,00	710,42
0,678	0,659	980,347	952,8745	966,61	589,40
0,620	0,690	1344,72	1496,548	1420,64	648,69
0,605	0,578	1312,191	1253,63	1282,91	548,25
0,618	0,600	893,591	867,564	880,58	465,91
PROMEDIO				1114,75	592,5

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Tabla 30
Actividad proteolítica del látex variedad Maradol

Maradol					
A	B	TU/ml A	TU/ml B	TU/ml Prom	TU/mg proteína
0,852	0,807	1231,9409	1166,8736	1199,41	545,19
0,725	0,756	1048,3065	1093,1306	1070,72	532,70
0,651	0,703	1411,9604	941,30694	1016,50	518,62
0,637	0,597	1381,596	1294,8393	1338,22	567,04
0,74	0,726	1069,9956	1049,7524	1059,87	492,96
PROMEDIO				1136,94	531,30

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

Se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en la actividad enzimática entre las dos variedades de papaya.

H₀: La actividad enzimática de la papaína cruda de la variedad Maradol es igual a la actividad enzimática de la papaína cruda de la variedad Criolla.

H₁: La actividad enzimática de la papaína cruda de la variedad Maradol no es igual a la actividad enzimática de la papaína cruda de la variedad Criolla.

Como los datos siguen una distribución normal (ver Apéndice J) se procedió a usar la prueba Two Sample T para muestras independientes con varianzas diferentes (ver Apéndice J), mostrando los resultados en la Tabla 31.

Tabla 31
Prueba T e IC de dos muestras: Actividad enzimática.
Variedad

T de dos muestras para Actividad enzimática (TU/mg)				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	592,5	93,6	42
Maradol	5	531,3	27,9	12
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: 61,2				
IC de 95% para la diferencia: (-60,0. 182,5)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = 1,40				
Valor P = 0,234 GL = 4				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 117,6564				

Fuente: Minitab 16

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.234), se tiene suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 a favor de H_i es decir, no existe diferencia significativa en la actividad enzimática de la papaína cruda entre las dos variedades, con un 95% de nivel de confianza. Esto se explica debido a que el látex de ambas variedades tiene características similares,

resaltando el pH, el cual es uno de los factores que influye notablemente en la conformación espacial de una enzima, pudiendo alterar su estructura terciaria y por lo tanto su actividad.

Se puede observar además, que la variedad Criolla presenta mayor variabilidad en actividad enzimática que la variedad Maradol, esto se debe a que la papaya Criolla al ser un híbrido no controlado presenta gran variabilidad genética lo que impide producir frutas de calidad homogénea lo que da como resultado que se obtengan datos con gran dispersión tanto para contenido de proteínas como para actividad enzimática.

La Figura 3.13 muestra un diagrama de cajas donde se puede apreciar la diferencia existente en la actividad proteolítica de papaína cruda por variedad de papaya.

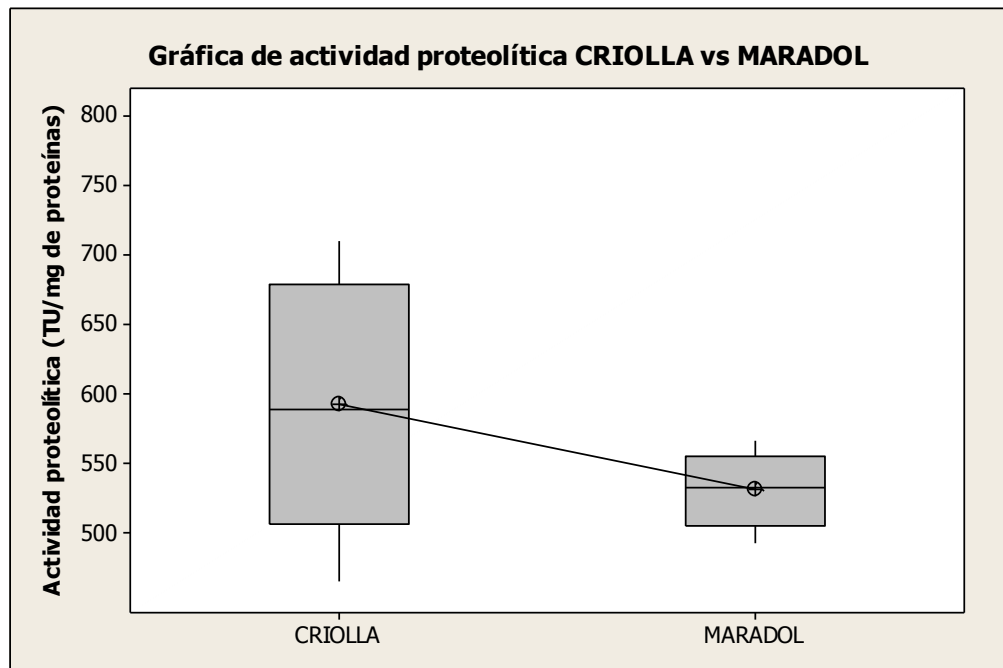


FIGURA 3. 13 Gráfica de caja. Actividad enzimática

Fuente: Minitab 16

En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos de los intervalos de confianza para actividad enzimática de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

Tabla 32

Prueba T para actividad enzimática (TU/mg de proteína)

T de una muestra: Criolla (TU/mg). Maradol (TU/mg)					
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC del 95%
Criolla (TU//mg)	5	592,5	93,6	41,9	(476,3. 708,8)
Maradol (TU/mg)	5	531,3	27,9	12,5	(496,7. 565,9)

Fuente: Minitab 16

De acuerdo a la Tabla 32, si a la media muestral de la variedad Criolla se le suma el valor del error estándar tenemos un resultado de 634.4 y si se le resta 550.6, valores que caen dentro del intervalo de confianza. Si a la media muestral de la variedad Maradol se le suma su valor del error estándar se obtiene un valor de 559.2 y si se le resta 503.4, valores que también se incluyen en su intervalo de confianza. Por lo tanto, para ambos casos se puede afirmar que los datos analizados para estimar a la media poblacional son confiables, a un nivel de significancia del 5%.

En la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de la papaina cruda de las variedades de papaya Maradol y Criolla.

Tabla 33
Características de la papaina cruda

PARÁMETRO	VARIEDAD		MÉTODO
	CRIOLLA	MARADOL	
Apariencia	Polvo fino cremoso	Polvo fino cremoso	-
Color (moda)	10 N	10 N	Munsell
Humedad (%)	8,734.± 0,261	8,374 ± 0,645	Termogravimétrico (AOAC 967.19)
Proteína (mg/ml)	1,902.± 0,3714	2,136± 0,1592	Absorción UV a 280nm
Actividad enzimática (TU/mg de proteína)	592,53 ± 93,61	531,30 ± 27,90	Método Analítico de la Unidad de Tirosina

Elaborado por: Pamela Arana – Fernanda Quijano, 2012

3.2 Validación estadística para el diseño experimental 2^k

3.2.1 Tabla de datos y resultados

En la Tabla 34 se muestran los resultados de actividad enzimática (TU/ml) obtenidos del diseño de experimentos.

Tabla 34
Actividad enzimática del diseño factorial

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	Cisteina	Benzoato de sodio	Actividad enzimática (TU/ml)
6	1	1	2	1	2	900,09
5	2	1	2	1	1	907,32
7	3	1	2	2	1	947,09
8	4	1	2	2	2	1511,73
2	5	1	1	1	2	878,40
4	6	1	1	2	2	1543,54
3	7	1	1	2	1	1095,00
1	8	1	1	1	1	802,50

Fuente: Minitab 16

Como se puede observar en la Tabla 34, existe un cambio en la actividad enzimática según la combinación de factores y niveles del experimento, pero no se conoce si ese cambio es estadísticamente significativo y si realmente existe interacción entre los factores.

3.2.2 Análisis estadístico: ANOVA

En la Tabla 35 se indica los factores analizados en el diseño de experimentos y el número de niveles.

Tabla 35
Modelo Lineal General

Modelo Lineal General: Actividad en vs. Bloques. Cisteína. Benzoato de sodio			
Factor	Tipo	Niveles	Valores
Bloques	Fijo	2	1.2
Cisteína	Fijo	2	1.2
Benzoato de sodio	Fijo	2	1.2

Fuente: Minitab 16

La tabla ANOVA (Tabla 36) particiona la variabilidad de Actividad enzimática en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

Tabla 36
Análisis de Varianza para Actividad enzimática

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cisteína	323630,	1	323630,	57,72	0,0047
B:Benzoato de sodio	146300,	1	146300,	26,09	0,0145
AB	111512,	1	111512,	19,89	0,0210
bloques	353,913	1	353,913	0,06	0,8178
Error total	16819,6	3	5606,52		
Total (corr.)	598616,	7			
S = 74,8767 R-cuad. = 97,19% R-cuad.(ajustado) = 93,44%					

Fuente: Minitab 16

Como se muestra en la Tabla 36, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Por lo tanto se puede afirmar que los aditivos usados como agentes antioxidante e inhibidor del crecimiento microbiano en sustitución del bisulfito de sodio, si tienen efecto sobre la variable de respuesta, así como la interacción de ambos factores.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica el 97,19% de la variabilidad en Actividad enzimática siendo este valor superior al 70%, se puede afirmar que el modelo es adecuado para este diseño experimental.

La Figura 3.14 muestra la gráfica para los residuos. Las cuales fueron satisfactorias y no mostraron causa de preocupación, por lo tanto se cumplen con los supuestos de normalidad del error, homogeneidad de la varianza e independencia de los datos.

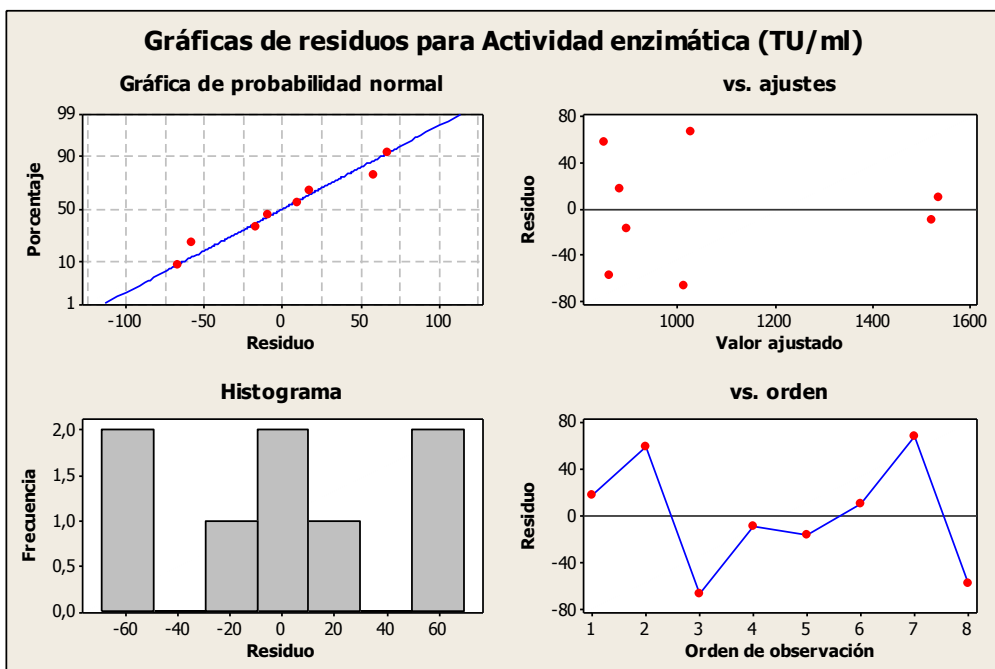


FIGURA 3. 14 Gráfica de residuos para Actividad enzimática
Fuente: Minitab 16

3.2.3 Interpretación de resultados

Mediante un diagrama de Pareto (Figura 3.15) se van a determinar cuáles son los factores significativos.

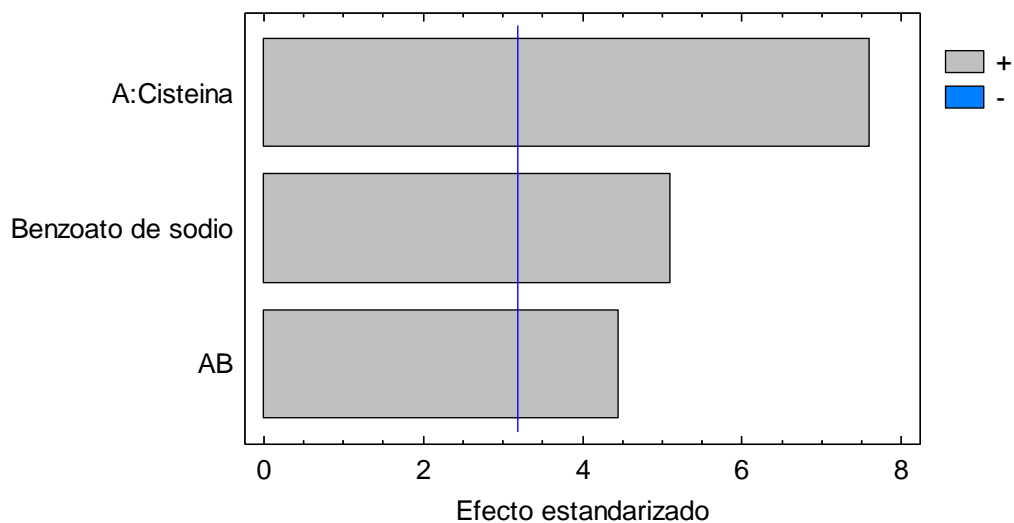


FIGURA 3. 15 Diagrama de Pareto para Actividad enzimática
Fuente: Minitab 16

El diagrama de Pareto utiliza un nivel de significancia del 5% para determinar el efecto de los factores. De manera que se observa una vez más, que los factores Cisteína, Benzoato de sodio y la interacción de ambos factores son significativos.

Mediante la Figura 3.16 se procederá a hacer un análisis de los efectos principales sobre la variable de respuesta.

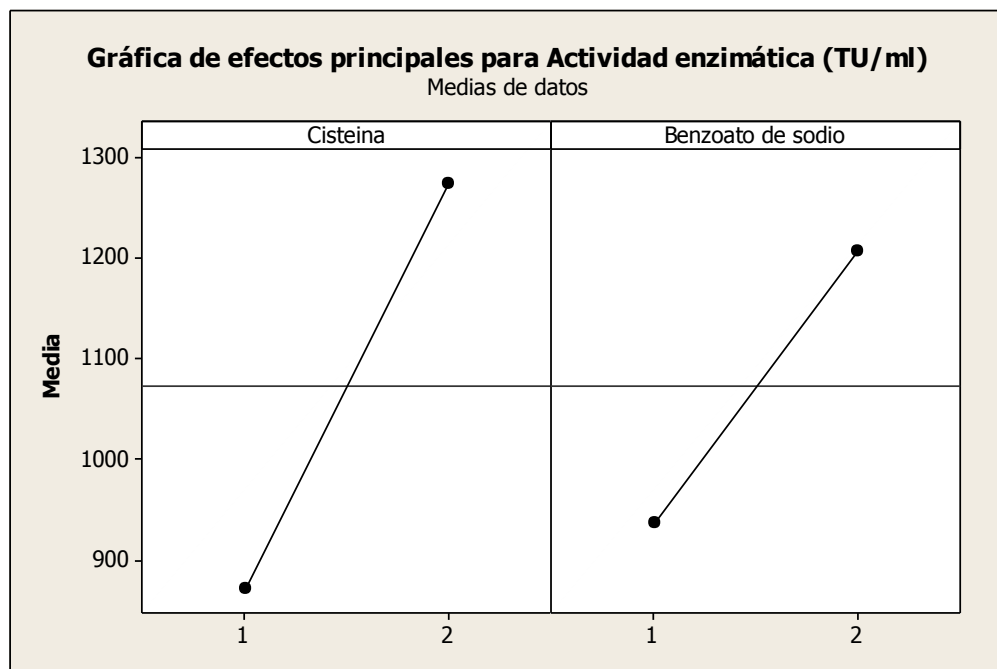


FIGURA 3. 16 Efectos principales para Actividad enzimática
Fuente: Minitab 16

Se puede observar que la concentración de cisteína tiene un efecto más grande que la concentración de benzoato de sodio usado en la experimentación, puesto que la línea que conecta las respuestas medias para los niveles de cisteína 1 y 2 tiene una pendiente más abrupta que la línea que conecta las respuestas de nivel bajo y alto del benzoato de sodio.

Esto se explica debido a que la función de la cisteína es de mantener el medio reducido impidiendo la oxidación de los grupos sulfhídricos de la enzima una de las principales causas que generan inactivación enzimática en la papaína.

La Figura 3.17 indica el efecto que tiene la interacción de los factores sobre la variable de respuesta.

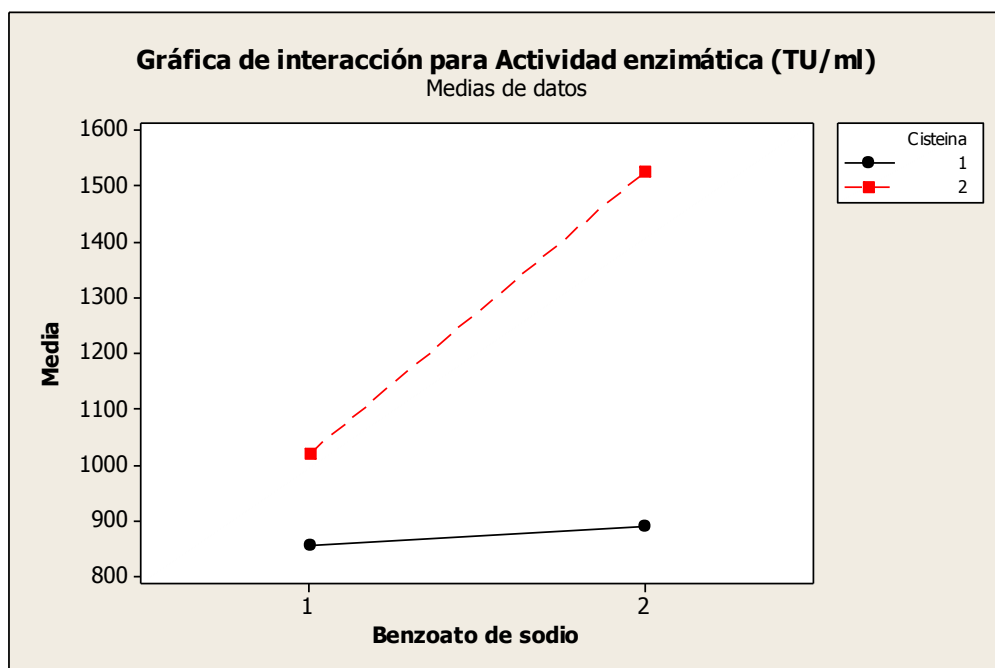


FIGURA 3. 17 Interacción de efectos para Actividad enzimática
Fuente: Minitab 16

Con la finalidad de obtener la mayor actividad enzimática, de acuerdo a la Figura 3.16 se debe usar los niveles más altos de cisteína con los niveles más altos de benzoato de sodio, es decir: 1% de cisteína y 0.5% de benzoato de sodio, concentraciones que darán una actividad enzimática de 1527,64 TU/ml \pm 22.5 que supera en un 6% la actividad obtenida usando bisulfito de sodio.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Al caracterizar el látex, en ambas variedades no hubo diferencias significativas para el contenido de materia seca, pH, acidez titulable y densidad. Mas si presentó características distintas en el contenido de sólidos solubles, teniendo el látex de la variedad Maradol 17.74 °Brix y el látex de la variedad Criolla de 14.48° Brix. Este resultado era esperado, pues la papaya de la variedad Maradol genéticamente es más dulce que la Criolla y esto puede ser comprobado con la degustación de ambas frutas.
- El rendimiento promedio de látex obtenido en las tres recolecciones entre las variedades de papaya Criolla y Maradol mostraron

diferencias significativas, siendo de $2,31 \pm 0,69$ g de látex/Kg fruta y $1,57 \pm 0,75$ g de látex/Kg fruta respectivamente, la variedad Criolla tiene un mayor rendimiento de látex que la variedad Maradol en un 47.13% aproximadamente.

- En la etapa de centrifugación, no existe diferencia significativa en el porcentaje de sobrenadante obtenido entre ambas variedades, siendo para la variedad Criolla del 63.2% y para la variedad Maradol del 64.5%. Este dato es muy importante de considerar ya que a mayor cantidad de sobrenadante mayor rendimiento de papaína cruda.
- El rendimiento de papaína cruda obtenido en la etapa de secado entre las dos variedades de papaya, no mostró diferencia significativa, siendo para la variedad Criolla de $0,071 \pm 0,005$ g de látex seco/g látex fresco y para la variedad Maradol de $0.0680 \pm 0,005$ g de látex seco/g látex fresco.
- La actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda obtenidas de la variedad Criolla y Maradol no mostraron diferencias

significativas, siendo la actividad para la variedad Criolla de $592,53 \pm 93,61$ TU/mg de proteína y para la variedad Maradol de $531,30 \pm 27,90$ TU/mg de proteína.

- En base a estos estudios realizados, se puede decir que las diferentes variedades de *Carica papaya* si tienen efecto sobre el rendimiento de látex extraído y el contenido de papaína cruda obtenida. La variedad Criolla presenta mayor rendimiento en comparación con la otra variedad. En cambio, la actividad enzimática no presenta diferencia significativa entre las dos variedades. Por lo tanto, se sugiere que la mejor materia prima para la extracción de látex a nivel comercial es la papaya de la variedad Criolla.
- El diseño factorial aplicado para analizar el efecto de los tratamientos de pre secado cisteína y benzoato de sodio, añadidos al látex en sustitución del bisulfito de sodio al momento de la recolección, demostró que si tienen efecto sobre la actividad enzimática de la papaína cruda añadidos al látex en una concentración del 1% y 0.5% respectivamente, superando en un 6% la actividad obtenida usando bisulfito de sodio.

RECOMENDACIONES

- Estudiar la microencapsulación de papaína cruda utilizando diferentes tipos de agentes encapsulantes y analizando diferentes concentraciones de la misma, que permitan conservar una alta estabilidad proteolítica y tener una estabilidad alta en el almacenamiento.
- Realizar un estudio para establecer las condiciones operativas óptimas para la obtención de papaína cruda mediante secado por aspersion considerando variables como la temperatura de entrada de la muestra, temperatura de entrada del aire, caudal de alimentación de la muestra y caudal del aire de entrada, que son condiciones que influyen en las características del producto en polvo obtenido como: humedad final del polvo, rendimiento de producto y tamaño de partícula.
- Complementar esta investigación con un estudio de factibilidad económica de producción a nivel industrial de papaína cruda.

APÉNDICE A

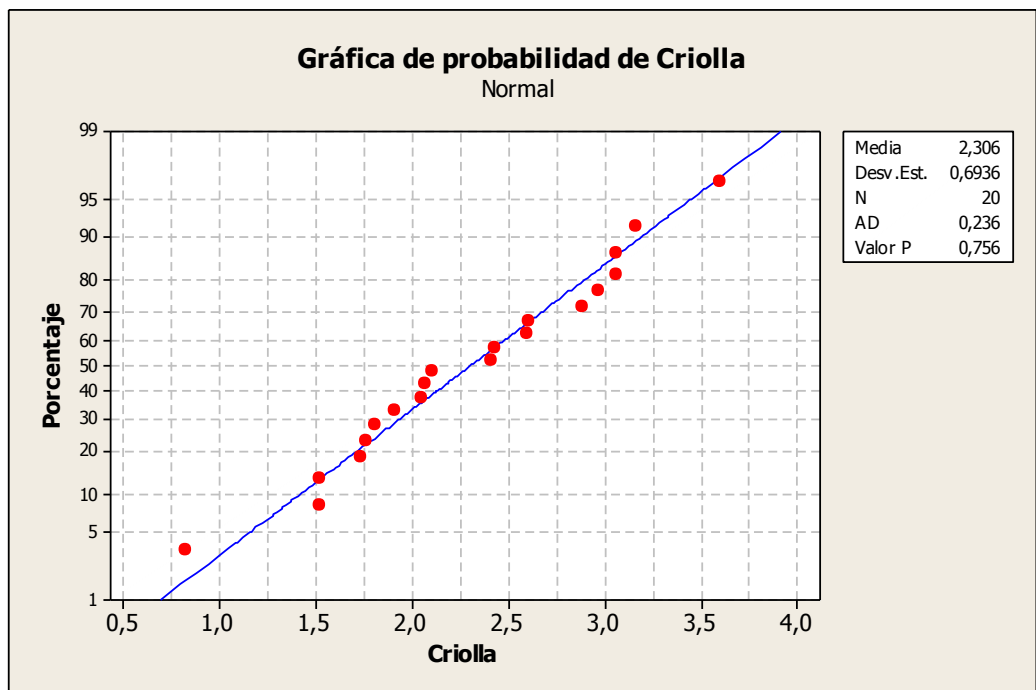
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA RENDIMIENTO

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

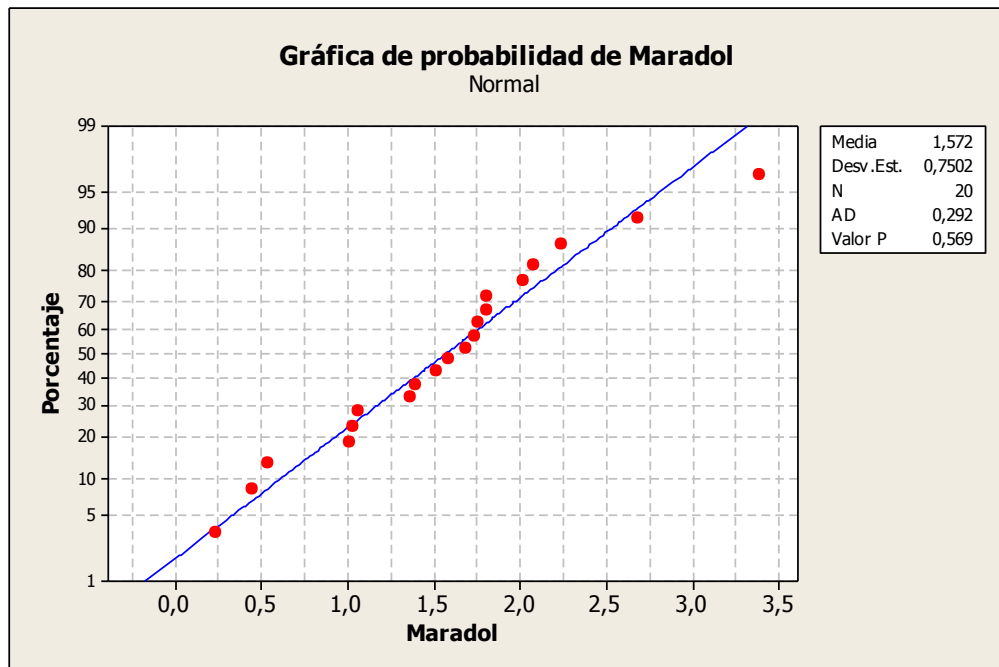
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.756) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de rendimiento de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.569) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de rendimiento de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Rendimiento vs Variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

Variedad	N	Desv.Est.	Varianza
Criolla	19	0,693583	0,4810
Maradol	20	0,750232	0,5628

Relación de desviaciones estándar = 1,330
 Relación de varianzas = 1,768

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,833. 2,134)	(0,695. 4,556)
Continuo	(0,731. 2,092)	(0,534. 4,375)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	18	19	1,77	0,736
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	37	0,84	0,869

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.736) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE B

VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA EL LÁTEX CENTRIFUGADO

Contraste de hipótesis de dos medias independientes

$$H_0: \mu_C = \mu_M$$

$$H_1: \mu_C \neq \mu_M$$

T de dos muestras para Criolla vs. Maradol				
Variedad	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Criolla	5	63,19	3,93	1,8
Maradol	4	64,53	3,23	1,6
Diferencia = μ (Criolla) - μ (Maradol)				
Estimado de la diferencia: -1,34				
IC de 95% para la diferencia: (-7,13. 4,44)				
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -0,55				
Valor P = 0,600 GL = 7				
Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 3,6458				

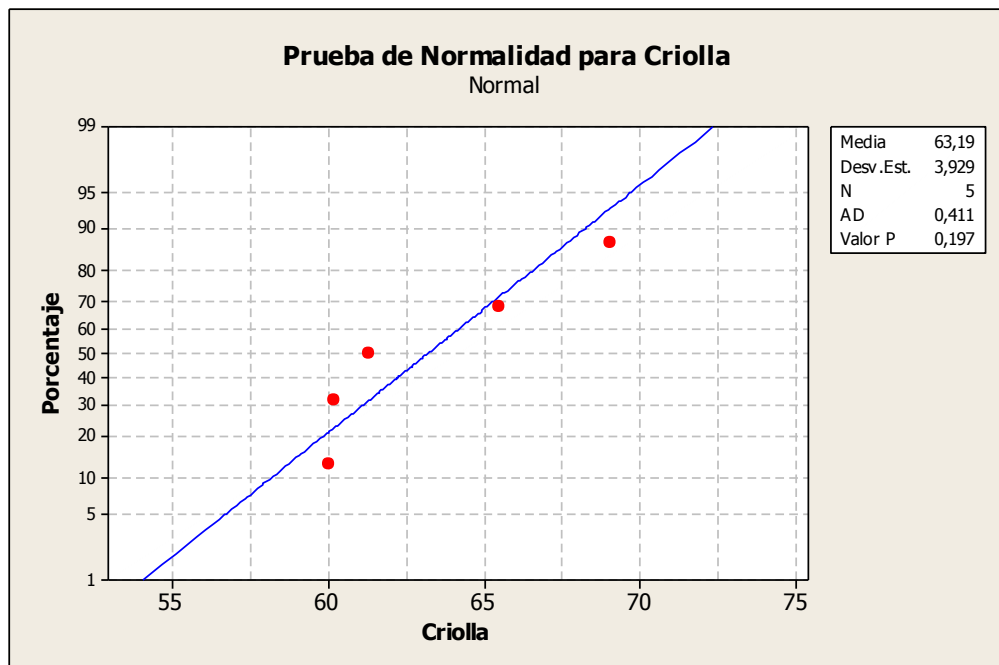
Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.600) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto no existe diferencia significativa en el porcentaje de sobrenadante de las muestras, con un 95% de nivel de confianza.

Supuestos de la prueba

- Varianza poblacional desconocida
- Independencia de los datos
- Normalidad de los datos

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

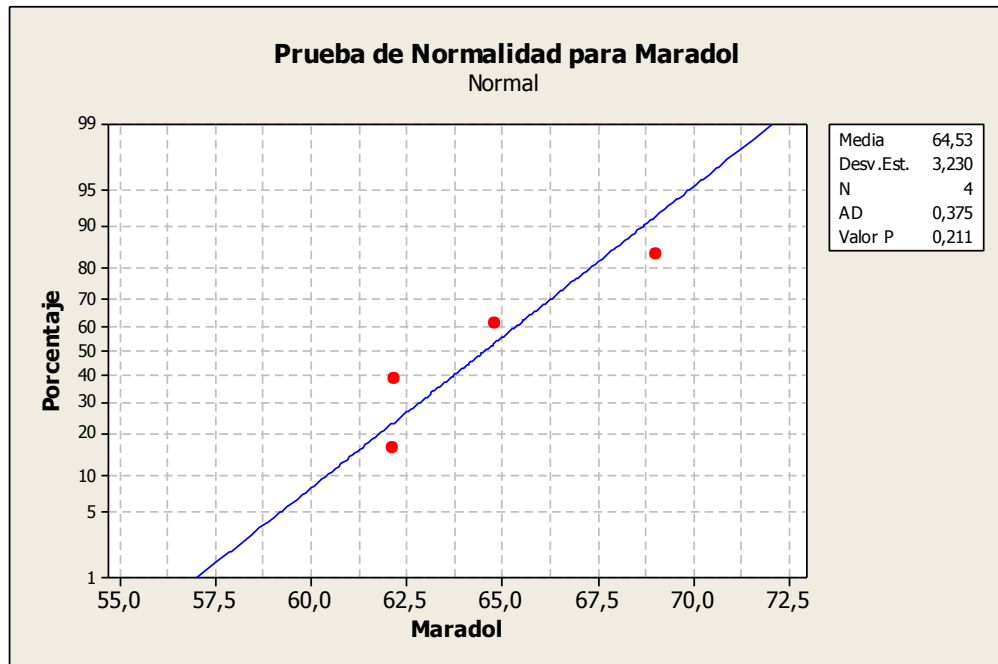
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.197) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de porcentaje de sobrenadante de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.211) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de porcentaje de sobrenadante de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Criolla. Maradol

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

Variable	N	Desv.Est.	Varianza
Criolla	5	3,929	15,436
Maradol	4	3,230	10,433

Relación de desviaciones estándar = 1,216
 Relación de varianzas = 1,479
 Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,313. 3,842)	(0,098. 14,764)
Continuo	(*. 14,346)	(*. 205,795)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	4	3	1,48	0,779
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	7	0,07	0,802

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.779) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE C

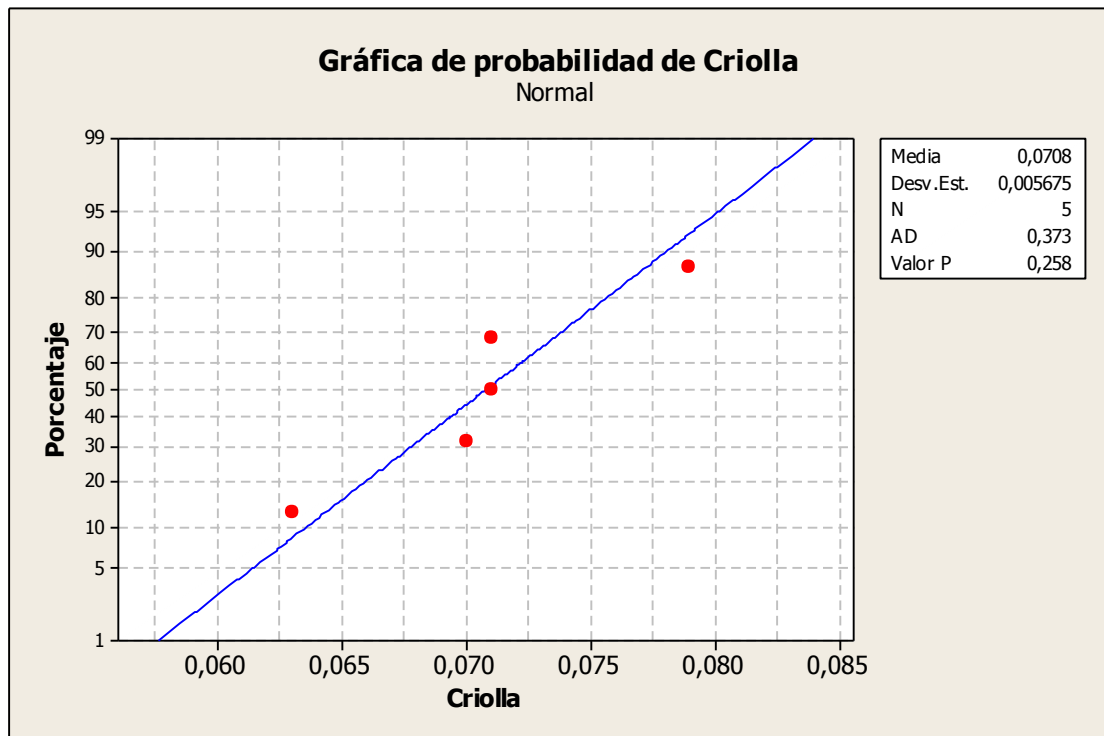
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA RENDIMIENTO EN ETAPA DE SECADO DEL LÁTEX

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

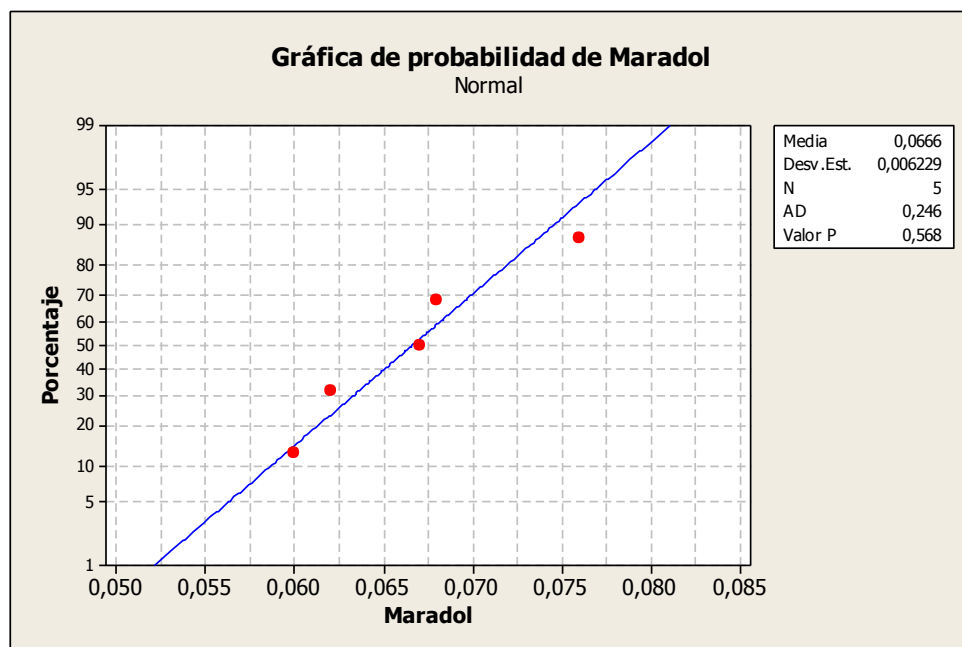
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.258) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de rendimiento en la etapa de secado del látex de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_i: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.568) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de

rendimiento en la etapa de secado del látex de la variable Criolla siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Rendimiento secado vs Variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{criolla}) / \text{Sigma}(\text{maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{criolla}) / \text{Sigma}(\text{maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

variedad	N	Desv.Est.	Varianza
criolla	5	0,006	0,000
maradol	5	0,006	0,000

Relación de desviaciones estándar = 0,911
 Relación de varianzas = 0,830

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,294. 0,823)	(0,086. 7,971)
Continuo	(* . 8,505)	(* . 72,338)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	4	4	0,83	0,861
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	8	0,15	0,706

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.861) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE D

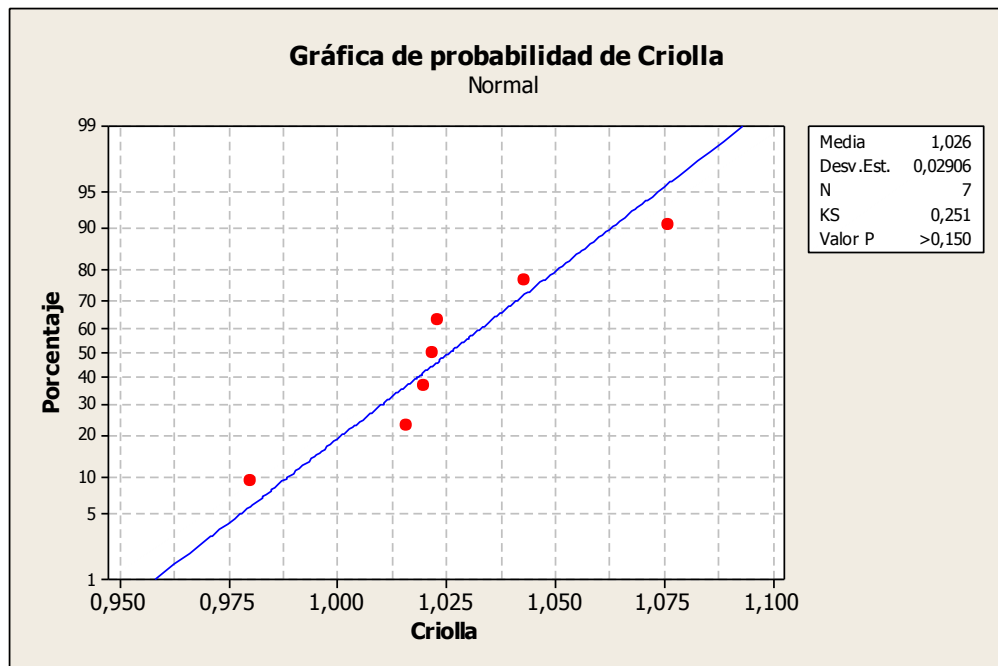
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA DENSIDAD

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

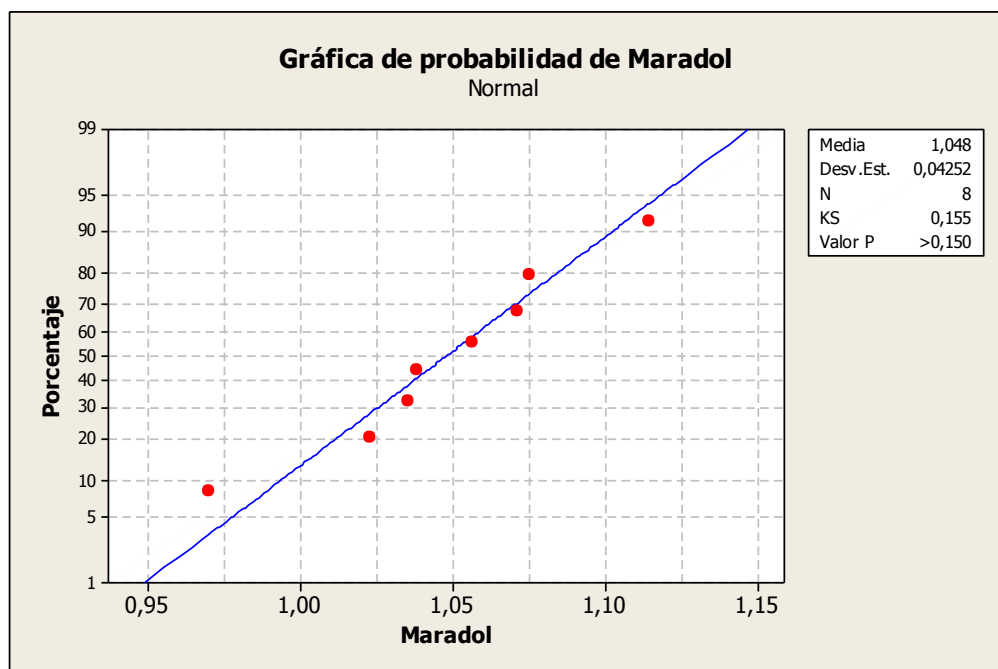
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de densidad de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_i: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de densidad de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Densidad (g/ml) vs Variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

Variedad	N	Desv.Est.	Varianza
Criolla	7	0,029	0,001
Maradol	8	0,043	0,002

Relación de desviaciones estándar = 0,683
 Relación de varianzas = 0,467

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,302. 1,631)	(0,091. 2,660)
Continuo	(0,041. 2,163)	(0,002. 4,677)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	6	7	0,47	0,372
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	13	1,10	0,313

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.372) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE E

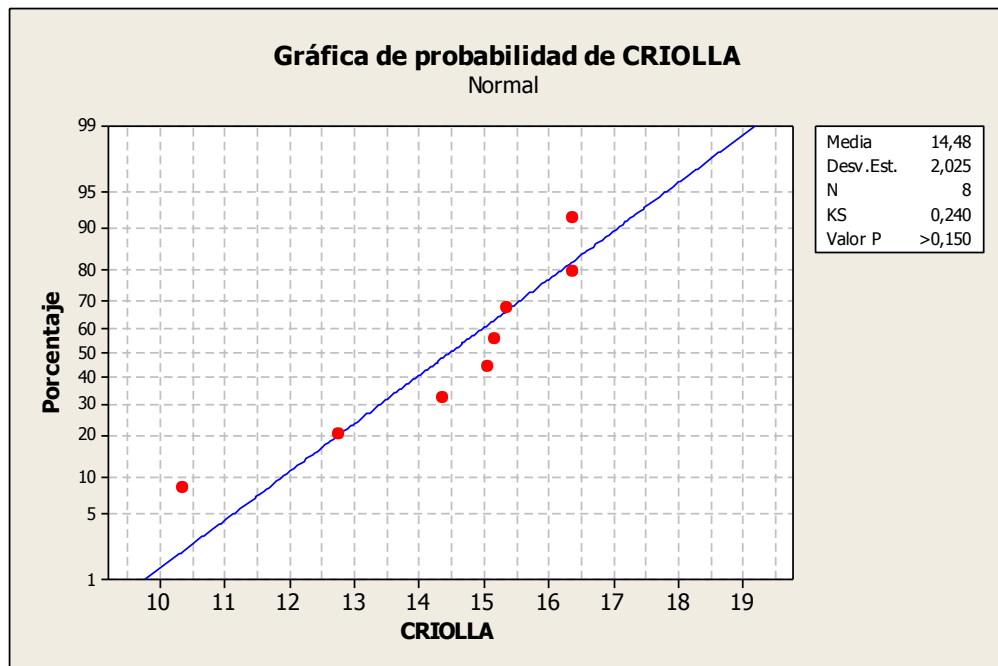
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA °BRIX

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

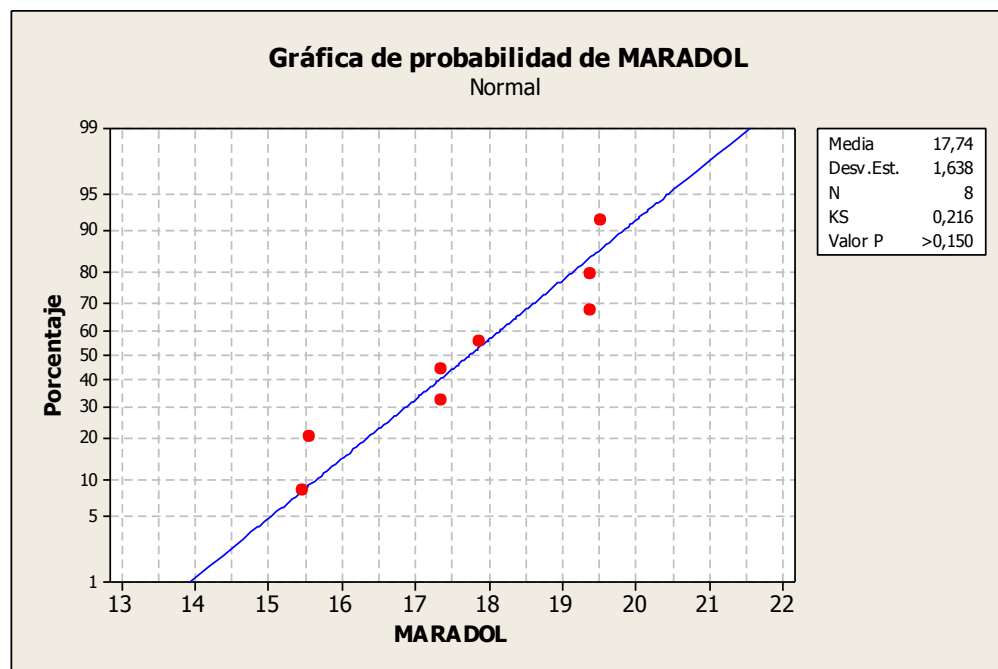
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de °Brix de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_i: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de °Brix de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: °Brix vs Variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

Variedad	N	Desv.Est.	Varianza
Criolla	8	2,025	4,101
Maradol	8	1,638	2,682

Relación de desviaciones estándar = 1,237
 Relación de varianzas = 1,529

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,553. 2,764)	(0,306. 7,637)
Continuo	(0,104. 2,686)	(0,011. 7,213)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	7	7	1,53	0,589
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	14	0,00	0,951

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.589) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE F

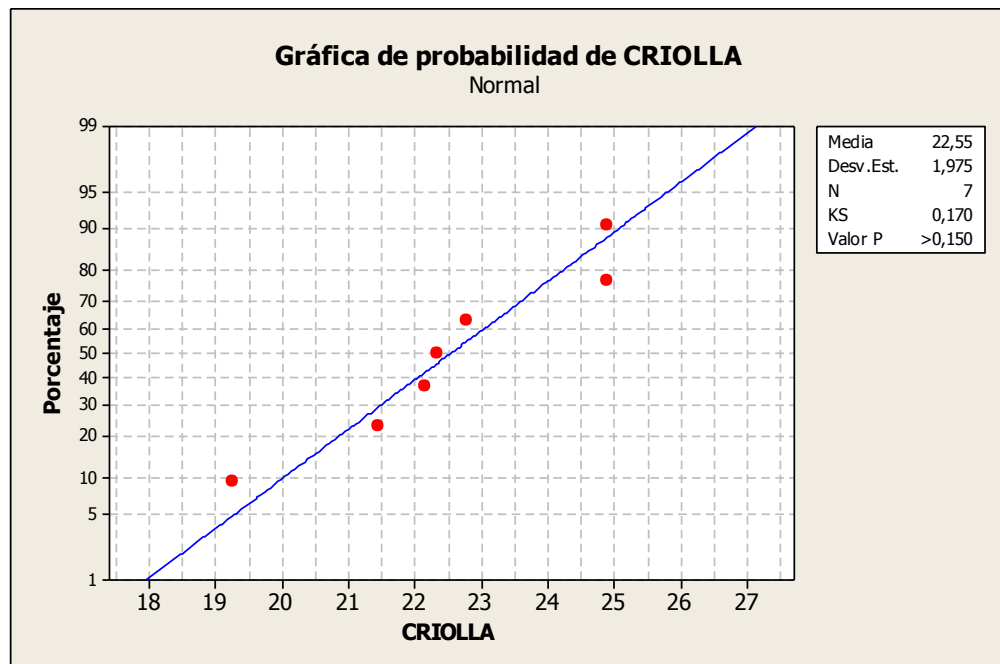
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA % MATERIA SECA

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

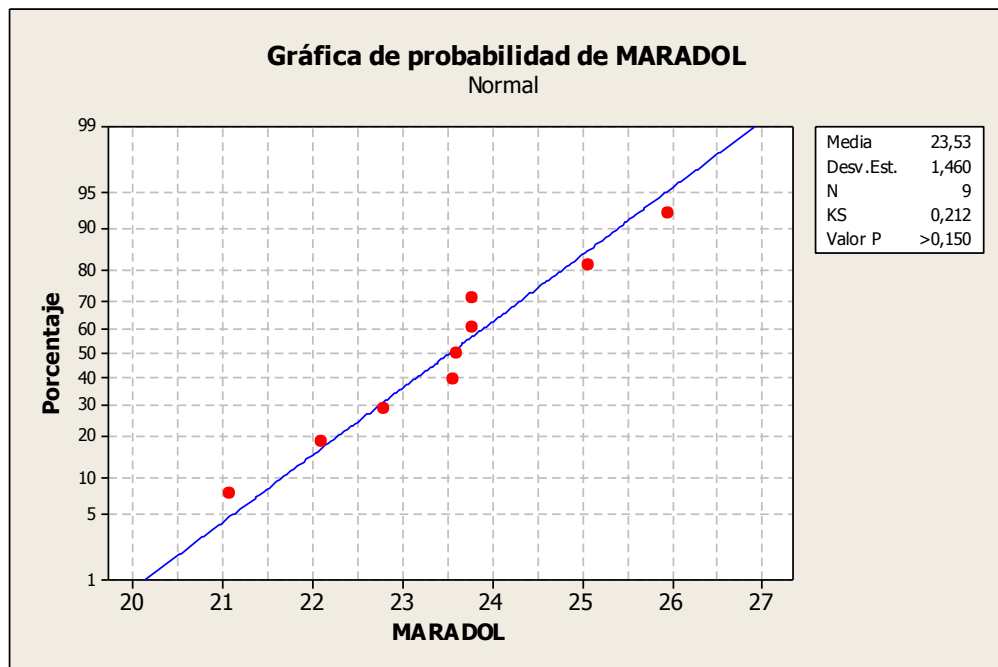
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de % de Materia Seca de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_i: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P > 0.150) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de % de Materia Seca de la variable Maradol siguen una distribución normal

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: MATERIA SECA vs VARIEDAD

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{CRIOLLA}) / \text{Sigma}(\text{MARADOL}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{CRIOLLA}) / \text{Sigma}(\text{MARADOL}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

VARIEDAD	N	Desv.Est.	Varianza
CRIOLLA	7	1,975	3,902
MARADOL	9	1,460	2,132

Relación de desviaciones estándar = 1,353
 Relación de varianzas = 1,830

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,627. 3,201)	(0,393. 10,247)
Continuo	(0,410. 7,861)	(0,168. 61,797)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	6	8	1,83	0,420
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	14	0,45	0,512

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.420) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE G

COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA MANN-WHITNEY PARA

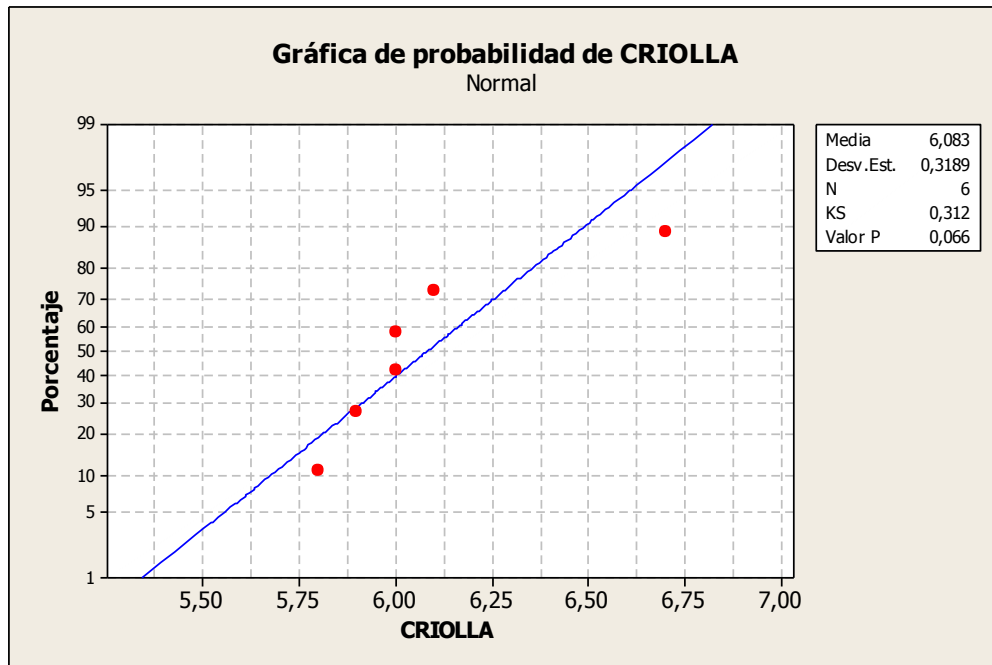
pH

Supuestos de la prueba.

- Independencia de los datos.
- Distribución no normal

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

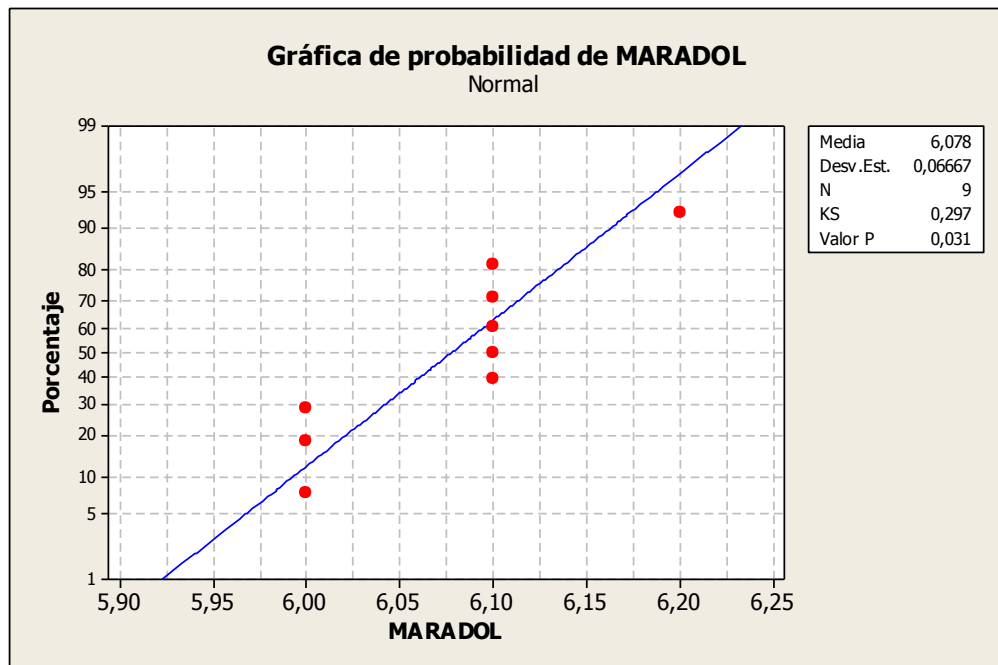
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.066) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de pH de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P menor a 0.05 (valor-P = 0.031) existe evidencia estadística suficiente para rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de pH de la variable Maradol no siguen una distribución normal.

APÉNDICE H

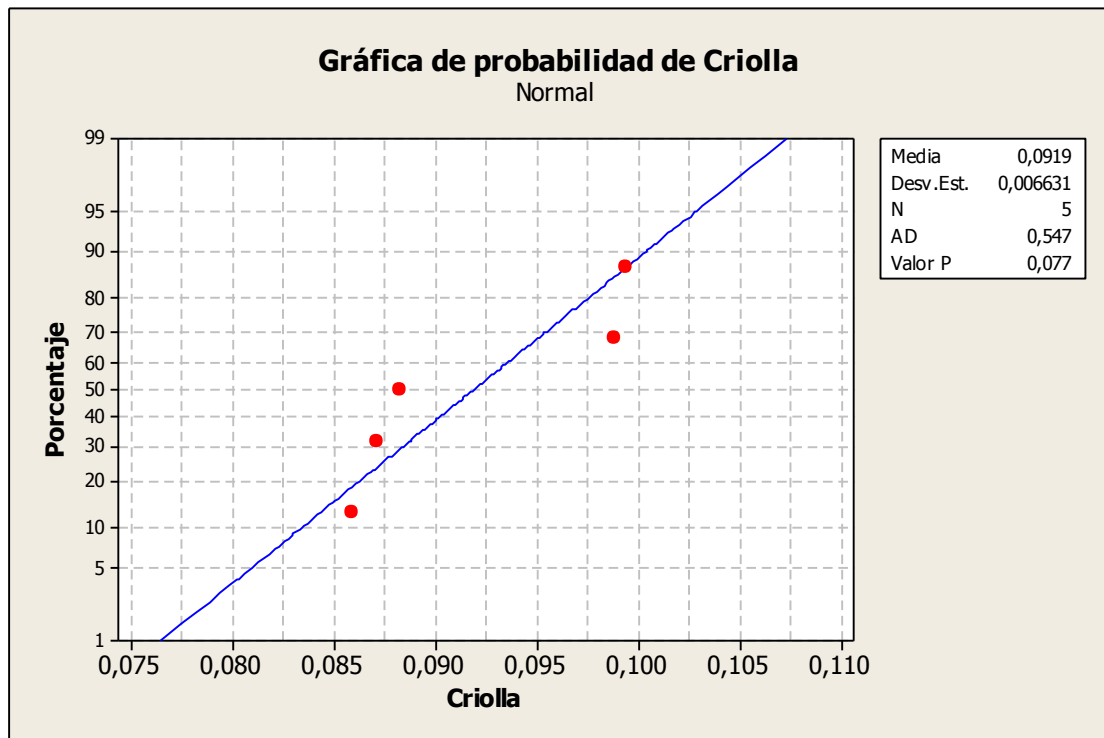
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA ACIDEZ TITULABE (%ÁCIDO CÍTRICO)

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

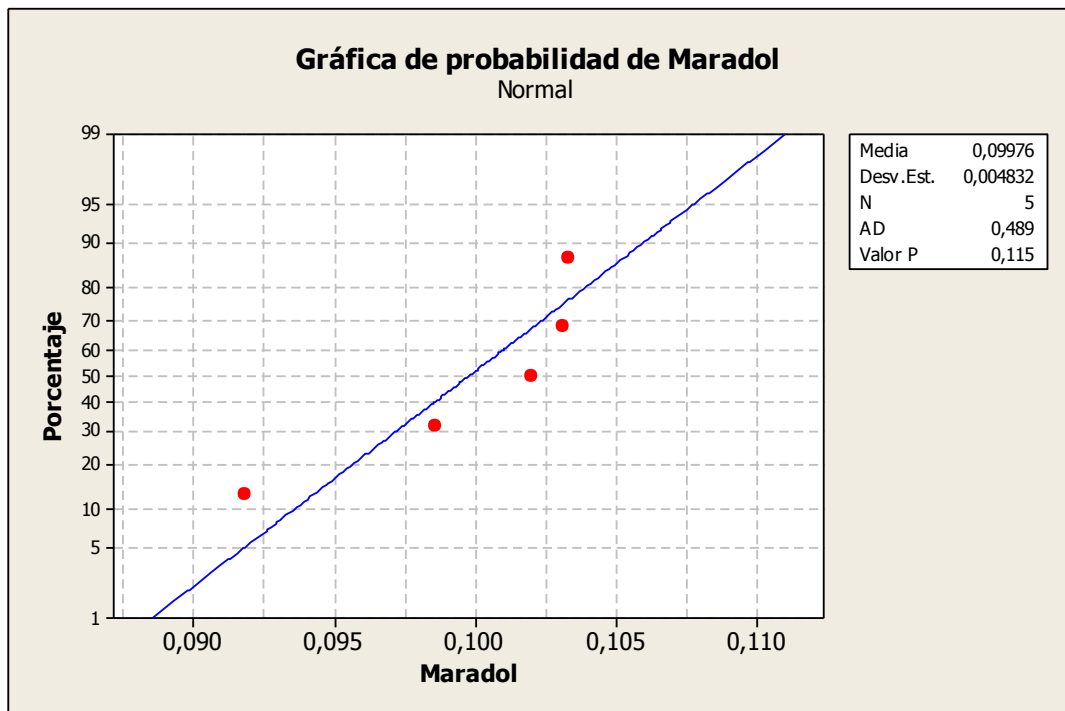
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.077) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de Acidez titulable de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_i: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.115) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_i , por lo tanto los datos de Acidez titulable de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Acidez titulable vs variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{criolla}) / \text{Sigma}(\text{maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{criolla}) / \text{Sigma}(\text{maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia $\text{Alfa} = 0,05$

Estadísticas

variedad	N	Desv.Est.	Varianza
criolla	5	0,0066306	0,00004
maradol	5	0,0048325	0,00002

Relación de desviaciones estándar = 2,547
 Relación de varianzas = 6,485

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,822. 7,892)	(0,675. 62,289)
Continuo	(0,031. 41,769)	(0,001. 1744,634)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	4	4	6,49	0,555
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	8	1,71	0,558

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.555) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE I

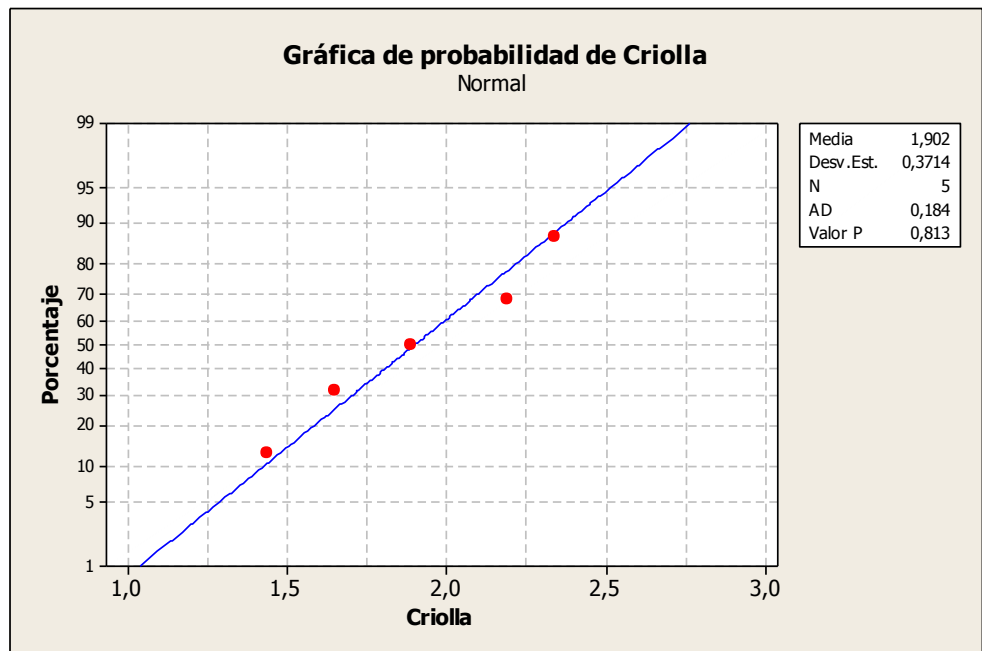
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (mg/ml)

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

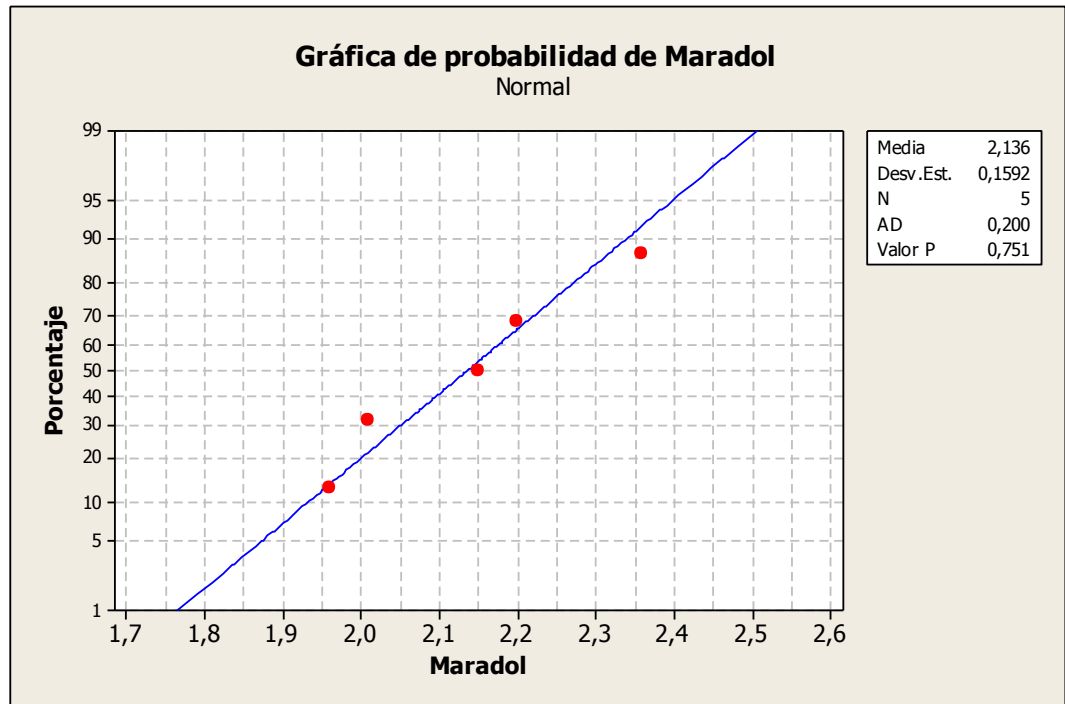
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.813) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de concentración de proteína de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.751) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de concentración de proteína de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Concentración proteínas vs variedad

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma}(\text{Criolla}) / \text{Sigma}(\text{Maradol}) \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia Alfa = 0,05

Estadísticas

Variable	N	Desv.Est.	Varianza
Criolla	5	0,371	0,138
Maradol	5	0,159	0,025

Relación de desviaciones estándar = 2,334
 Relación de varianzas = 5,447

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(0,753. 7,233)	(0,567. 52,315)
Continuo	(0,721. 12,262)	(0,520. 150,369)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	4	4	5,45	0,129
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	8	3,39	0,103

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.129) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto la varianza de los datos son iguales.

APÉNDICE J

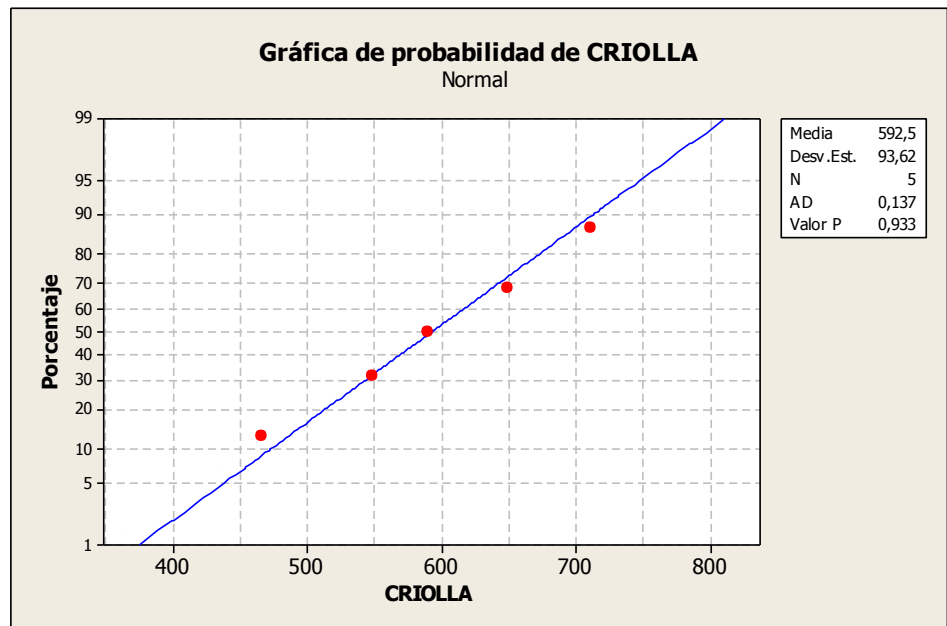
COMPROBACIÓN DE SUPUESTOS DE LA PRUEBA TWO SAMPLE T PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (TU/mg proteína)

Supuestos de la prueba.

- Varianza poblacional desconocida.
- Independencia de los datos.
- Normalidad de los datos.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

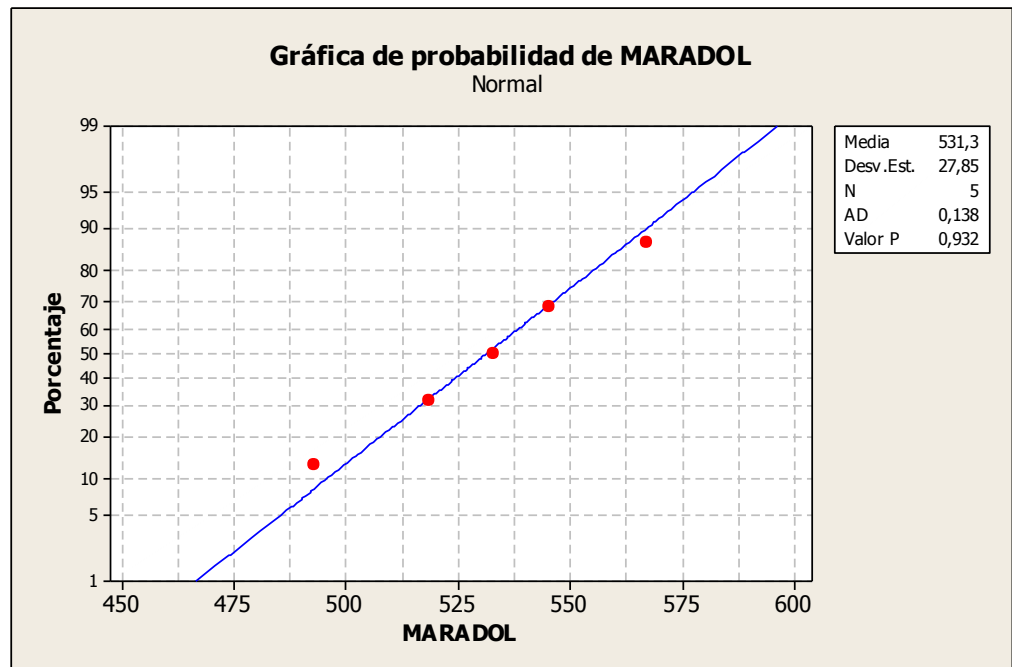
$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.933) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de actividad enzimática de la variable Criolla siguen una distribución normal.

$$H_0: f(x) = N(\mu, \sigma^2)$$

$$H_1: \neg H_0$$



Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.932) existe evidencia estadística suficiente para no rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto los datos de actividad enzimática de la variable Maradol siguen una distribución normal.

- Varianzas iguales:

Prueba e IC para dos varianzas: Actividad enzimática vs variedad

Método

Método

Hipótesis nula $\text{Sigma (CRIOLLA)} / \text{Sigma (MARADOL)} = 1$
 Hipótesis alterna $\text{Sigma (CRIOLLA)} / \text{Sigma (MARADOL)} \text{ not} = 1$
 Nivel de significancia Alfa = 0,05

Estadísticas

Variable	N	Desv.Est.	Varianza
CRIOLLA	5	93,615	8763,784
MARADOL	5	27,852	775,744

Relación de desviaciones estándar = 3,361
 Relación de varianzas = 11,297

Intervalos de confianza de 95%

Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.	IC para relación de varianza
Normal	(1,085. 10,417)	(1,176. 108,505)
Continuo	(0,649. 23,235)	(0,421. 539,881)

Pruebas

Método	GL1	GL2	Estadística de prueba	Valor P
Prueba F (normal)	4	4	11,30	0,038
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	8	3,85	0,085

Con un valor-P mayor a 0.05 (valor-P = 0.038) existe evidencia estadística suficiente para rechazar H_0 a favor de H_1 , por lo tanto la varianza de los datos no son iguales.

ANEXO A

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA



Enzyme Development Corporation
(212) 736-1580

21 Penn Plaza, New York, NY 10001
E-mail: info@EnzymeDevelopment.com

MÉTODO ANALÍTICO DE LA UNIDAD DE TIROSINA (TU)

COPIA NO CONTROLADA

A. Principio: Las enzimas proteolíticas hidrolizan un sustrato proteico formando varios productos de degradación tales como los aminoácidos. Usando caseína como sustrato uno de los aminoácidos formados tras la hidrólisis es la L-tirosina. La L-tirosina absorbe fuertemente a 280 nm y la concentración de la tirosina es una función de densidad óptica que sigue la Ley de Beer.

B. Equipo:

1. Potenciómetro
2. Baño de agua a temperatura constante a $40.0^{\circ} \pm 0.1^{\circ} \text{C}$
3. Balanza analítica
4. Espectrofotómetro a 280 nm
5. Matraces aforados
6. Pipetas aforadas
7. Embudo de pistilo largo
8. Tubos de 25 ml con tapa de rosca
9. Tubos de ensayo desechables
10. Cronómetro
11. Papel filtro Whatman #1
12. Micropipetas

C. Medidas de seguridad:

1. Siga las medidas de seguridad estándar del laboratorio.
2. Ácido tricloroacético: Use guantes para evitar quemaduras.

D. Reactivos y preparación de reactivos: El sustrato, búfer y reactivo de terminación deben ser preparados diariamente. (Los volúmenes pueden ajustarse según sea necesario).

1. Sustrato de caseína:

- a. Coloque un vaso de precipitado de 2000 a 4000 ml en una placa caliente que tenga agitación.
- b. Añada agua y ponga a hervir.

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

- c. En un matraz aforado de 250 ml disuelva y diluya 1.775 g de fosfato disódico anhídrido en agua destilada.
- d. En un vaso de precipitado de 400 ml. Agregue 2.5 g de caseína Calbiochem (o el peso seco que se haya encontrado usando el procedimiento para pérdidas por secado de acuerdo con las determinaciones de humedad para cada lote de reactivo) en 125 ml de la solución de fosfato disódico previamente preparada. Use una barra agitadora y un mezclador.
- e. Cubra la solución con papel aluminio.
- f. Coloque el sustrato de caseína en un baño de agua hirviendo y agítelo de manera constante por 30 minutos. Asegúrese que el agua no alcance el borde del vaso. Coloque el vaso con la caseína junto con otro vaso lleno de agua para minimizar el movimiento causado por la ebullición.
- g. Quite el vaso de precipitado del agua hirviendo y enfríe a temperatura ambiente en un baño de agua fría con agitación constante.
- h. En un matraz aforado disuelva 1.05 g de ácido cítrico monohidratado en agua destilada y diluya a 100 ml.
- i. Ajuste el pH de la solución de caseína (el pH original debe ser cerca de 7.2) a 6.0 con la solución de ácido cítrico, agregándolo lentamente para evitar la destrucción de las proteínas (use aproximadamente 35 ml de ácido).
- j. Transfiera la caseína a un matraz aforado de 250 ml y diluya en agua destilada.

2. Solución búfer de Cisteína-Versene – Dependiendo del número de muestras y las diluciones necesarias se requerirán de entre 2 a 4 L de este búfer. Para preparar 2 litros:

- a. Coloque en un agitador magnético un vaso de precipitado de 2000 ml o más.
- b. Añada aproximadamente 1600 -1700 ml de agua destilada.
- c. Agregue cuantitativamente:
 - 14.20 g de fosfato de sodio dibásico anhídrido
 - 12.20 g de L-cisteína
 - 28.00 g de EDTA
- d. Agite todos los ingredientes hasta disolverlos.
- e. Ajuste el pH del búfer (el pH original es de 5.7) a 6.0 con NaOH 1N (utilizará aproximadamente 20 ml).
- f. Transfiera el búfer a un matraz aforado de 2000 ml y diluya en agua destilada.
- g. Repita el procedimiento anterior si necesita más búfer.

3. Solución de terminación (TCA): Ácido tricloroacético (30%) – Se requieren 18 ml para cada muestra.

- a. Disuelva 30 g de ácido tricloroacético en agua destilada y transfiera a un matraz aforado de 100 ml. Diluya en más agua.

E. Procedimiento

1. Preparación de la enzima:

- a. Disuelva una cantidad apropiada de la enzima en la solución búfer de Cisteína-Versene. Use el mismo búfer si requiere diluciones seriadas. La enzima diluida

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

debe ser usada en un lapso de 30 minutos. La concentración de la dilución final deberá corresponder a una absorbancia de aproximadamente 0.2600 y a una concentración de entre 2.5 y 6.5 TU/ml.

b. Cálculo para la preparación de la enzima:

$$\text{peso de la muestra en gramos} = \frac{0.2600 \times (\text{curva de tirosina})}{\text{TU/g (Objetivo)}}$$

2. Evaluación de la enzima: Cada juego de pruebas consiste de 2 pruebas de enzimas y un blanco. Proceda de la siguiente forma:
 - a. Transfiera 10.0 ml del sustrato de caseína en 3 tubos de 25 ml etiquetados, dos para cada enzima y uno para el blanco.
 - b. Equilibre los tubos a 40° C por aproximadamente 10 minutos.
 - c. Al tiempo cero inicie el cronómetro y añada 4.0 ml de la solución de la enzima al primer tubo. Cierre el tubo e invierta suavemente varias veces. Ponga el tubo en un baño de agua a 40° C. Continúe la adición de la enzima a cada tubo, excepto al blanco, a intervalos suficientes (se recomienda 1 minuto).
 - d. Después de exactamente 60 minutos añada rápidamente a cada tubo con la preparación de la enzima 6.0 ml de la solución TCA. Agite vigorosamente y regrese los tubos al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
 - e. Para preparar el blanco añada 6.0 ml de solución TCA al sustrato de caseína seguido por 4.0 ml de enzima. Agite vigorosamente y regrese el tubo al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
 - f. Al final de los 30 minutos remueva cada tubo del baño de agua y permita que se enfríen a temperatura ambiente.
 - g. Una vez fríos filtre a través de papel filtro Whatman #1 (los tubos pueden ser agitados antes de filtrarlos para despegar la proteína precipitada). Filtre de nuevo a través del mismo papel filtro.
 - h. Lea la absorbancia de los filtrados en una cuveta de 1 cm a 280 nm usando aire para iniciar el espectrofotómetro en cero. Corrija el valor de A_{280} de cada enzima sustrayendo la lectura del blanco de cada muestra.
3. La curva de tirosina (hecha aproximadamente cada 3 meses)
 - a. Disuelva 100 mg de L-tirosina en ácido clorhídrico 0.10 N (HCL) y diluya a 1 L en un matraz aforado.
 - b. Prepare las siguientes soluciones usando HCl 0.10N como diluyente:

Concentración Final	Dilución de la Solución Madre de Tirosina
25.0µg/ml	25ml/100ml
50.0µg/ml	50ml/100ml
75.0µg/ml	75ml/100ml

- c. Determine espectrofotométricamente a 280 nm en una cuveta de 1cm la absorbancia de las soluciones de tirosina a 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0 µg de tirosina

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

- por ml. Use HCl 0.1N para iniciar el instrumento en cero.
- d. Grafique la absorbancia contra la concentración de tirosina.
- e. Determine la pendiente en términos de absorbancia por μg de tirosina (la pendiente debe caer entre 0.0064 y 0.0076).

F. Cálculos:

- Definición de unidad: Una unidad de potencia puede ser definida como la unidad que al actuar sobre el sustrato de caseína bajo las condiciones específicas produce un microgramo de tirosina por minuto.
- El número de TU/g en una mezcla de digestión o contenida en la cantidad preparada de enzima se calcula como:

$$\text{O.D.} \times \text{D.F.} / 4 \times 20 / 60 \times 1 / \text{pendiente} = \text{TU/g}$$

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

Para facilitar el cálculo, un factor (cálculo en negrillas en la fórmula anterior) puede ser calculado incorporando volúmenes constantes y la pendiente puede ser obtenida de la curva de tirosina (ver la curva de tirosina).

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

Por lo tanto: Actividad TU = $\frac{\text{A}_{280} \text{ del filtrado} \times \text{factor de la curva de tirosina}}{\text{Concentración de la enzima (g/ml)}}$

Ejemplo: O.D. = 0.2600
 Factor = 13.0
 Concentración final = 0.00003600 (1/Factor de dilución)
 $\text{TU} = 0.2600 \times 13.0 / 0.00003600 = 94,000 \text{ TU/G}$

G. Exactitud de los parámetros de prueba:

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

H. Referencia:

- A.S.B.C. PROCEEDINGS p. 225-228, Some Physical and Chemical Properties of Commercial Chillproofing Compounds, Harold E. Weissler and Adan C. Garza.

COPLA NO CONTROLADA

Estas sugerencias y datos están basados en información que consideramos confiable. Son ofrecidas de buena fe, pero sin garantía debido a que las condiciones y métodos de uso de nuestros productos están más allá de nuestro control. Las sugerencias de uso de nuestros productos no deben ser entendidas como recomendaciones que incurran en la violación de cualquier patente o regulación gubernamental.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].TORRES R. Fruticultura Tropical, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Ibagué, Colombia. 1985. Pág. 295-299.
- [2].Cultivo de lechosa, Fundación de Desarrollo Agropecuario, Guía técnica No14, Segunda Edición. Santo Domingo, República Dominicana. 1998. Pág. 4, 6, 10,14.
- [3].RODRIGUES SILAS, DA CUNHA M., VENTURA J., FERNANDES P. "Effects of the *Papaya melira virus* on papaya latex structure and composition". Plant Cell Rep. 2009. Pág. 28:861-871.
- [4].EL MOUSSAOUI A., NIJS M.,PUL C., WINTJENS R., VINVETELLI J., AZARKAN M., LOOZE Y. "Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant

defense mechanism". Cellular and Molecular Life Sciences. 2001. Pág.58: 556-570.

[5].VERHEIJ E., CORONEL R. "Edible fruits and nuts". Plant Resources of South East Asia" No 2. Backhuys Publishers. Leiden. 1992. Pág. 108-112.

[6].Propiedades funcionales de la papaya [en línea]. <http://www.lapapaya.info/cat/la-papaya/1>. Mayo, 2011.

[7]. USDA, [en línea]. <http://www.usda.gov>.

[8].El Comercio, "3 variedades de papaya se consumen" [en línea]. <http://www.elcomercio.com/agromar/.html>.Enero, 2011.

[9].AVILÁN L., LEAL F., BATISTA D. Manual de Fruticultura, Tomo 1. Segunda edición. Editorial América. C.A. Venezuela. 1992. Pág. 581-656.

[10].MARÍN S., GOMEZ J., SALGADO J., MARTINS D., FULLINE A. "Recomendacoes para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espiritu Santo". Vitória, EMCAPA. 1995. Pág. 16-17, 45-45, 57.

- [11].FONSECA MARCOS, ROCHA NILTON, CENCI SÉRGIO.
“Comparación entre las papayas “Sunrise Solo” y “Golden” durante siete estados de madurez”. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha Vol 5(2). Rio de Janeiro, Brasil. 2003. Pág. 86 - 91.
- [12].RODRÍGUEZ RIVERA ADOLFO, RODRÍGUEZ NODALS A., RICARDO CORRALES S. “La Frutabomba Maradol”, 1ra. Conferencia Nacional Fruticultores. La Habana, Cuba. 1966.
- [13].Tecnología para la producción de semillas de Fruta bomba. Ministerio de la agricultura, Empresa de Producción de Semillas Varias. La Habana, Cuba. 1996.
- [14].ARANGO, LAURA. El cultivo de la papaya en los llanos orientales de Colombia. Lito process. Villavicencio, Colombia. 1999. Pág. 19-20.
- [15].MORCELLE S., CAFFINI N., PRIOLO N. “Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex”. Fitoterapia. 2004. Pág.75: 480-493
- [16].HUANG J., MCAUSLANE H., NUSSLY G. “Resistance in lettuce to *Diabrotica balteata* (Coleoptera:Chrysomelidae): the roles of latex and inducible defense”. Environmental Entomology. 2003. Pág.32: 9-16.

- [17].GÓMEZ, C. "Identificación de la actividad proteolítica en especies vegetales comunes presentes en las provincias de Loja y Pastaza" (Proyecto de Graduación, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, 2008).
- [18].CHAVERRI, ALEJANDRA. "Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos" (Tesis presentada para optar el grado de Licenciada en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 1986).
- [19].LIGGIERI C., ARRIBÉRE C., TREJO S., CANALS F., AVILÉS & PRIOLO N. "Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L.". The Protein Journal. 2004. Pág.23:403-411.
- [20].DUBEY V., PANDE M., SINGH B., JAGANNADHAM M. "Papain-like proteases: Applications of their inhibitors". Afr. J. Biotechnol. 2007. Pág.6: 1077-1086
- [21].WIEDERANDERS BERND. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propetides. Acta Biochimica Polonica. Vol. 50. Jena, Germany. 2003.

[22].SINCHE, MARCO. “Aislamiento, Purificación Parcial y Caracterización Cinética de las Proteasas presentes en el Látex de los Frutos de una Planta del Género *Vasconcella*”. (Tesis, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, 2009).

[23].ALARCÓN, KARINA. “Estudios de separación de las proteasas del cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A. DC.) (Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, México, 2009).

[24].Sigma – Aldrich, Co, “Papain,” [en línea].<http://www.sigmaaldrich.com.html>.Abril, 2012.

[25].Worthington Biochemical Corporation, “Papain, I.U.B.: 3.4.22.2”, [en línea].<http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>. Abril, 2012.

[26].MARTINDALE W. The Extra Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press. Ed. By Reynolds, J.E.F. 31th Edition. London, England. 1996.

[27].BUTTLE DAVID, BARRETT ALAN. Chymopapain: Chromatographic purification and immunological characterization. Biochemical Journal, Volume 223. Gran Bretaña. 1984. Pág.81.

- [28]. MAES D., BOUCKAERTS J., POORTMANS F., WYNS L., LOOZE Y.
Biochemistry, Vol.35. 1996.
- [29]. KAARSHOLM M., SHACK P. Characterization of papaya peptidase A as
an enzyme of extreme basicity. Publicación de U.S National Institutes of
Health. 2005.
- [30]. CAHUEQUE, ROBERTO. “Evaluación de dos agentes coagulantes para
látex natural, en la fabricación por inmersión de guante tipo doméstico”
(Tesis para la obtención de Ingeniero Químico, Universidad de San
Carlos de Guatemala, 2008).
- [31]. STOREY R., WAGNER F. Plant proteases: A need for uniformity.
Phytochemistry Journal, Volume 25. 1986. Pág.2701-2709.
- [32]. LÜCK E., JAGER M. Conservación química de los alimentos. Segunda
Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2000.
- [33]. Gon-Cruz, “Bisulfito de Sodio”, [en línea].<http://www.gon-cruz.com.html>Abril, 2012.

- [34].MASTERS K. Spray Drying Handbook. Longman Scientific & Technical, Essex. 1985.
- [35].MENDOZA N, ROMO M, SERRATOS I. “Dimensionamiento y construcción de un secador por aspersion a nivel de laboratorio” (Tesis, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México, 2003).
- [36].FILKOVÁ L., HUANG L., MUJUMDAR A. “Industrial spray drying. In: Handbook of Industrial Drying”. Ed. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2006. Pág. 215-255.
- [37].DESAI K., PARK H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology Journal. Volume 23. 2005. Pág.1361-1394.
- [38].Secado por aspersion y su uso en la encapsulacion. [en línea] http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol_44_3_10/far13310.htm. 2006.
- [39].NONHEBEL, G., ET AL. El secado de sólidos en la Industria Química. Editorial Reverte. España. 1979.

- [40].MIRAVET, GRACIA. “Secado por atomización de zumo de granada”,
(Tesis presentada para optar el grado de Máster en Ingeniería Ambiental
y Procesos Químico y Biotecnológicos, Universidad Politécnica de
Cartagena, 2009).
- [41].YÁNEZ J., SALAZAR J., CHAIRES L., JIMÉNEZ J., MÁRQUEZ M.,
RAMOS E. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación.
Avance y Perspectiva. 2002. Pág.21:313-319.
- [42].WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W. Isolierung and cristallisation of
Garungs ferments. Biochemische Zeitschrift,Vol.310. 1941. Pág.384-421.
- [43].FERNANDÉZ EMILIO, GALVÁN AURORA. Métodos para la
Cuantificación de Proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular. Campus Universitario Rabanales, Universidad de Córdoba.
2002.
- [44].ENZYMASE. “Papain”,[en línea].<http://www.enzymase.com>. (Junio,
2012).
- [45].DEVLIN T. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial
Reverté. Cuarta Edición. 2004.

[46].BIOZYM. "Papain", [en línea].<http://www.biozym.de>. (Junio, 2012)

[47].ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. "Papain". [en línea].<http://www.enzymedevelopment.com/>. (Junio, 2012).

[48].FPO. "MCU", [en línea]. <http://www.freepatentsonline.com>. (Junio,2012)

[49].MILLIPORE. "Papain", [en línea]. <http://www.millipore.com>. (Junio,2012)

[50].CASAMAYOR A, GONZALEZ A. "Seminarios de Bioquímica II" Departamento de Bioquímica y Biología Molecular", [en línea] <http://minnie.uab.es.ppt>. (Abril, 2012).

[51].CANO EDITH, MARTÍNEZ E., MORENO J., NIETO J., SILVA F., VARGAS O. "Análisis de prefactibilidad de la obtención y comercialización de la enzima papaína". Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 2004.