

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

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

**“ESTUDIO DEL PROCESO DE SECADO DEL LÁTEX DE
PAPAYA (CARICA PAPAYA L.) DESHIDRATADO POR
ASPERSIÓN”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

JORGE LUIS KURE OLIVERAS

ANDREA BELÉN YUGCHA CORRALES

GUAYAQUIL - ECUADOR

AÑO: 2012

AGRADECIMIENTO

Al señor Osiano Mendieta por abrirnos las puertas de su finca de la forma más cordial posible.

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, por permitirnos utilizar sus instalaciones, en especial al Ing. Iván Choez y al Q.F. Tulio Orellana por su paciencia y amabilidad.

Y a cada una de las personas que prestaron su ayuda durante este tiempo.

Jorge Kure

AGRADECIMIENTO

Una de las personas que más amo en este mundo, me enseñó que en la vida hay que ser agradecida es por tal motivo que me permito escribir estas palabras. En primer lugar agradezco a Dios por darme sabiduría durante todo este tiempo que he ejercido mis estudios y haberme permitido culminar una etapa más de mi vida, a mis padres por ser mi pilar fundamental y mi apoyo constante, a la Ing. Priscilla Castillo por haber confiado en mí para la realización de este proyecto y finalmente a todas aquellas personas que aportaron su granito de arena para la realización de esta tesis.

Andrea Yugcha

DEDICATORIA

En primer lugar a mis padres: Jorge y Nilsa, ya que sin su apoyo hubiera sido imposible poder llegar hasta acá, a mi hermana querida Aslin y a toda mi familia.

A mi directora de tesis, Ing. Priscila Castillo a quien le tengo alta estima, gracias por la oportunidad.

A mis amigos, ya que de una u otra forma contribuyeron a que esto sea posible.

Jorge Kure

DEDICATORIA

A MIS PADRES: EDWIN Y DOLLY, que me dan la fuerza para seguir luchando y ser su otro orgullo.

A MI HERMANA: DÁMARIS, que es mi ejemplo a seguir.

A MIS PROFESORES DE LA ESPOL, que además de ser buenos educadores, fueron maestros de vida;

Y A MIS AMIGOS DE SALINAS Y DE GUAYAQUIL, que son los hermanos que he podido escoger y que han compartido conmigo los buenos y malos momentos.

Andrea Yugcha

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Gustavo Guerrero M.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ing. Priscila Castillo S.
DIRECTORA DE TESIS



Ing. Mirella Bermeo G.
VOCAL



ESPO

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)



Jorge Luis Kure Oliveras



Andrea Belén Yugcha Corrales

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo determinar la temperatura idónea a la cual se debe deshidratar el látex de *Carica papaya* L. en un secador de aspersion, con la finalidad de obtener papaína cruda con elevada actividad proteolítica.

El látex de *Carica papaya* L. se obtuvo mediante extracción in situ de frutos de la parroquia Cerecita, con edad comprendida entre 2 a 3 meses de desarrollo, realizando cortes de alrededor de 2 milímetros de profundidad en períodos de 3 días. Previo al secado, se realizó el acondicionamiento de la muestra y se efectuó la medición de parámetros fisicoquímicos como: humedad, actividad de agua, densidad, grados Brix y pH.

Para facilitar la etapa del secado se procedió a microencapsular el látex con una solución de goma arábiga 25% p/v, dicha preparación fue la alimentación para el secador de aspersion. Se seleccionó como parámetro a controlar la temperatura de entrada del aire (110°C, 120°C, y 130 °C), ya que las otras condiciones como la presión de aire y el caudal de ingreso del látex se mantuvieron constantes. Ya obtenida la papaína cruda, se efectuó la medición de la humedad final y de la actividad enzimática, la misma que se hizo utilizando el método de la unidad de tirosina, cuantificada por medio de espectrofotometría.

Al finalizar los ensayos de medición de actividad enzimática, se utilizó el programa estadístico Minitab 15, y mediante la prueba Tukey de comparación de medias de las actividades proteolíticas se determinó a qué temperatura de tratamiento de secado se obtiene mayor actividad enzimática. Los resultados muestran que tanto a 110°C y a 120°C se obtienen elevados valores de actividad proteolítica, $671,53 \pm 31,16$ TU/mg y $672,92 \pm 32,54$ TU/mg respectivamente; dichos valores al ser comparados con un nivel de confianza del 95%, demostraron no tener diferencia, por lo tanto, la actividad proteolítica de las muestras secadas a 110°C es igual a la actividad proteolítica de las muestras secadas a 120°C.

Para obtener una sola respuesta, fue necesario medir la humedad final de la papaína secada por aspersion, puesto que esta junto con la actividad enzimática son los parámetros esenciales al momento de seleccionar una enzima. El rango en el cual debe estar el porcentaje de humedad es del 5%-8%, la muestra secada a 110°C obtuvo un valor de 7,89%, con lo cual se encuentra dentro del rango recomendado. Concluyendo así que para obtener una elevada actividad proteolítica y un adecuado porcentaje de humedad se debe de secar por aspersion el latex de Carica papaya L microencapsulado con goma arábica con una temperatura de entrada de aire de 120°C.

ÍNDICE GENERAL

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

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES

1.1. Papaya.....	3
1.1.1. Características del Cultivo.....	6
1.1.2. Características de la fruta para obtención del látex.....	9
1.2. Látex.....	12
1.2.1. Aspectos generales.....	12
1.2.2. Papaína.....	13
1.2.3. Factores que afectan a la actividad enzimática.....	15

1.3. Microencapsulación.....	22
1.3.1. Fundamento.....	22
1.3.2. Materiales de encapsulación.....	25
1.4. Secado por aspersion.....	27
1.4.1. Descripción del secado por aspersion.....	27
1.4.2. Ventajas y Desventajas del secado por aspersion.....	28
1.4.3. Etapas del proceso de secado por aspersion.....	29
1.4.4. Factores que afecta el proceso de secado por aspersion.....	37
1.5. Medición de la actividad proteolítica.....	39
1.5.1. Fundamento teórico.....	39
1.5.2. Método de determinación de la actividad proteolítica.....	42
1.6. Aplicaciones Industriales.....	43

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1. Hipótesis.....	44
2.2. Objetivos.....	45
2.3. Metodología.....	46
2.4. Diseño Experimental.....	47
2.5. Recolección y análisis de la muestra.....	50
2.5.1. Método de recolección.....	50
2.5.2. Acondicionamiento de la muestra.....	54
2.5.3. Características físico-química.....	57

2.6. Procedimiento de Secado.....	58
2.6.1. Materiales y Equipos.....	58
2.6.2. Método.....	60
2.7. Procedimiento de medición de actividad proteolítica.....	63
2.7.1. Materiales, Reactivos y Equipos.....	63
2.7.2. Método.....	64
2.8. Análisis del látex deshidratado.....	65
2.8.1. Características físico-química.....	65

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Evaluación de las condiciones de secado para la obtención de papaína cruda.....	66
3.2 Actividad proteolítica de la papaína cruda.....	73

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

4. Conclusiones y Recomendaciones.....	88
--	----

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

Aw	Actividad de agua
°Bx	Grados Brix
°C	Grados Centígrados
Cm	Centímetros
Fig.	Figura
Ec.	Ecuación
G	Gramos
M	Metro
Mg	Miligramo
ml	Mililitro
Min	Minuto
pI	Punto isoeléctrico
P.	Presión
Pág.	Página
T°	Temperatura
Tg	Temperatura de transición
TU	Unidades de Tirosina

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
±	Más - Menos
μ	Micras
#	Número
°	Grado

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1.1	Carica Papaya L.	4
Figura 1.2	Índices de madurez de la papaya cosechada	10
Figura 1.3	Enzima micro encapsulada	22
Figura 1.4	Típico sistema de secado por rociado	28
Figura 1.5	Rodetes centrífugos	31
Figura 1.6	Boquilla a presión de un fluido	32
Figura 1.7	Boquilla a presión de dos fluidos	33
Figura 1.8	Arreglos de corrientes en un secador de aspersión	34
Figura 1.9	Ciclón	36
Figura 1.10	Filtro de bolsas	36
Figura 1.11	Usos de la Papaína en las diferentes industrias	43
Figura 2.1	Esquema de la metodología global del experimento	46
Figura 2.2	Diseño Factorial	50
Figura 2.3	Papayas Criollas de la finca Virgen de Fátima, Cerecita	52
Figura 2.4	Recolector para el látex de carga papaya	53
Figura 2.5	Aspecto físico de las papayas criollas después de la recolección del látex	54
Figura 2.6	Centrifuga refrigerada	56
Figura 2.7	Spray Dryer	59
Figura 2.8	Esquema del proceso de secado	62
Figura 2.9	Esquema de la determinación de la Actividad Proteolítica	65
Figura 3.1	Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 110°C	77
Figura 3.2	Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 120°C	78
Figura 3.3	Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 130°C	79

Figura 3.4	Resultado del análisis Anova para la Actividad Proteolítica (TU/mg) vs. Temperatura (°C)	81
Figura 3.5	Gráfico de caja de actividad proteolítica para las muestras de papaína cruda secadas a secadas a 110°C, 120°C y 130°C	82
Figura 3.6	Prueba de Tukey para las comparaciones de dos a dos entre los niveles de temperatura	84

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Requerimientos de cultivo	7
Tabla 2	Intervalo de tamaño de partículas obtenida en secadores por aspersión	30
Tabla 3	Factores considerados en el experimento	48
Tabla 4	Parámetros establecidos para la extracción del látex	51
Tabla 5	Parámetros fisicoquímicos del látex microencapsulado seco	67
Tabla 6	Peso de los componentes y peso total de la muestra	68
Tabla 7	Temperaturas de salida según cada tratamiento	69
Tabla 8	Pesos de la papaína deshidratada a diferentes temperaturas	69
Tabla 9	Cantidad y porcentaje de agua perdida de las muestras de látex microencapsulado secado a diferentes temperaturas	71
Tabla 10	Valores experimentales del porcentaje de humedad de la papaína deshidratada a diferentes temperaturas	72
Tabla 11	Valores de las absorbancias de las muestras de papaína	75
Tabla 12	Valores de actividades proteolíticas de las muestras de papaína	75
Tabla 13	Comparación de las actividades proteolíticas según diferentes métodos de secado	86

INTRODUCCIÓN

El Ecuador presenta características idóneas para el cultivo de productos agrícolas por poseer amplia variedad de climas. Esto si bien favorece el desarrollo del sector agrario, para la producción nacional presenta retos importantes en cuanto a la tecnificación de los mismos y ni que decir del aprovechamiento completo de las propiedades que sus cultivos puedan tener.

La papaya (*Carica papaya L.*) perteneciente a la familia de las caricáceas, es uno de los cultivos con mayor tradición a nivel nacional con importante demanda comercial a nivel mundial, sea esta destinada para su consumo de forma directa por sus características organolépticas o por sus propiedades funcionales mundialmente conocidas.

Varias de estas propiedades se deben a las enzimas que posee, entre las cuales la más destacada es la papaína. Esta enzima se extrae del látex de la papaya, de preferencia del fruto en estado verde de madurez por medio de cortes en la superficie de los mismos, para luego ser sometidos a un proceso de secado. El látex extraído cuando ya está seco recibe el nombre de papaína cruda.

La papaína se ha convertido en la proteasa de origen vegetal de mayor uso en la industria. Se la utiliza a nivel de industrias de alimentos, en la industria textil, farmacéutica, cosmética, en el tratamiento de desechos, entre otras. Pero su uso tiende a incrementarse en otras áreas como por ejemplo la odontología.

Teniendo en cuenta el potencial comercial de la papaína, han sido realizados pocos estudios sobre las propiedades de la papaína obtenida de las variedades de papaya que se cultivan en el país, lo cual puede llevar a una diversificación de la producción nacional, con la consecuente generación de divisas para el Ecuador.

Este proyecto de tesis, está dirigido a determinar la temperatura de entrada de aire idónea que se debe emplear en el proceso de secado por aspersión para obtener papaína cruda de buena calidad, teniendo en cuenta la influencia de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la enzima.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. PAPAYA

La papaya pertenece a la familia de las Caricáceas y al género y especie *Carica papaya L.* Es una planta herbácea originaria de América Central, que se ha introducido en todos los países de clima cálido del mundo. Puede permanecer en producción durante muchos años, aunque en la práctica no se mantiene más de tres o cuatro años. Es muy cultivada por su fruto comestible y por ser fuente de un producto industrial como lo es la papaína, enzima que se encuentra en su látex (León, 1968).

Morfología General

La papaya (figura 1.1) es una especie arbustiva, presenta tres formas sexuales: femeninos, masculino y hermafrodito. La importancia del sexo

radica en que los machos son improductivos. Los femeninos son productores continuos, mientras que los hermafroditos pueden ser productores continuos y temporales (Chaverri, 1983).



Figura 1.1 Carica Papaya L.
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Su tronco hueco y madera esponjosa. Puede llegar a medir de ocho a diez metros de altura, y rara vez se ramifica, puesto que, presenta fuerte dominancia apical.

Las hojas son grandes, anchas, palmeadas y de color verdoso. Tanto en ellas, como en el tallo y los frutos se encuentra el látex, el cual contiene la enzima papaína.

Las flores son pentámeras con cinco sépalos, cinco pétalos, cinco estambres y cinco carpelos que nacen en las axilas de cada hoja. Los

pedúnculos de las flores femeninas y hermafroditas son pequeños; en cambio las flores masculinas tienen pedúnculo muy alargado y producen frutos no comerciales. Las flores femeninas producen frutos de forma esférica, en cambio las flores hermafroditas los producen de forma alargada (Bernal; et al, 2001).

La papaya en Ecuador

La papaya se cultiva en todos los países tropicales, y Ecuador no es la excepción. Según diario el Comercio, en su publicación del 22 de enero del 2011, las provincias donde se produce papaya son: Guayas, Manabí, Los Ríos, Santo Domingo de los Tsáchilas y Santa Elena.

Para este trabajo se requiere trabajar en una provincia de la Costa, y se eligió la provincia del Guayas, puesto que según el III Censo Nacional Agropecuario del año 2000, Guayas constituye la segunda provincia con mayor producción de papaya, con una superficie cosechada de 231 hectáreas. La provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas es la que más produce papaya, su producción es de 316 hectáreas.

1.1.1. Características del cultivo

La papaya es una planta tropical, puede cultivarse hasta los 1000 m.s.n.m., pero se obtiene mejor calidad y rendimiento en altitudes por debajo de los 800 metros (Bernal; et al, 2001).

Diversos factores climáticos influyen de manera decisiva en el desarrollo de este cultivo, los cuales se muestran a continuación (Bernal; et al, 2001):

- Temperatura: Temperatura de desarrollo es entre 22° y 30°C, con rango óptimo entre 23° y 26°C.
- Humedad: Alrededor del 85% está compuesta por agua, su consumo diario oscila entre los 19 y 41 litros por día, en dependencia de la edad de la planta y el clima del lugar.
- Suelos: Las principales características que debe reunir un suelo para este cultivo son las siguientes:
 - Suelto y húmedo.
 - Con buen drenaje.
 - Alto contenido de materia orgánica.
 - Un pH que fluctúe entre seis y siete.
 - Suelos fértiles y profundos.

En la tabla 1 encontramos resumidos los requerimientos para el cultivo de la papaya.

Requerimientos de Cultivo	
Clima	Cálido, húmedo, subtropical
Temperatura	22 - 30 °C
Humedad	85% - 100%
Pluviosidad	900-1000mm
Altitud	0-1000msnm

Tabla 1. Requerimientos de cultivo
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

El Ecuador cumple con los requerimientos exigidos para el cultivo de esta fruta, he inclusive gracias a su diversidad de climas se obtienen algunas variedades. Según el diario el comercio, en su publicación del 22 de enero del 2011, las variedades que existen en el Ecuador y por ende en Guayas son: la Tainung, la Hawaiana y la nacional o criolla.

Para este estudio se ha seleccionado la variedad criolla por ser una variedad autóctona con escasos estudios referentes al aprovechamiento de sus derivados, tales como la producción de papaína. Además que según Arana y Quijano, 2012, esta variedad presenta mayor rendimiento de látex, $2,31 \pm 0,69$ g de látex/Kg de fruta.

Criolla

Es la variedad autóctona del Ecuador, de amplia distribución siendo capaz de encontrarla en la mayor parte del territorio nacional. Tiene una amplia tradición de cultivo en los pequeños productores, es destinada para el mercado nacional, mientras que la papaya hawaiana, solo sunrise, es la variedad principal que se destina para la exportación (Guananga; et al., 2009).

Es una vigorosa de follaje abundante que puede alcanzar un crecimiento superior a los 3 m de altura, su tallo es de forma cónica con diámetro de 15 a 25 cm (Guananga; et al., 2009).

Esta planta se caracteriza por presentar marcadas diferencias en la morfología de sus frutos entre las plantas hermafroditas y las femeninas, las primeras muestran frutas con longitud mayor en relación a su diámetro, en cambio en las segundas su fruto posee una distribución de sus dimensiones más uniforme (Guananga; et al., 2009).

La fruta cuando está madura posee una coloración externa amarillo-naranja con mucho brillo, su pulpa es muy apetecida por su sabor. Su peso es superior al de otras variedades llegando a ser superior a los 5 Kg

y tamaños que pueden llegar hasta los 50 cm de longitud (Guananga; et al., 2009).

1.1.2. Características de la fruta para la obtención del látex

Para determinar cuáles son las características más idóneas para la selección de la papaya a utilizar para realizar la extracción del látex, se deben considerar diversos factores como:

Parte de la planta

El látex se encuentra presente en las hojas, tallos y fruto. En el pericarpio son muy frecuentes los canales laticíferos, especialmente en los tejidos mas externos (León, 1968).

Variedad de papaya

Como se mencionó anteriormente, la variedad para una adecuada recolección del látex es la Criolla (Arana y Quijano, 2012).

Edad de la planta

El rendimiento es óptimo durante los dos primeros años de producción, luego decrece siendo poco rentable su extracción (Chaverri, 1983).

Sexo de la planta

No existe diferencia significativa en el rendimiento de látex seco, obtenido de árboles femeninos y hermafroditos, por lo tanto, no es necesaria su selección al momento de elegir el sexo más adecuado para la extracción del látex (Chaverri, 1983).

Edad del fruto

Para no acelerar el proceso de maduración de frutos jóvenes, se recomienda rayar frutos cuya edad este comprendida entre 2,5 - 3 meses de edad (Chaverri, 1983).

Cuando la fruta se encuentra más cerca de su estado máximo de maduración esta contiene menor rendimiento de papaína (Guananga; et al., 2009).

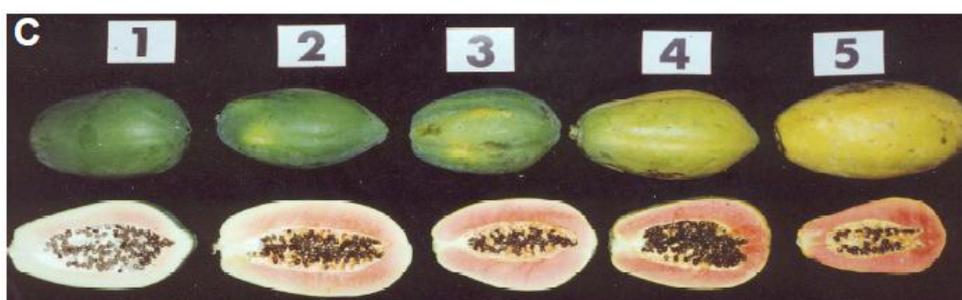


Figura 1.2. Índices de madurez de papaya cosechada
Fuente: Texeira da Silva; et al, 2007

La figura 1.2.1 es la coloración ideal o madurez ideal de la fruta para la extracción del látex (Texeira da Silva; et. al, 2007).

Hora de recolección

No hay diferencia en el rendimiento del látex cuando se lo extrae en los diferentes períodos del día (Chaverri, 1983).

Número de incisiones

El número de incisiones sobre la superficie del fruto, no determina el rendimiento. Se ha efectuado extracciones con 3 y 6 incisiones, y estas no han demostrado diferencia significativa en el rendimiento (Chaverri, 1983).

Período entre incisiones

Con extracciones realizadas entre dos y cuatro días, la disminución en el rendimiento es aproximadamente igual, pero con siete el rendimiento decrece bruscamente (Chaverri, 1983).

Profundidad de las incisiones

Para obtener un buen rendimiento y no dañar la superficie del fruto, es recomendable efectuar incisiones de 2,5 a 3mm de profundidad (Chaverri, 1983).

En el capítulo 2, se presenta las características tomadas en consideración en esta tesis para la extracción del látex.

1.2. LÁTEX

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

1.2.1. Aspectos generales

El látex constituye un factor crucial en la defensa del árbol contra ataques de insectos, puesto que cuando este coagula sella las heridas y evita la entrada de patógenos (Chaverri, 1983).

En *Carica papaya*, al contrario de lo que sucede en otras plantas, el látex es vivo, contiene muchos núcleos celulares y su protoplasma es biológicamente activo (León, 1968). Las principales proteasas encontradas en el látex son: la papaína y las quimopapaína A y B (Chaverri, 1983).

Quimopapaína

Enzima proteolítica que presenta dos componentes A y B. Su concentración en el látex corresponde al 45% (Chaverri, 1983). El pH óptimo para la digestión de la caseína y la hemoglobina es 7,2 con un máximo de 9 (Polaina y MacCabe, 2007).

Papaína

Enzima proteolítica cuya concentración en el látex corresponde al 10% (Chaverri, 1983). La actividad óptima de la papaína ocurre a pH 5,8 - 7 y a temperatura 50 - 57°C cuando el sustrato usado es caseína (Polaina y MacCabe, 2007).

En este trabajo se da énfasis a la enzima papaína, puesto que es la que presenta mayor actividad enzimática y porque es la más utilizada en procesos industriales. Y además porque el método de medición de actividad proteolítica es específico para esta enzima. A continuación se profundiza más sobre esta proteasa.

1.2.2. Papaína

La papaína es una endopeptidasa que se encuentra en el citosol del látex de los frutos no maduros de la planta de *Carica papaya*, para lograr

separar esta enzima del resto de orgánulos es conveniente efectuar la centrifugación, puesto que en esta operación se produce un sedimento y un sobrenadante, y según Murray; et al., 2005 el sobrenadante corresponde al citosol, lugar donde se encuentra la enzima.

Pertenece a la familia de las cisteín (sulfhidril) proteasas porque su actividad proteolítica depende del grupo tiol de un residuo de cisteína en su sitio activo (Wong, 1995). Dicho sitio activo o sitio de fijación de sustrato utiliza un residuo de cisteína activado con histidina para hidrolizar catalíticamente enlaces peptídico. Hidroliza aquellos enlaces que se encuentra a continuación de aminoácidos grandes de carácter hidrofóbico tales como: el triptófano, la fenilalanina, la tirosina o leucina (Whitaker, 2003).

Este sencillo polipéptido está compuesto por 212 aminoácidos. Es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto proteínas como péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Excepcionalmente estable a elevadas temperaturas a un pH neutro, pero se desnaturaliza en un ambiente ácido $\text{pH} < 4$. El pH óptimo para la papaína es de 5,0 – 6,0 y su pI es 9,6 (Wong, 1995). Es una enzima muy termorresistente, cuyo

rango de acción está entre 60 y 90 °C con un óptimo de 65 ° C (Badui, 1990).

Es bien sabido que toda enzima es una proteína. La papaína es una proteína globular que posee una estructura terciaria la cual es la encargada de su función, dicha estructura está estabilizada gracias a los puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína (Bachman, 1978). Muchos factores pueden destruir los puentes disulfuro produciendo así la desnaturalización de la enzima y por ende afectando la actividad proteolítica de la papaína.

1.2.3. Factores que afectan a la actividad enzimática

Existen diferentes causas por las que la actividad enzimática de la papaína se ve afectada, las cuales pueden provenir tanto del medio en el que se encuentra como de las características de su propia constitución, estas pueden ser (Chaverri, 1983):

Oxidación química: La presencia de agentes oxidantes como: yodo, oxígeno, peróxido de hidrógeno y metales pesados inactivan la enzima. Esto se debe a que los sulfhidrilos que participan en la acción catalítica de la enzima, se activan en estado reducido y se inactivan al oxidarse.

Existen otros reactivos que retardan la oxidación que son el sulfito de sodio o de potasio, el dióxido de azufre, el bisulfito de sodio, potasio o amonio, el ácido tioglicólico y el ácido ascórbico.

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

Coagulación: Por ser de origen proteico y por la presencia de peptona y albuminoides en el látex fresco, este se coagula después de su extracción.

Cambios de pH: La papaína conserva su actividad proteolítica en un margen que abarca desde pH 3 hasta pH 12, mostrando un óptimo de actividad entre pH 5 y 6. Existen diversos amortiguadores utilizados en la manipulación del látex los más comunes son: el citrato de sodio y potasio, fosfato de sodio y potasio.

Oxidación por luz: La papaína presenta sensibilidad a la luz ultravioleta, y se potencia su oxidación cuando es combinada con presencia de oxígeno.

Desarrollo microbiano: Por ser de origen proteico y la dificultad de su recolección, existe la posibilidad de que sufra una contaminación microbiana que produzca deterioro del látex. Se suelen utilizar agentes que retardan el desarrollo de microorganismos como los son los sulfitos y bisulfitos de sodio y potasio, el fenol, el paranitrofenol, los benzoatos, el resorsinol, y el etil-fenol.

Hora de recolección: La recolección del látex debe de realizarse en las primeras horas de la mañana, ya que es en esta etapa del día cuando menor acción de la luz se aprecia, lo cual evita que el látex sufra deterioros por causa de la acción de la luz ultravioleta. No obstante, no existe diferencia significativa en la actividad proteolítica de la papaína, al realizarse las extracciones del látex entre 5:30 y las 14 horas del día.

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

El látex una vez seco se lo conoce como papaína cruda, y según Reed, 1966, citado por Chaverri, 1983, el contenido de agua debe estar entre 5-8%.

Esta enzima a pesar de ser termorresistente, llega un límite al cual es susceptible a la degradación por acción de la temperatura, y por lo tanto las condiciones de secado influirán de manera directa las propiedades de la misma, y otros aspectos como la humedad final, el tiempo de secado y el aspecto del producto seco.

El secado solar, proporciona una papaína cruda oscura y de baja actividad proteolítica, por este motivo no es una operación muy recomendada puesto que lo que se desea es un producto de elevada actividad. Además, que al ser efectuado al ambiente, la papaína es propensa a contaminarse, dando como resultado un producto que deberá purificarse para poder ser utilizado en la industria de alimentos o farmacéutica (Chaverri, 1983).

El secado por corriente de aire caliente, proporciona una papaína de mejor calidad y más clara en comparación con el secado solar. La temperatura óptima para el secado, está entre 50-55°C (Chaverri, 1983).

Por otra parte, el secado a vacío otorga un producto de alta actividad proteolítica y blanco. La elevada actividad es gracias a que no hay contacto con el aire (Chaverri, 1983).

El secado por aspersión proporciona un producto de muy elevada actividad proteolítica. La diferencia de este tipo de secado con los mencionados anteriormente es el tiempo de secado, puesto que en esta operación son relativamente cortos (5 – 30 s), con lo cual no se provoca un daño severo en la estructura de la enzima, mientras que otros equipos de secado resultarían inadecuados (Reyes, 2010). Es por tal motivo que, en este trabajo, para conservar el látex se selecciona este tipo de secado.

Pero a pesar de ser un proceso rápido, la temperatura a la cual ingresa el aire de secado afecta a partir de cierto valor la estructura de la enzima, alterando por ende a la actividad proteolítica de la papaína. Según la bibliografía consultada no hay trabajos en los cuales se haya secado esta enzima por aspersión, pero sí se ha probado con otra enzima perteneciente también a las cistein proteasas, en dicha investigación se obtiene elevada actividad proteolítica a una temperatura de entrada de aire de 120°C, cabe recalcar que la temperatura de entrada de aire no es

la misma que la del producto, esta última es similar a la temperatura de salida del aire. Por lo tanto se desea comprobar si esta temperatura (120°C) también es apropiada para el secado de la papaína para obtener: una elevada actividad proteolítica y un adecuado porcentaje de humedad, factores cruciales al momento de seleccionar una enzima. Y también evaluar que sucede con estos parámetros cuando se efectúa el secado a 110°C y 130°C.

Otra de las razones por las cuales no se emplean temperaturas de entrada de aire a la cual se obtenga temperaturas de salida de 65°C es por el porcentaje de humedad de la muestra, puesto que en los otros métodos de secado se efectúa logrando contenidos de agua que se encuentran dentro de los citados, pero el período de operación es más largo. Y además de que el secado por aspersion no se realiza cuando la temperatura de salida es de 50°C o 55°C porque se forman aglomerados (Miravet, 2009). Esto se debe a que la muestra ha sido secada parcialmente por lo tanto su contenido de humedad será alto.

Los aglomerados son un inconveniente en el proceso de secado por aspersion debido a la pegosidad y la elevada higroscopicidad. Pegosidad se refiere al fenómeno de cohesión partícula-partícula y de adhesión

partícula-pared que se presenta en los polvos obtenidos, lo cual dificulta la presentación de los mismos y mancha las paredes de la cámara de secado (Miravet, 2009). Al momento de proceder al secado del látex de Carica papaya ocurre este problema, esto puede ser debido a que la temperatura del muestra a ser secada (t_l) es mucho mayor que la temperatura de transición vítrea (t_g), cuando lo ideal es lo contrario para lograr un buen comportamiento en el secado, cuando esto sucede la sustancia a ser secada presenta un estado pseudo-líquido, que es el responsable de la cohesión interpartículas y de la adhesión de las partículas a las paredes del cilindro (Miravet, 2009).

Una solución al problema de pegosidad es el uso de cilindros de pulverización de doble pared, o el uso de aire seco para enfriar (Miravet, 2009). Dado que el spray dryer utilizado en esta tesis no posee los componentes mencionados, una buena alternativa es la utilización de los ayudantes de secado.

Estos ayudantes de secado, a su vez son productos encapsulantes, por lo tanto vinculan el proceso de secado de aspersion con la técnica de microencapsulación.

1.3. MICROENCAPSULACIÓN

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

1.3.1. Fundamento

La microencapsulación es un método de inmovilización mediante retención física, que permite atrapar sustancias tales como enzimas, células o biomoléculas en una matriz o sistema de pared (Miravet, 2009).

Las microcápsulas están compuestas por dos partes: el núcleo o centro activo y por la corteza que lo envuelve. La corteza es una membrana semi-permeable, delgada y fuerte alrededor de su centro (Primo, 1995).

En la fig. 1.3 observamos las partes de una microcápsula.

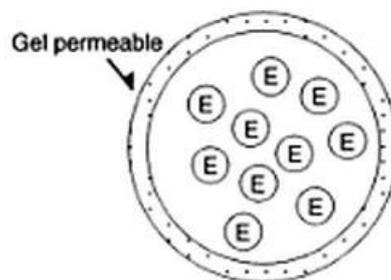


Figura 1.3. Enzima microencapsulada
Fuente: Miravet, 2009

Se le denomina microencapsulación porque las esferas obtenidas tienen diámetros que oscilan entre 1 y 100 μm , o porque la cantidad de compuesto atrapado tiene bajo peso molecular o se encuentra en pequeñas cantidades (Primo, 1995).

Entre las funciones de la microencapsulación encontramos (Miravet, 2009):

- Evitar la pérdida de la sustancia englobada.
- Transformar líquidos difíciles de manejar en polvos listos para ser usados en las aplicaciones necesarias.
- Proteger el “centro” de factores como el calor, la luz, el oxígeno y la humedad.
- Proporcionar resistencia al material encapsulado, logrando así conservar la viabilidad, incrementar su vida media en anaquel y estabilidad.

Es importante hacer hincapié en que la microencapsulación se ha convertido en un proceso muy atractivo en las últimas décadas, siendo adecuada para los ingredientes alimentarios, así como para la formulación de productos químicos, fármacos o cosméticos (Primo, 1995).

El proceso de la microencapsulación consiste en hacer una disolución del material de recubrimiento con un disolvente apropiado, para de esta forma facilitar la mezcla con la sustancia que se desea encapsular, la misma que puede ser de naturaleza sólida, gaseosa o líquida, y finalmente proceder a la solidificación del material de recubrimiento.

Las técnicas que permiten la solidificación, se clasifican en tres grupos los cuales son (Miravet, 2009):

- Métodos físicos: Secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión
- Métodos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- Métodos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular

Dado que en este trabajo, la microencapsulación se emplea porque la sustancia encapsulante sirve como un agente de secado, sólo nos centraremos en la técnica de secado por aspersión, la cual se trata más ampliamente en el numeral 1.4.

1.3.2 Materiales de encapsulación

Los materiales encapsulantes ayudan para contrarrestar la termoplasticidad e higroscopicidad de las sustancias que van a ser secadas. Además, incrementan el rendimiento del secado (Nuria, 2002).

Existe una amplia variedad de materiales de recubrimiento, pero al momento de su selección es importante considerar las características de los agentes encapsulantes en cuanto a flexibilidad, fuerza o resistencia, permeabilidad, facilidad de aplicación, naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, ya que todas ellas influirán en las características del producto final (Nuria, 2002).

En esta tesis se utiliza la goma arábica como microencapsulante en el método de secado por aspersión debido a su baja viscosidad, solubilidad, termoresistencia y buena capacidad emulsificante.

Goma Arábica

Conocida también como goma acacia, es un heteropolisacárido ramificado que se obtiene del Acacia Senegal y Acacia Seyal. Presenta una cadena central de moléculas de D-galactosa, a la cual se le unen L-ramnopironasa, arabinofuranos y ácido glucurónico, lo que le da la

propiedad de ser un hidrocoloide hidrofílico. (Nuria, 2002). Gracias a su estructura ramificada no presenta una elevada viscosidad puesto que el volumen hidratado ocupado es más pequeño en comparación con una estructura lineal poca ramificada.

La viscosidad es un factor importante puesto que, una baja viscosidad permite una mejor fluidez de la mezcla. La goma acacia es muy soluble en agua, presenta una máxima viscosidad a pH 6,7, la cual tiende a incrementa en presencia de electrolitos. Pierde estabilidad cuando se encuentra en un medio muy ácido puesto que se hidroliza (Reyes, 2010).

Otra de sus características es que proporciona protección contra la oxidación, además de tener una buena retención de las sustancias encapsuladas. No imparte olor, color ni sabor a las sustancias junto con las cuales es utilizada. No es un buen espesante, y para conseguir un efecto similar al de otras gomas es necesario utilizar concentraciones altas (Nuria, 2002).

Entre sus usos podemos destacar que es ideal para la encapsulación de aromas, para retardar la cristalización del azúcar, para aportar fibra soluble y para recubrimiento de enzimas.

1.4. Secado por aspersión

El secado es un proceso continuo que permite conservar la sustancia que es deshidratada, proporcionándole una mejor manipulación, reducción de volumen y larga vida útil.

1.4.1. Descripción del secado por aspersión

Conocido también como secado por rociado, pulverización o spray drying, es una operación unitaria que consiste en la pulverización de un material líquido concentrado, el cual entra en contacto con una corriente de aire caliente para finalmente ser transformado en un polvo (Martínez, 2009).

La sustancia a secar debe ser un líquido, el cual puede ser una suspensión, solución, gel o pasta; siempre y cuando estos se los pueda bombear y atomizar. Se consigue el secado de la sustancia gracias a la evaporación del solvente (Maupoei, 2001).

Entre las sustancias que son secadas por esta técnica encontramos: café instantáneo, bebidas de té, extractos de levadura, leche de soya en polvo, huevos en polvo, enzimas, queso en polvo, leche en polvo, jugos de frutas y almidones hidrolizados (Maupoei, 2001).

Las partes por las cuales está compuesto un secador por aspersión se muestran en la Figura 1.4.

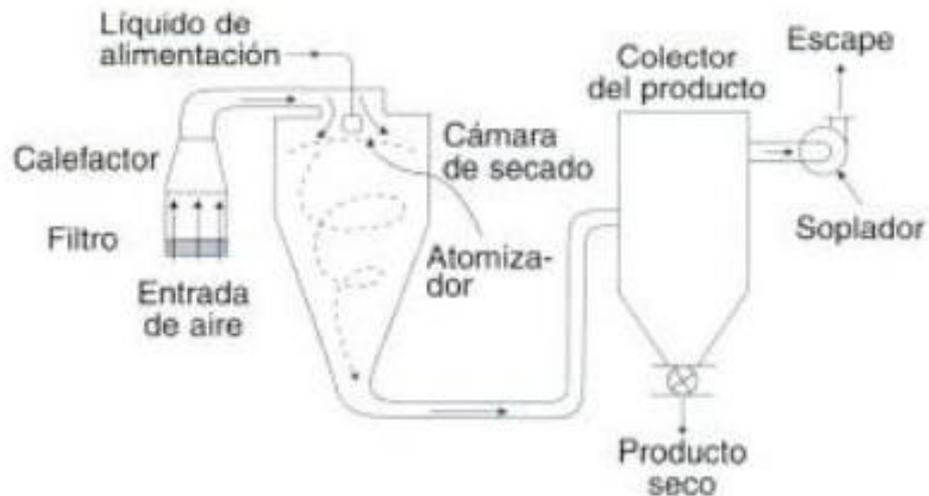


Figura 1.4. Típico sistema de secado por rociado
Fuente: Heldman, 1997

1.4.2. Ventajas y desventajas del secado por aspersión

Ventajas

Las ventajas que se presentan cuando se seca por medio de aspersión son (Beringer, 2005):

- Al ser un proceso continuo, permite el secado de grandes cantidades y en poco tiempo, en comparación con otras técnicas de secado.
- Es ideal para el secado de sustancias termosensibles, puesto que los tiempo de contacto son cortos, con lo cual se logra evitar la destrucción de dichas sustancias.

- El producto secado se obtiene como un polvo fino, que es fácil de disolver con el solvente apropiado.
- El producto seco puede ser reconstituido con la adición de agua.
- Puede considerarse un proceso económico, puesto que evita la manipulación del producto terminado para lograr una mejor presentación.

Desventajas

Las desventajas producidas por este tipo de secado son (Beringer, 2005):

- En caso de la muestra no sea líquida, hay que acondicionarla para tenerla en este estado.
- No se pueden secar sustancias que son pobres en componentes celulósicos o amiláceos, y que tienen azúcares o componentes similares, ya que con esta composición se logra sólidos higroscópicos.

1.4.3. Etapas del proceso de secado por aspersión

Las etapas del proceso de secado se dan según los instrumentos que intervienen y estas son:

- Atomizado

- Secado
- Separación

Atomizado

El atomizado se consigue al aplicar energía a la masa de líquido que va a ser transformado, logrando así la formación de pequeñas gotas con lo cual se obtiene una mayor área superficial para el intercambio de calor, consiguiendo una rápida disminución de la humedad y por ende reduciendo así el tiempo de operación (Beringer, 2005). La atomización es la etapa más importante en el proceso de secado por aspersion.

El tipo de atomizador establece la energía requerida para formar las gotas, el tamaño y la distribución de las partículas atomizadas, su trayectoria y velocidad (Martínez, 2009). Estos factores afectan el tamaño final de las partículas secas, dichos valores se encuentran en la tabla 2.

Tipo de atomizador	Tamaño de Partícula(μm)
Rodete centrifugo	1-600
Boquillas a presión de un fluido	10-800
Boquillas a presión de dos fluidos	5-300

Tabla 2. Intervalo de tamaño de partículas obtenidas en secadores por aspersion

Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Rodetes centrífugos: La aspersion se da porque la alimentación cae en el centro del disco giratorio, y por medio de la fuerza centrífuga se desplaza en forma de película fina y se dispersa en forma de niebla fina. Es ideal para líquidos viscosos y heterogéneos (Nonhebel, 2002). En la figura 1.5 se observa la forma de la niebla formada por los rodetes centrífugos.

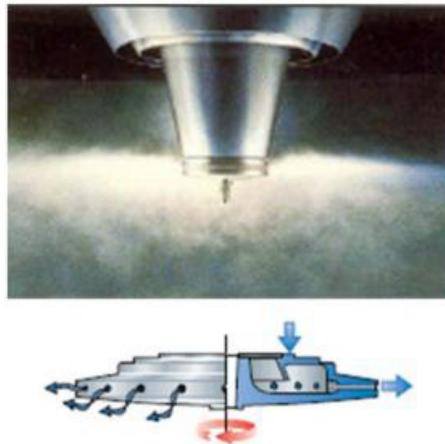


Figura 1.5. Rodetes centrífugos
Fuente: Martínez, 2009.

Boquillas a presión de un fluido: La alimentación es forzada a presión a través de boquillas, las cuales constan de un pequeño tubo que provocan en la alimentación un movimiento en espiral y al salir por el pequeño orificio se crea una niebla que tiene forma de cono. Este tipo de boquillas no es recomendable para suspensiones concentradas (Nonhebel, 2002) puesto que puede obstruir el orificio y generar una erosión en la boquilla. El consumo de energía en este tipo de atomizador es menor que en el de disco giratorio. En la figura 1.6 se observa la forma de la niebla formada por las toberas a presión.



Figura 1.6. Boquilla a presión de un fluido
Fuente: Miravet, 2009.

Boquillas a presión de dos fluidos: La aspersion es provocada por un fluido secundario, tal como aire comprimido. La alimentación se mezcla con el aire fuera del cuerpo de la boquilla, la atomización se da gracias a que el aire que se encuentra a alta velocidad provoca fuerzas de fricciones altas sobre la superficie del líquido provocando una desintegración del mismo en forma de gotas. Los aerosoles de alimentaciones poco viscosas presentan tamaños de gotita de medio a bajo y un alto grado de homogeneidad, con alimentaciones viscosas, se obtiene tamaños de gotas más grandes y una homogeneidad baja.

Estas boquillas (figura 1.7) producen gotitas de diferentes tamaños. El alto costo del aire comprimido (1,5 – 8 bares) es importante para la economía de estas boquillas, las cuales presentan el consumo de energía más alto (Orrego, 2003).

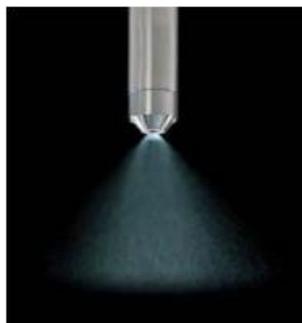


Figura 1.7. Boquilla a presión de dos fluidos
Fuente: Miravet, 2009

Secado

Ocurre en la cámara de secado, es aquí donde se produce la mezcla del aire caliente con la sustancia pulverizada a secar. El tiempo de permanencia de las gotas en la cámara es de 5 a 100 segundos aproximadamente, al finalizar dicho tiempo las gotas obtiene de un 5 al 10% de humedad. El tiempo de contacto necesario entre la gota y el aire caliente, para formar la microcápsula, es de aproximadamente 5 a 30 segundos (Miravet, 2009).

El aire actúa como suministrador de calor latente de evaporación, así como medio receptor de la humedad evaporada. El calentamiento del aire que ingresa a la cámara puede lograrse por métodos indirectos como: vapor, gas o aceite; o también por medios directos como: gas o electricidad (Maupoei, 2001). La forma como ingresa se presenta en el figura 1.8.

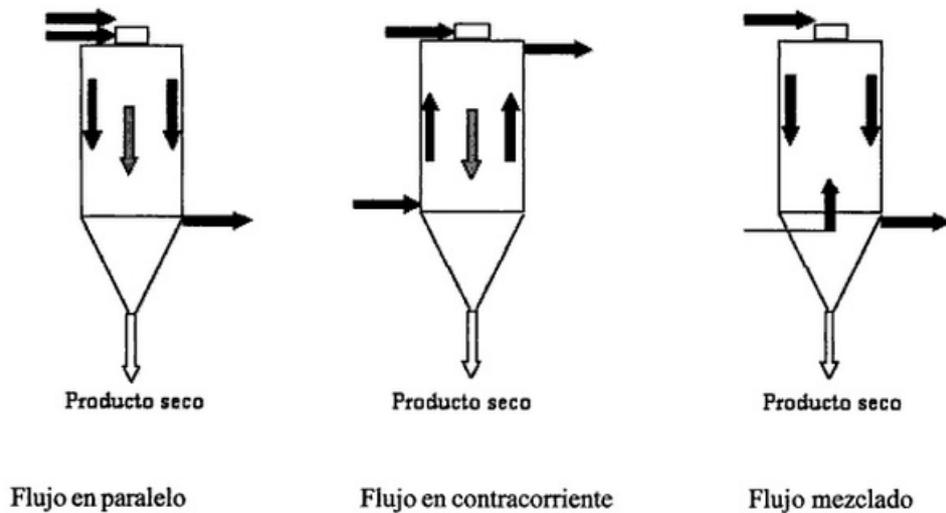


Figura 1.8. Arreglos de corrientes en un secador de aspersión
Fuente: Orrego, 2003.

En el flujo paralelo, el aire y las gotas van en la misma dirección. Este tipo de arreglos es deseado para las sustancias que presentan sensibilidad térmica. El aire muy caliente actúa sobre las gotas que presentan una elevada humedad. A medida que el aire pasa a través de la cámara de secado, el agua en la gota va disminuyendo y se produce un efecto evaporativo frío, con lo cual el producto no se calienta más y una vez que se alcanza el estado de secado el aire también se encuentra frío (Orrego, 2003). A pesar de esta condición, no todos los productos son secados a muy elevadas temperaturas, para evitar la desnaturalización de otros componentes como lo son las proteínas. Cuando se utiliza un atomizador rotatorio hay un perfil homogéneo de temperatura dentro de la cámara.

En el flujo en contracorriente, las gotas y el aire van en dirección opuesta. Es decir, mientras el aire caliente se dirige hacia arriba, las gotas se orientan hacia abajo ganando mucha temperatura (Orrego, 2003). Este arreglo es ideal para productos termoestables.

El flujo mezclado por su parte es un arreglo que resulta de la combinación de los dos anteriores. Las gotas se orientan hacia arriba y sólo se quedan en la zona caliente por un corto tiempo, después por gravedad el producto es conducido hacia la zona fría (Nonhebel, 2002).

Separación

Esta etapa se logra gracias a dispositivos que permiten que el polvo seco y el aire se separen, entre ellos encontramos los ciclones. Una primera separación se da debido a la fuerza de inercia y a la gravedad, puesto que las partículas al chocar con las paredes del ciclón (figura 1.9) se separan del aire y gracias a su peso se orientan en el fondo de la cámara; la segunda separación involucra al polvo fino, el cual por medio de la fuerza centrífuga es separado del aire y obligado a asentarse en el recipiente recolector, mientras que el aire se dirige hacia la superficie del ciclón (Nonhebel, 2002).

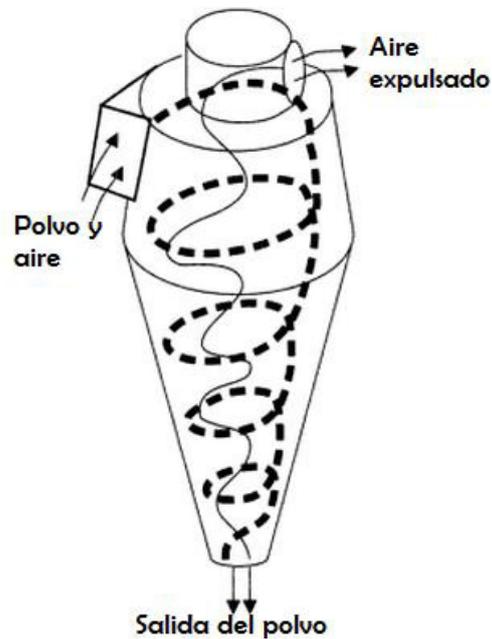


Figura 1.9. Ciclón
Fuente: Nonhebel, 2002

Si es que el ciclón no logra separar todas las partículas, es conveniente la instalación de otros dispositivos tales como filtros de bolsa (figura 1.10); por donde el aire pasa antes de ser liberado a la atmósfera logrando así dejar atrapadas las partículas finas (Beringer, 2005).

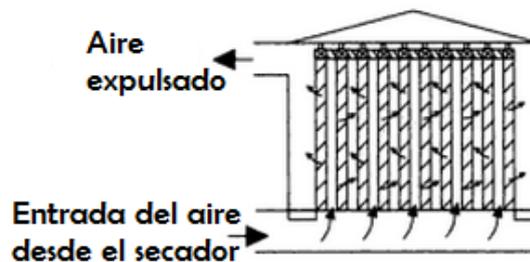


Figura 1.10. Filtro de bolsas
Fuente: Nonhebel, 2002

1.4.4. Factores que afectan el proceso de secado por aspersión

Mediante la variación de ciertos factores se puede afectar las características del producto final tales como: humedad final, rendimiento de producción, temperatura de salida y tamaño de partícula. Entre los factores que modifican dichas características encontramos (Miravet, 2009):

Caudal del líquido de entrada

El caudal del líquido de entrada se regula por medio de una bomba peristáltica. Este factor afecta principalmente a la etapa de la atomización porque según la cantidad de alimentación se deberá emplear los diferentes atomizadores para conseguir la formación de la gota. Si no se logra la formación de la nube, el secado no será muy eficiente, puesto que lo que se desea es lograr una mayor área que permita una adecuada transferencia de masa y de calor consiguiendo así, productos con humedades no deseadas.

Caudal de aire de atomización

El aire es suministrado por un compresor, dicho caudal también puede afectar la atomización puesto que se puede variar la presión con la que va a ingresar en la cámara (Heldman, 1997). Si no ingresa con una alta

velocidad el aire, este no logrará atomizar la alimentación produciendo así una ineficiencia en la etapa principal del secado y afectando a su vez a la humedad final del producto.

Velocidad del líquido de alimentación

Según la velocidad de atomización será el tamaño de las partículas, así pues, cuando hay una elevada velocidad, el tamaño de partículas será pequeño y se producirá el secado más rápido debido a un aumento del área superficial. Sin embargo, después de cierta velocidad se producen coagulaciones, logrando así un producto irregular. Este factor va a la par con el caudal de alimentación.

Temperatura de la entrada de aire

Este factor puede ser controlado con el equipo y se selecciona de acuerdo a la resistencia de la sustancia a ser procesada. Tiene influencia en la velocidad de secado y en el tiempo requerido para el secado. Mientras más alta sea la temperatura más rápido se elimina el contenido de agua de la muestra. Es importante controlar este parámetro cuando se trabaja con sustancias que no son termorresistentes.

En el caso de la papaína, es una enzima termorresistente y en esta tesis se efectúa un secado a diferentes temperaturas para ver hasta que

temperatura de entrada de aire se puede obtener elevada actividad enzimática

En la Anexo A se presenta la influencia de cada uno de estos factores en el secado por atomización (Miravet, 2009).

1.5. Medición de la actividad proteolítica

1.5.1. Fundamento teórico

La actividad proteolítica está determinada por la hidrólisis de enlaces peptídico de una proteína. Las enzimas manifiestan una especificidad notable en las reacciones que catalizan, de modo que las proteínas se pueden romper en diferentes puntos a voluntad. La papaína rompe el enlace peptídico atacando al grupo carboxilo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Ferrao y Jácome, 1977).

Su eficiencia catalítica está determinada por la rapidez con que hidroliza enlaces peptídico bajo condiciones estándar de pH, temperatura, y concentración de la enzima (Heldman, 1997).

Este ensayo emplea sales de fosfato, las cuales tienen el efecto de alterar el microambiente de la proteína, ya que las enzimas precisan de

una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura. Así como también se utilizan activadores enzimáticos como el Etilendimetil Tetra Acético (EDTA) y la L-cisteína, los cuales favorecen el trabajo de las proteasas cisteínicas como la papaína (Badui, 1990).

Es importante que el pH de la solución con que se realiza el análisis se encuentre en el rango óptimo (6 -7) de acción de la enzima, ya que de otro modo ésta verá modificada su carga eléctrica, por lo que la estructura de los aminoácidos cambiaría al aceptar o donar iones, afectando de esta manera su actividad (Badui, 1990).

También hay que considerar que la concentración de sustrato y enzima que se va a emplear sea la adecuada, de manera que se evite la saturación de la enzima, es decir que la concentración de sustrato sea mayor a la de los centros catalíticos, de ocurrir esto sin importar que se añada más sustrato la eficiencia de la enzima no aumentará.

Cuando los reactivos han sido preparados, se procede a ejecutar el análisis. En este es importante que las temperaturas en la que se realiza se encuentren dentro del rango de acción de la enzima, de no ser así la

proteólisis del sustrato no será adecuada. También se debe tener en cuenta los tiempos que se deja actuar la enzima (Heldman, 1997).

Para la determinación de las unidades de tirosina producidas en el ensayo se debe utilizar técnicas espectrofotométricas, la cual se constituye en uno de los métodos de análisis óptico más empleado en los laboratorios. Se fundamenta en el hecho que las sustancias son capaces de absorber energía radiante, la cual es característica para cada tipo de compuesto, de esta manera cuando la luz atraviesa una sustancia parte de esta energía es absorbida lo que permite ser identificada según esta propiedad (Badui, 1990).

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, es decir que mientras mayor número de moléculas se encuentren en un medio mayor será la interacción de estas con la luz (Heldman, 1997).

Cabe recalcar que los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano al igual que otros compuestos aromáticos como los carbohidratos absorben luz a una longitud de onda de 280nm, por esto es necesario separar la parte proteica antes de realizar la medición (Badui, 1990).

1.5.2. Método de determinación de la actividad proteolítica

Existen tres tipos generales de métodos para determinar la actividad proteolítica de una enzima (Chaverri, 1983):

El primer tipo se basa en la hidrólisis de sustratos de bajo peso molecular (como hemoglobina), suele ser el más preciso, pero es difícil encontrar reproducibilidad.

El segundo tipo se establece por la capacidad que posee la enzima para producir la coagulación de la leche, él presenta dificultades por tener variables que son complicadas de controlar como lo es el tipo de leche empleada y la concentración de proteína de esta. Es el más sencillo, pero menos exacto y carece de precisión.

El tercer tipo se fundamenta en la hidrólisis de proteínas. Se utilizan diferentes sustratos para cada método, haciendo complicada la comparación de los resultados realizados en cada laboratorio. Para esta tesis se plantea utilizar este tipo de método, el mismo que consiste en determinar la cantidad de tirosina liberada partiendo de un sustrato de caseína, a este método se lo conoce con el nombre de caseinólisis, el cual se constituye en una de las técnicas más usadas.

1.6. Aplicaciones Industriales

La papaína posee un mercado creciente, puesto a que su uso abarca a varias industrias, en la figura 1.11 encontramos las industrias en las cuales es aplicada y su uso respectivo en cada una de ellas.

Industria Alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> • Clarificador de bebidas (cervezas y jugos) • Ablandador de carnes • Quesos: proporciona productos de mejor calidad y mas cremosos • Cereales: Enriquece el contenido proteico
Industria del Cuero	<ul style="list-style-type: none"> • Refinar el cuero • Remoción de pelo
Industria Textil	<ul style="list-style-type: none"> • Desengomar las fibras de seda • Mejorar la calidad de los colorante usados
Industria Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboracion de cremas desmanchadoras de la piel • Elaboración de exfoliante • Cicatrizante
Industria Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Gel para remover las caries • Tabletas para la limpieza de lentes de contacto

Figura 1.11. Usos de la papaína en las diferentes industrias
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la temperatura de aire de entrada ideal para efectuar el secado por aspersión del látex de *Carica papaya* L. de la variedad criolla, a la cual se pueda obtener una elevada actividad proteolítica?

2.1. HIPÓTESIS

La variación de la temperatura en las condiciones de secado por aspersión para la obtención de papaína cruda a partir de látex de *Carica papaya* L., afecta la actividad proteolítica de la enzima obtenida, y por lo tanto es de suponerse que unos tratamientos proporcionarán mayor actividad proteolítica en comparación a otros.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la temperatura de entrada del aire para realizar el secado por aspersión del látex de Carica papaya de la variedad Criolla microencapsulado con goma arábica en base al criterio de obtención de mayor actividad enzimática.

Objetivos Específicos

- Extraer el látex de la Carica papaya de la variedad Criolla, autóctona de la Costa Ecuatoriana.
- Acondicionar el látex para facilitar el proceso del secado por aspersión.
- Caracterizar el látex acondicionado
- Realizar pruebas variando la temperatura de entrada de aire caliente.
- Microencapsular la muestra para facilitar la operación del secado con la ayuda de la goma arábica.
- Medir la actividad proteolítica del látex microencapsulado secado a tres diferentes temperaturas (110°C, 120°C y 130°C).
- Medir la humedad final del látex microencapsulado secado a las diferentes temperaturas.

2.3. METODOLOGIA

En la figura 2.1 se muestra el esquema global de la metodología efectuada para la obtención del látex de *Carica papaya L* microencapsulado y secado por aspersion.

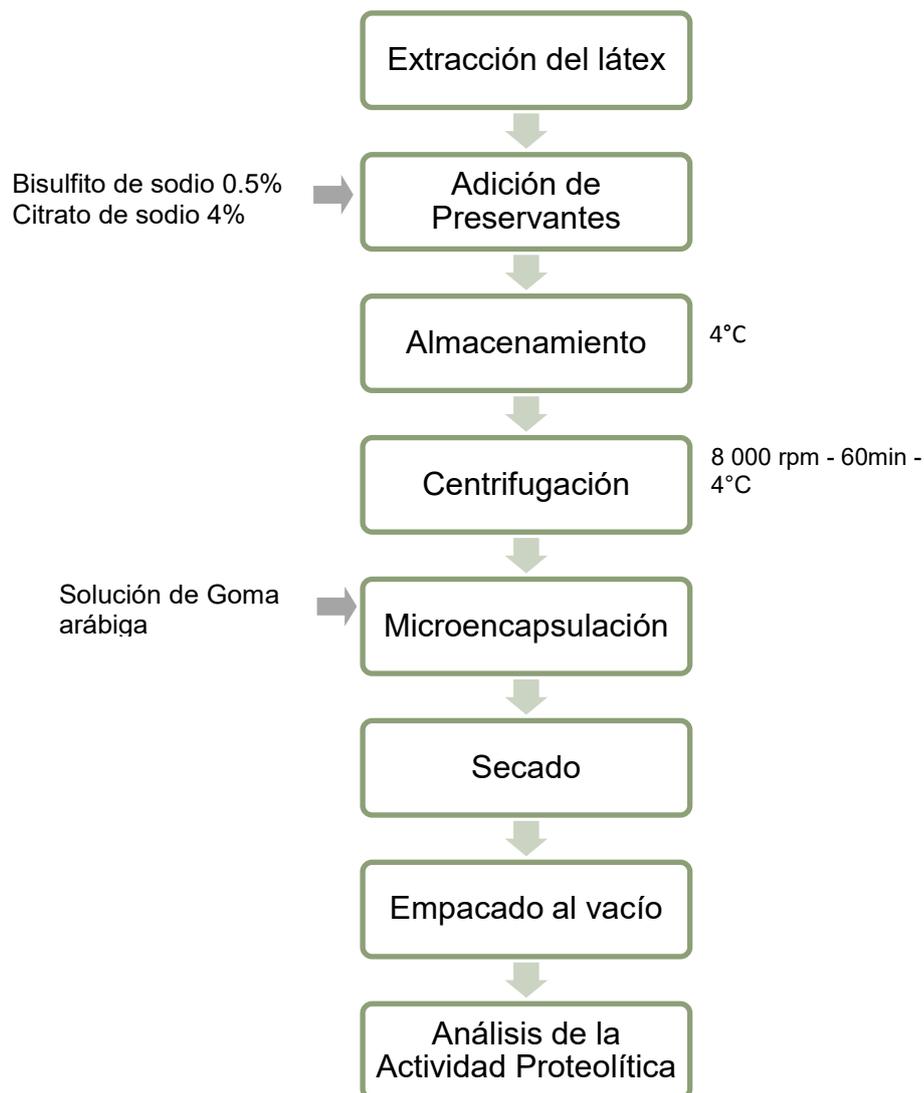


Figura 2.1. Esquema de la metodología global del experimento

Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El secado es una operación unitaria que consiste en la reducción del contenido de humedad mediante la aplicación de técnicas combinadas de transferencia de masa y calor, haciendo pasar aire a alta temperatura en contacto con otro cuerpo.

Es así que, teniendo en cuenta de cómo se realiza el secado, se consideró como factor o variable independiente a controlar durante dicho proceso a la temperatura de entrada del aire, por su incidencia en la actividad enzimática de la papaína. Por lo cual, se catalogó a ésta última como la variable dependiente o respuesta, la misma que se representa en TU/mg.

Otros factores que pueden afectar la actividad de la enzima no se establecieron en el diseño del experimento, con el objetivo de reducir la variabilidad de la respuesta y se los consideró como variables fijas o variables controladas, en la tabla 3 se presentan los factores implantados en este trabajo.

Factor Variable	Factor Fijo		
Temperatura de entrada	Caudal de alimentación	Presión	Goma
110 °C	10 ml/min	4 bar	25%
120 °C			
130 °C			

Tabla 3. Factores considerados en el experimento
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Como se observa en la tabla 3, la temperatura es el único factor que altera a la variable de respuesta en este experimento. Los valores de temperatura de entrada de aire utilizados fueron: 110°C, 120°C y 130°C, convirtiéndose de esta manera en un factor que presenta tres niveles.

Como ya se mencionó, la temperatura es un factor que afecta la actividad enzimática, por ello se plantea determinar si existe diferencia significativa entre la actividad proteolítica de las muestras de látex microencapsulado secadas a diferentes temperaturas. Por lo que la hipótesis estadística del experimento es:

$$H_0: \mu_{110} = \mu_{120} = \mu_{130}$$

vs

H_1 : Al menos una igualdad no es cierta

Donde:

μ_{110} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 110°C

μ_{120} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 120°C

μ_{130} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 130°C

Una vez determinada la variable de respuesta, así como los factores variables y fijos, se procedió a formular el modelo estadístico (Ec. 1) a seguir para la realización del experimento:

$$Y = \mu + T_i + \varepsilon \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

Y: La variable dependiente o de respuesta "Actividad proteolítica"

μ : La media general del experimento

T_i : La variable independiente "temperatura de entrada del aire"

ε : La media del error

La figura 2.2 muestra el esquema del diseño factorial



Figura 2.1. Diseño Factorial
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Este diseño permite conocer la influencia de la temperatura en la actividad proteolítica, y gracias a la hipótesis estadística se pudo inferir acerca de la temperatura a la que se obtiene mayor actividad enzimática.

2.5. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA

2.5.1. Método de recolección

Las muestras de látex se recogieron de la Finca Virgen de Fátima, la misma que está localizada en el la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, en el km 51 vía a la Costa por la entrada a la vía Safando - Cerecita.

En la tabla 4 se especifica los parámetros establecidos para la extracción del látex de Carica papaya L, y en la figura 2.3 se muestra las papayas Criollas de la finca Virgen de Fátima, Cerecita.

Variedad de la papaya	Criolla
Edad de la planta	1 año
Parte de la planta	Cáscara de los frutos
Total de papayas rayadas	80
Edad de los frutos	2 - 3 meses
Hora de recolección	5:30am-7:00am
Sangrado	Incisiones longitudinales sobre la superficie del fruto
Profundidad de la incisiones	2 a 3 mm aproximadamente
Recolecciones por semana	2
Semanas de recolección	2
Intervalo entre recolección	3 días
Numero de incisiones	3 incisiones/día

Tabla 4. Parámetros establecidos para la extracción del látex
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012



Figura 2.3. Papayas Criollas de la finca Virgen de Fátima, Cerecita.
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Fue necesario diseñar un prototipo de fácil y rápida instalación en los tallos de los papayos, que permitiera que el látex pudiera escurrir libremente a los contenedores, sin afectar las propiedades del mismo.

El instrumento consistió en un embudo plástico grande, en cuyo borde superior presenta una piola para facilitar la instalación del dispositivo al árbol y en la parte inferior con la ayuda de ligas se colocó el recolector (Figura 2.4).

Los recolectores fueron fundas a las cuales se les debe adicionar los aditivos.



Figura 2.4. Recolector para el látex de *Carica papaya*
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Previo a la extracción se realizó la limpieza del fruto, con el objetivo de remover en la medida de lo posible, las impurezas que puedan afectar la calidad del látex a ser extraído. Para lo cual, se utilizó agua tratada con utensilios que faciliten la remoción como lo son las toallas de papel.

Después de limpiar la fruta se procedió a la extracción del látex de papaya, la misma que se realizó mediante incisiones longitudinales en dirección vertical. El corte se inicia en la unión del fruto con el pedúnculo a través de los valles característicos del fruto de papayo, lo que asegura un buen flujo de látex hacia el recolector. El aspecto físico de las papayas después de la extracción del látex se observa en la figura 2.5.



Figura 2.5. Aspecto físico de las papayas criollas después de la recolección del látex.

Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Una vez que se tuvo los recolectores con las muestras de látex se las guardó en un contenedor (cooler) con gelpac congelado, para poder ser transportadas a los laboratorios de Bromatología de la FIMCP y Biología Molecular del CIBE, donde las muestras fueron acondicionadas.

2.5.2. Acondicionamiento de la muestra

Dado que el látex de *Carica papaya* es un líquido viscoso y fácilmente se puede oxidar es conveniente efectuar operaciones que permitan su buen uso en el momento del secado, es por tal motivo que a continuación se describen los procesos de acondicionamiento.

Adición de preservantes

Inmediatamente después de la recolección del látex a cada recipiente recolector se le adicionaron dos aditivos:

- Bisulfito de Sodio en una concentración de 0,5% P/P (peso sobre peso), es un agente preservante, regulador de pH y antioxidante. Evita la oxidación de los grupos sulfhidrilos, los cuales intervienen en la actividad proteolítica. Son activos en la forma reducida e inactivo cuando se oxidan.
- Citrato de sodio en una concentración de 4% P/P; actúa como un agente amortiguador de pH, anticoagulante. Debido a la naturaleza proteínica y a la presencia de peptonas y albuminoides en el látex fresco, este tiende a coagular después de su extracción.

Centrifugación

Para facilitar el paso de la muestra por el secador es recomendable centrifugar el látex. Se utilizó una centrifuga refrigerada (Figura 2.6) y se la programó con una velocidad de 8 000 rpm, por un tiempo de 60 min y a 4°C de temperatura. Con el objetivo de remover el material que pueda

entorpecer el proceso de secado, tales como impurezas, y demás sustancias.



Figura 2.6. Centrifuga Refrigerada
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Microencapsulación

Para la microencapsulación de la papaína se preparó una mezcla de goma arábica con el látex centrifugado de la siguiente forma:

Preparación de la solución de goma arábica

Se preparó una solución que corresponde al 20% del total de la mezcla. A dicha solución se la hizo con una concentración del 25% p/v. Es recomendable disolver la goma en agua destilada a 70°C en una parrilla con agitación.

Preparación de la mezcla de goma arábica con papaína

El 80% restante de la mezcla corresponde al látex centrifugado, una vez que se haya enfriado la solución de goma arábica se procede a mezclar la solución de goma con la papaína y a homogenizar.

2.5.3. Características fisicoquímica

Determinación de ph

Se colocó la muestra microencapsulada en un vaso de precipitación y se procedió a hacer la lectura con el phmetro, el cual debe estar previamente calibrado.

Medición de sólidos solubles totales (°Brix)

Para medir los sólidos solubles totales del látex microencapsulado se utiliza un refractómetro. Es importante la calibración del equipo con agua destilada, logrando así el cero de la escala. Se colocó unas gotas del látex, que está a una temperatura de 20°C, en el campo del refractómetro y se leyó sobre la escala. Posterior a su uso, es importante limpiar con agua destilada en campo del refractómetro, y secar.

Medición de la actividad de agua (a_w)

La a_w se determinó en el equipo Aqua Lab a 25°C, en una celda se colocó 1 g de muestra y se hizo la lectura en el equipo previa calibración del equipo con agua destilada.

Medición del porcentaje de humedad

Para la medición del porcentaje de humedad se utilizó el método de la termobalanza, para ello es necesario colocar de 5 a 8g de la muestra a ser analizada, tratando de que esta quede bien distribuida. Se procede a programar la termobalanza y se anotan los resultados proyectados por el equipo cuando ya no exista variación en la lectura.

2.6. PROCEDIMIENTO DE SECADO

2.6.1. Materiales y Equipo

Para el secado de las muestras se utilizó un Spray Dryer, marca Armfield, modelo FT30 MK III (Figura 2.7).

El equipo permite variar la temperatura de entrada del aire, hasta un máximo de 200°C, así como también el caudal del flujo de la alimentación (0-1500ml/h). Mientras que la temperatura de salida, es un

factor que no se puede controlar, pero si se pueden apreciar los valores obtenidos.



Figura 2.7. Spray dryer
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Este spray dryer opera con un flujo en paralelo descendente, es decir que tanto el aire, que va a un caudal de $70\text{m}^3/\text{h}$ (fijo), como la alimentación se dirigen en una misma dirección.

Según el Manual del equipo, la forma como atomiza la muestra a ser secada es mediante boquillas a presión de dos fluidos, formando así un choro en espiral, el cual evita que la muestra se pegue a la cámara de secado, puesto que gracias a su forma alargada se retarda el tiempo de contacto entre las paredes de la cámara y la sustancia atomizada.

Dentro de los materiales es necesario utilizar fiolas que sirven como alimentador y contenedor del agua de limpieza, y un pincel que permite retirar los restos de papaína que quedan en el ciclón y en el recipiente recolector.

2.6.2. Método

Para la operación adecuada del equipo es indispensable seguir los siguientes pasos:

- Encender el interruptor general del equipo.
- Introducir la goma de silicona hasta el fondo de una fiola que contiene agua destilada.
- Accionar la aspiración
- Seleccionar la temperatura del aire de entrada y encender la calefacción
- Esperar que se alcance la temperatura deseada

- Ajustar la presión al valor deseado y encender el compresor que suministra el caudal de aire de atomización.
- Elegir el valor del caudal de la bomba peristáltica de alimentación. Una vez que el agua llegue a la tobera inicia la atomización.
- Una vez que la temperatura de salida alcance un valor estable, cambiar la goma de silicona de la fiola con agua destilada a la fiola que contiene la muestra a secar. Comprobar que la temperatura de la muestra sea la del ambiente (20°C)
- Una vez que ha pasado toda la muestra, cambiar la goma de silicona de la bomba peristáltica a la fiola con agua destilada. Esperar unos minutos hasta que se limpie la goma de silicona y detener la bomba de alimentación. Apagar el compresor
- Apagar la calefacción y disminuir la temperatura de salida.
- Esperar a que la temperatura de salida del aire sea de unos 30 °C.
- Apagar la aspiración y retirar el recipiente recolector. El polvo adherido de las paredes del ciclón y al recipiente puede ser obtenido con la ayuda de un pincel.
- Empaquetar al vacío para su posterior análisis.
- Finalizado el experimento, desmontar el cilindro de atomización, el ciclón y el recipiente de recogida, limpiar todo cuidadosamente.

En la figura 2.8, se presenta de manera más simplificada el proceso de secado del látex microencapsulado.

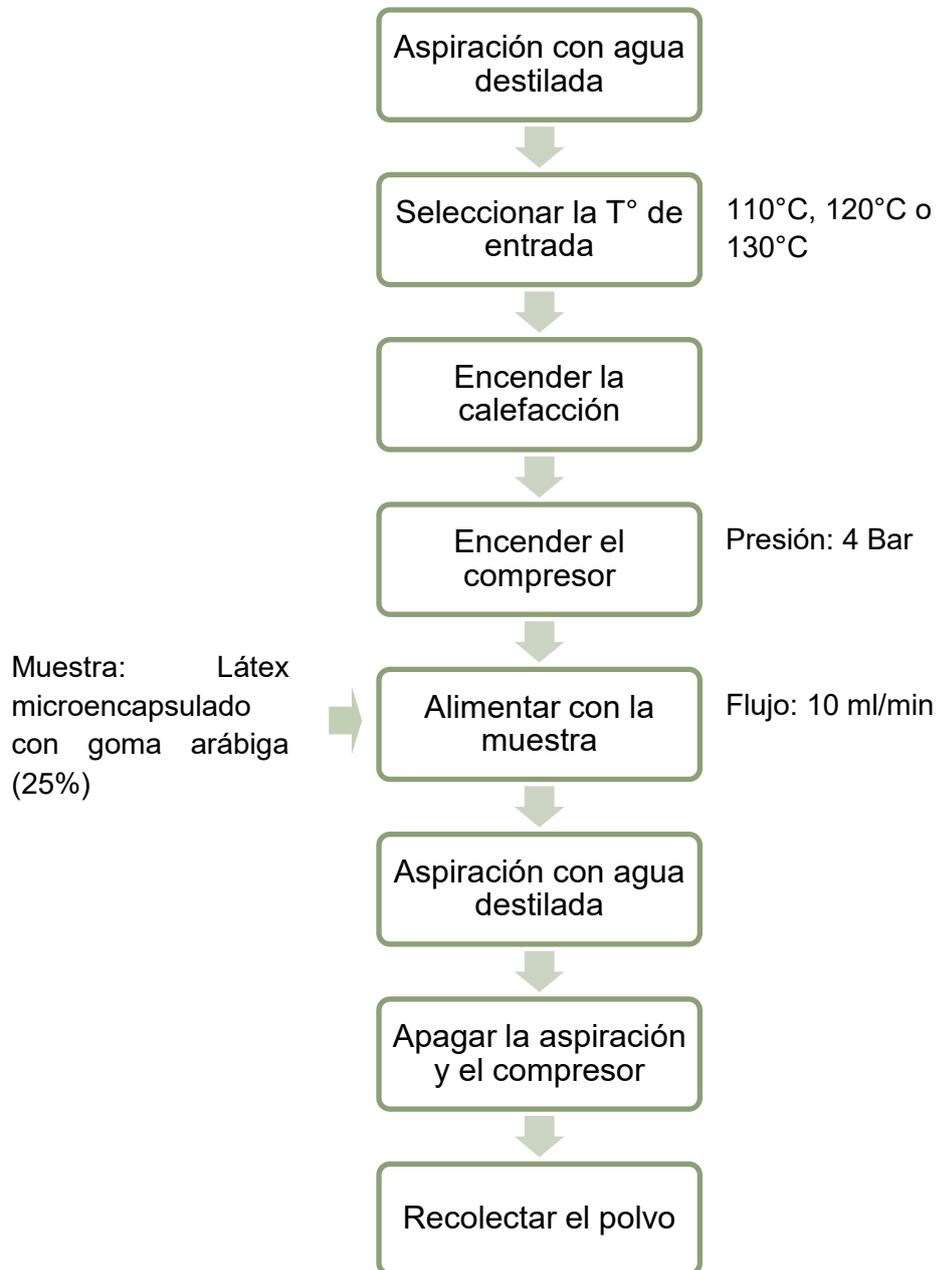


Figura 2.8. Esquema del proceso de secado
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

2.7. Procedimiento de medición de la actividad proteolítica

El siguiente método de medición de la unidad de tirosina fue desarrollado por la empresa estadounidense Enzyme Development Corporation, cuyo protocolo fue tomado de su sitio web. Está basado en la facultad que tiene la papaína para hidrolizar la cisteína, y formar como productos aminoácidos de tirosina, basándose en las condiciones especiales de pH y temperatura para efectuar la reacción.

Para proceder, a retener la reacción se utiliza una solución de ácido tricloroacético al 30%, para posteriormente leer por medio de espectrofotometría las absorbancias.

2.7.1. Materiales, Reactivos y Equipos

Materiales

- Matraces aforados
- Pipetas aforadas
- Embudo de pistilo largo
- Tubos de 25 ml con tapa de rosca
- Tubos de ensayo desechables
- Papel filtro Whatman #1 o equivalente
- Micropipetas

Reactivos

- Fosfato disódico anhídrido
- Caseína Sigma aldrich
- Ácido cítrico monohidratado
- Fosfato de sodio dibásico anhídrido
- L-cisteína
- EDTA
- Ácido tricloroacético
- Agua destilada

Equipos

- Potenciómetro
- Baño de agua a temperatura constante a $40.0^{\circ} \pm 0.1^{\circ} \text{ C}$
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro a 280 nm
- Cronómetro

2.7.2. Método

El método empleado se esquematiza en la figura 2.9, y el desarrollo de este se encuentra descrito en el ANEXO B.

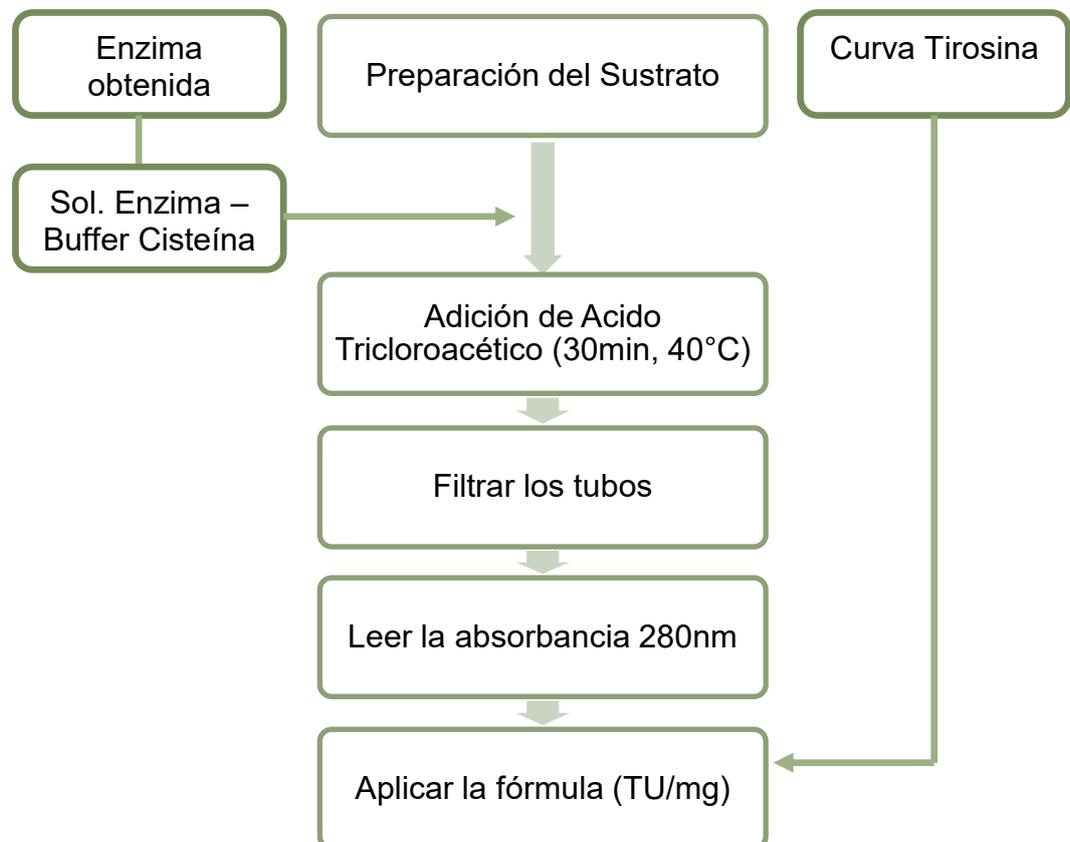


Figura 2.9. Esquema de la determinación de la Actividad Proteolítica
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

2.8. Análisis del látex deshidratado

2.8.1. Características físico-químicas

Se midió el porcentaje de humedad tal como se lo especifica en el numeral 2.5.3, pero en esta ocasión para la papaína cruda microencapsulada con goma arábica.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SECADO PARA LA OBTENCIÓN DE PAPAÍNA CRUDA

Las muestras para ser secadas se prepararon como se indica en el numeral 2.5.2, luego se procedió a medir el porcentaje de humedad de los polvos obtenidos para su determinación de contenido de agua; y también se realizó un respectivo balance de materia según cada temperatura para conocer la cantidad de agua eliminada en cada tratamiento.

Caracterización del látex microencapsulado

En la tabla 5 se presenta los valores obtenidos para cada parámetro físico-químico del látex microencapsulado con goma arábica.

Parámetro	Resultado
pH (25°C)	6,10 ± 0,01
ρ (25 °C)	1,03 ± 0,01 g/ml
Aw (25 °C)	0,97 ± 0,01
Brix (20 °C)	12 ± 1
% Humedad	84,90 ± 0,60

Tabla 5. Parámetros físico-químicos del látex microencapsulado
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

En base a estos resultados se puede definir al látex de Carica Papaya L. de la variedad criolla microencapsulado con goma arábica como un compuesto ligeramente ácido dado que el pH que presenta es de 6,10; este valor ratifica que la enzima no se ha degradado porque está dentro de su óptimo 5,5, - 7 (Wong, 1995).

Además también se puede afirmar que la goma arábica no afecta el pH del látex de Carica papaya L., puesto que según Arana y Quijano, 2012, el ph del látex de la variedad criolla es 6,10 valor que es el mismo al del látex con goma arábica.

El látex presenta un elevado grado de libertad de agua, esto lo corroboramos con los valores obtenidos de la medición de su aw (0,97), con lo cual indica que hay facilidad para la remoción del agua y que esta sustancia es uno de sus componentes mayoritarios (84,90%).

Balance de Materia

Para conocer la cantidad de agua removida en cada tratamiento es conveniente efectuar los respectivos balances según las diferentes temperaturas. Para ello hay que pesar las sustancias involucradas que forman la muestra. En la tabla 6 se encuentran los valores de cada uno de los componentes y el peso total.

Sustancias	Pesos (g)
Látex Centrifugado	51,33 ± 0,10
Goma	3,12 ± 0,01
Agua destilada	12,50 ± 0,01
Peso de la muestra	66,95 ± 0,12

Tabla 6. Peso de los componentes y peso total de la muestra
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Como se puede observar el peso total de la muestra que va a ingresar en el spray dryer es 66,95 g aproximadamente.

Al momento de secar las muestras es importante fijarse los valores de la temperatura de salida, puesto que según las bibliografías consultadas, a estas temperaturas sería aproximadamente a la cual saldrían los polvos. En la tabla 7 se presentan las temperaturas de salida según cada tratamiento.

Temperatura de entrada del aire (°C)	Temperatura de salida del aire (°C)
110	76 ± 2
120	83 ± 2
130	91 ± 2

Tabla 7. Temperaturas de salida según cada tratamiento
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Una vez que se secan las muestras se debe medir el peso del polvo obtenido, en la Tabla 8 se presentan los valores de los pesos del látex seco microencapsulado.

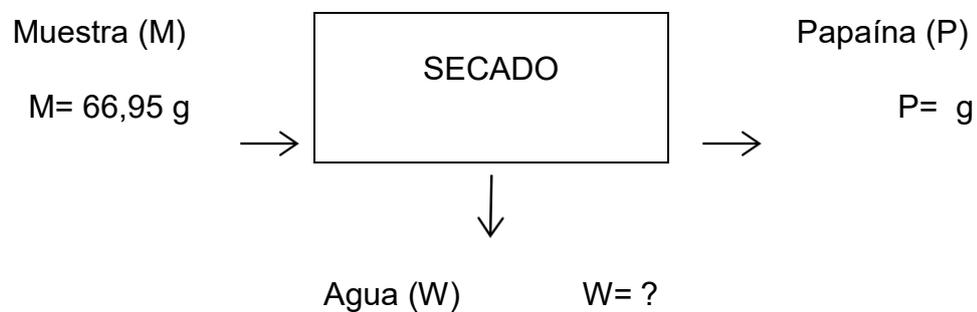
Temperatura	Peso (g)
110 °C	4,46 ± 0,77
120 °C	3,91 ± 0,67
130 °C	3,73 ± 0,63

Tabla 8. Pesos de la papaína deshidratada a diferentes temperaturas
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

De acuerdo a la tabla 8 se observa que se obtiene mayor cantidad de producto, 4,46 g aproximadamente, cuando se opera a 110°C mientras que a 120°C y 130°C se obtiene 3,91 g y 3,73 g respectivamente. Esto se debe a que a menores temperaturas (110°C) no hay tanta remoción del agua presente en el látex microencapsulado. La eficiencia de la deshidratación aumenta conforme incrementa la temperatura.

Una vez obtenido el peso de la sustancia que ingresa al secador (Tabla 6) y la cantidad de polvo obtenida en cada tratamiento (Tabla 8) se procede a efectuar el cálculo de la cantidad de agua perdida y su porcentaje según como se presenta a continuación:

Pérdida de agua a 110 °C



Balance de materia:

$$M - W = P \quad \text{Ec. 2}$$

$$66,95 - W = 4,46$$

$$W = 66,95 - 4,46$$

$$\mathbf{W = 62,49 \text{ g}}$$

Según la Ec. 2, la cantidad de agua perdida cuando se seca papaína microencapsulada a 110°C es aproximadamente de 62,49 g.

Porcentaje de agua pérdida

$$\% \text{ agua perdida} = \frac{W}{M} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

$$\% \text{ agua perdida} = \frac{62,49}{66,95} \times 100$$

$$\% \text{ agua perdida} = 93,34\%$$

Según la Ec. 3, el porcentaje de agua perdida cuando se seca papaína microencapsulada a 110°C es aproximadamente de 93,34%.

Estos cálculos se efectuaron de igual forma para las muestras de papaína microencapsulada secada a 120°C y 130°C. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de las tres temperaturas.

Temperatura de entrada del aire (°C)	Cantidad de agua perdida (g)	% de agua perdida
110	62,49	93,34
120	63,04	94,16
130	63,22	94,43

Tabla 9. Cantidad y Porcentaje de agua perdida de las muestras de látex microencapsulado secado a diferentes temperaturas
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Humedad final del látex microencapsulado

Para conocer el porcentaje de humedad de las muestras de látex microencapsulada secadas a diferentes temperaturas se mide el porcentaje de humedad con la ayuda de la termobalanza. Los resultados arrojados por el equipo se los muestra en la tabla 10.

Temperatura (°C)	Humedad (%)
110	10,60 ± 0,30
120	7,89 ± 0,27
130	6,51 ± 0,35

Tabla 10. Valores experimentales del porcentaje de humedad de la papaína deshidratada a diferentes temperaturas
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

En la tabla 10 se observa que a 110°C se obtiene mayor humedad con un valor de 10,60% aproximadamente, mientras que para 120°C presenta 7,89% y a 130°C hay 6,51% de humedad.

Según Reed, citado por Chaverri, 1983, el porcentaje de humedad del látex seco debe estar entre el 5% y el 8%, y de acuerdo a la tabla 10 las únicas temperaturas que permiten obtener polvos que se ajusten a dicho intervalo son la de 120°C y 130°C. Descartando de esta manera a la temperatura de 110°C como una temperatura adecuada para el secado del látex de papaína microencapsulado.

Otro de los parámetros a considerar para seleccionar una papaína cruda adecuada es la actividad proteolítica, requiriéndose siempre aquella que presente una mayor actividad enzimática. A continuación se presenta los respectivos cálculos efectuados para determinar a qué temperatura se obtiene mayor acción catalítica.

3.2. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA PAPAINA CRUDA

Pendiente de la curva de tirosina

Uno de los valores necesarios para medir la actividad proteolítica es la pendiente de la curva de tirosina, en el Anexo C se muestra los valores de absorbancia y la concentración de tirosina para calcularla.

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{Ec. 4}$$

$$m = \frac{0,24 - 0,18}{(40 - 30)\mu g/ml}$$

$$m = 0,006ml/\mu g$$

De acuerdo a la Ec. 4 la pendiente de la curva de tirosina es 0,006 ml/μg.

Medición de la actividad proteolítica

Para conocer la actividad proteolítica de las muestras de látex microencapsuladas secadas a 110°C, 120°C y 130°C se utiliza la Ec. 5 que se presenta en el en el Anexo B donde se detalla cada uno de sus componentes. También se la muestra a continuación:

$$\frac{TU}{mg} = O.D \times \frac{D.F}{4} \times \frac{20}{60} \times \frac{1}{pendiente} \quad Ec.5$$

En la tabla 11 y 12 se presenta los valores de las absorbancias y los valores de las actividades proteolíticas de las muestras de látex microencapsuladas secadas a 110°C, 120°C y 130°C respectivamente.

A continuación se presenta un ejemplo del cálculo de la actividad proteolítica, utilizando la Ec.5, para el dato proveniente de la fila temperatura 110°C.1 y columna A:

$$\frac{UT}{mg} = 0,515 \times \frac{1}{(0,01)(4)} \times \frac{20}{60} \times \frac{1}{0,006}$$

$$\frac{UT}{mg} = 715,28$$

Cambiando el valor de absorbancia se calcula el resto de actividades.

T° de entrada	Muestra	Absorbancia		
		Blanco	A	B
110°C	1	0,511	0,515	0,488
	2	0,496	0,479	0,503
	3	0,502	0,467	0,457
	4	0,489	0,456	0,503
120°C	5	0,476	0,508	0,511
	6	0,469	0,501	0,499
	7	0,468	0,480	0,466
	8	0,475	0,461	0,450
130°C	9	0,474	0,419	0,423
	10	0,468	0,417	0,409

	11	0,473	0,410	0,412
	12	0,48	0,414	0,403

Tabla 11. Valores de las absorbancias de las muestras de papaína
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Temperatura (°C)	Actividad Proteolítica (TU/mg)
110	715,28
110	665,28
110	648,61
110	633,33
110	677,78
110	698,61
110	634,72
110	698,61
120	705,56
120	695,83
120	666,67
120	640,28
120	709,72
120	693,06
120	647,22
120	625,00
130	595,83
130	579,17
130	569,44
130	575,00
130	587,50
130	568,06
130	572,22
130	559,72

Tabla 12. Valores de actividades proteolíticas de las muestras de papaína
Elaborado por: Jorge Kure – Andrea Yugcha, 2012

Análisis Estadístico

Como se va a evaluar más de dos poblaciones (temperaturas) se usa ANOVA de un solo factor si la población sigue una distribución Normal, o Kruskal-Wallis si la población sigue una distribución No Normal.

En la tabla 12 se encuentran los datos ordenados para ser examinados con la ayuda del programa estadístico Minitab 15.

Para conocer qué tipo de prueba utilizar, se realiza una prueba de hipótesis para los datos de actividad proteolítica obtenida a cada temperatura, y en base a su valor p se decide que prueba será la más adecuada para analizar los datos.

Las hipótesis estadísticas planteadas para las actividades proteolíticas provenientes de los látex microencapsulados secados a las temperaturas de 110°C, 120°C y 130°C, son las que se muestra a continuación:

H_0 : Los datos siguen una distribución normal

H_1 : $\neg H_0$

Donde:

H_0 : Es la hipótesis nula y H_1 : Es la hipótesis alterna

A continuación se muestran los gráficos obtenidos según la prueba de normalidad de Anderson-Darling aplicada a cada una de las temperaturas.

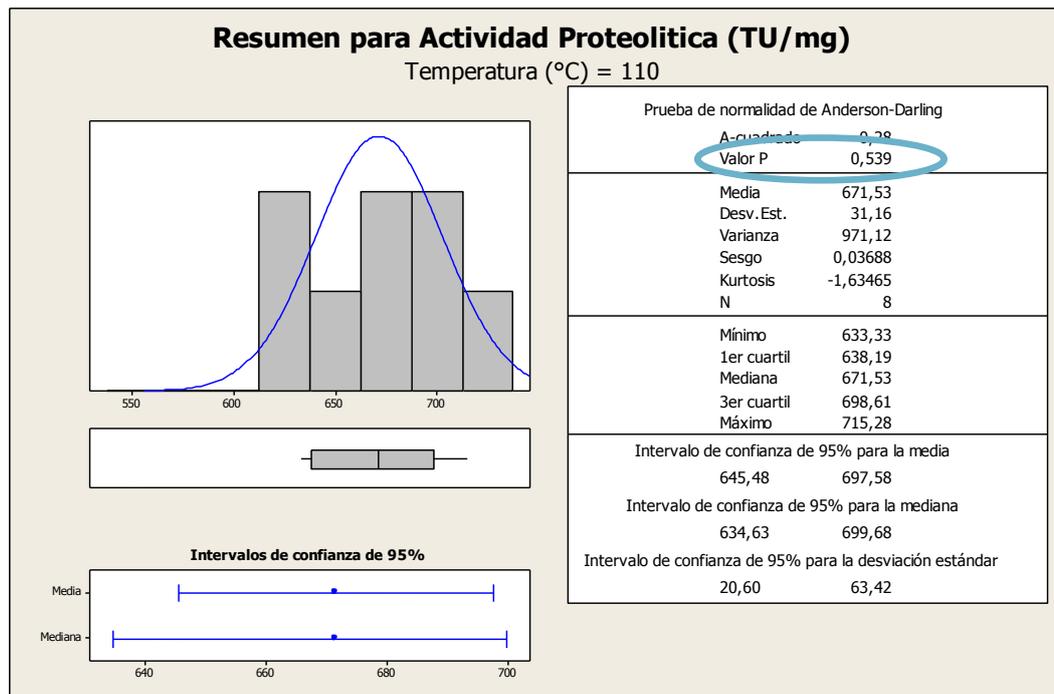


Figura 3.1. Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 110°C
Fuente: Minitab 15

Dado que el valor p en la figura 3.1 es mayor a 0,005 (0,539), no existe evidencia estadística suficiente para rechazar H_0 ; por lo tanto los datos de las actividades proteolíticas de las muestras de látex microencapsulado secadas a 110°C siguen una distribución NORMAL. A esta temperatura se tiene una actividad proteolítica de $671,53 \pm 31,16$ TU/mg.

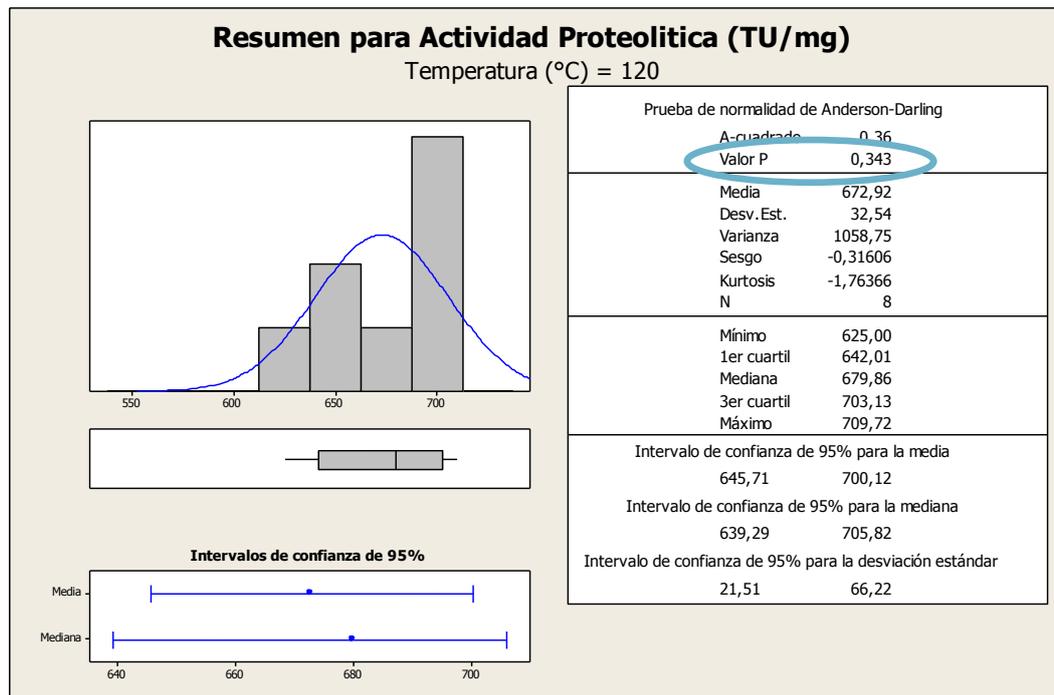


Figura 3.2. Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 120°C
Fuente: Minitab 15

Dado que el valor p en la figura 3.2 es mayor a 0,005 (0,343), no existe evidencia estadística suficiente para rechazar H_0 ; por lo tanto los datos de las actividades proteolíticas de las muestras de látex microencapsulado secadas a 120°C siguen una distribución NORMAL

A esta temperatura se tiene una actividad proteolítica de $672,92 \pm 32,54$ TU/mg.

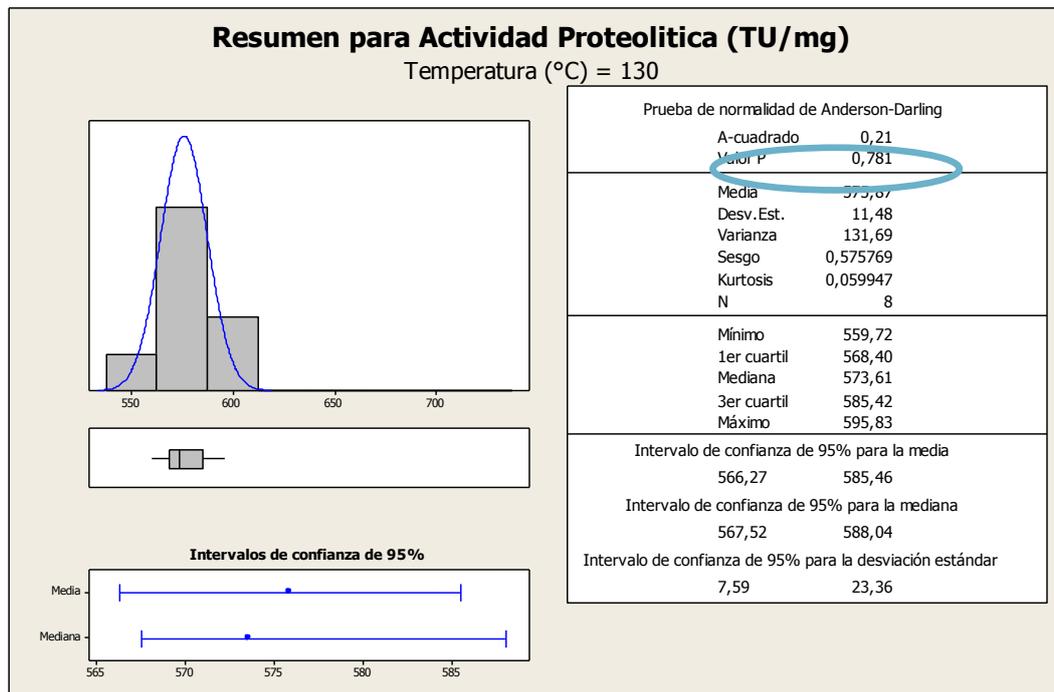


Figura 3.3. Resumen estadístico para la actividad proteolítica de las muestras de papaína cruda secadas a 130°C
Fuente: Minitab 15

Dado que el valor p en la Figura 3.3 es mayor a 0,005 (0,781), no existe evidencia estadística suficiente para rechazar H_0 ; por lo tanto los datos de las actividades proteolíticas de las muestras de látex microencapsulado secadas a 120°C siguen una distribución NORMAL.

A esta temperatura se tiene una actividad proteolítica de $575,87 \pm 11,48$ TU/mg.

ANOVA DE UN SOLO FACTOR

Una vez comprobado que los datos presentan una distribución normal, se los puede analizar mediante la prueba paramétrica ANOVA, para ver si existe diferencia significativa entre los datos de actividad proteolítica de las muestra de papaína secadas a diferentes temperaturas.

La hipótesis estadística para ser evaluada es la siguiente:

$$H_0: \mu_{110} = \mu_{120} = \mu_{130}$$

vs

H_1 : Al menos una igualdad no es cierta

Donde:

μ_{110} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 110°C

μ_{120} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 120°C

μ_{130} : la media de la actividad proteolítica de las muestras secadas a 130°C

ANOVA unidireccional: Actividad Proteolítica (TU/mg) vs. Temperatura (°C)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Temperatura (°C)	2	49523	24762	34,37	0,000
Error	21	15131	721		
Total	23	64654			

s = 26,84 F-cuad. = 76,60% R-cuad. (ajustado) = 74,37%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
110	8	671,53	31,16	(-----*-----)
120	8	672,92	32,54	(-----*-----)
130	8	575,87	11,48	(-----*-----)

560 595 630 665

Desv.Est. agrupada = 26,84

Figura 3.4. Resultado del análisis Anova para la Actividad Proteolítica (TU/mg) vs. Temperatura (°C)
Fuente: Minitab 15

Como se indica en la figura 3.4, el estadístico R-Cuadrado presenta un valor mayor al 70%, lo cual establece que el modelo propuesto si tiene robustez. Esto quiere decir que el modelo explica el 76,60% de la variación de la actividad proteolítica de la papaína cruda microencapsulada con goma arábica referente a la variación de temperatura de entrada del aire y por lo tanto el modelo propuesto es adecuado.

Además el valor p es 0,000 por lo cual se rechaza H_0 ; es decir que existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 con un nivel de confianza del 95%, por lo tanto por lo menos una de las actividades

proteolíticas de las muestras de papaínas secadas a diferentes temperaturas es distinta del resto.

Para conocer cuál de las temperaturas, a las cuales se seca el látex microencapsulado presenta diferente actividad proteolítica, se analiza el gráfico de cajas, el mismo que se presenta a continuación.

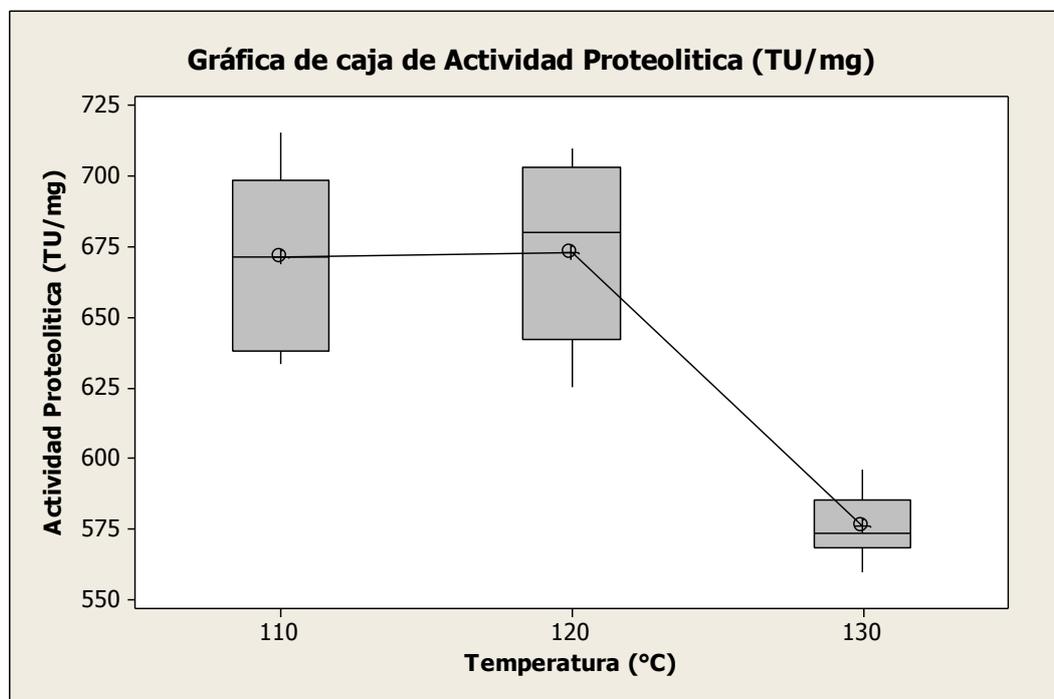


Figura 3.5. Gráfico de caja de actividad proteolítica para las muestras de papaína cruda secadas a secadas a 110°C, 120°C y 130°C
Fuente: Minitab 15

En la figura 3.5 se observa que los datos de la actividad proteolítica de las muestras de papaína secadas a 130°C son muy diferentes a los de 110°C y 120°C, y no se toman en consideración puesto que el objetivo

de esta tesis es obtener la temperatura de secado a la cual se puede obtener una mayor actividad proteolítica.

La razón por la cual a 130°C se presentan bajos valores de unidades de tirosina, puede ser debida a que cierta cantidad de enzimas se hayan desnaturalizado, es decir que los puentes de disulfuro entre los aminoácidos de cisteína se vieron afectados, y por ende no hay la suficiente cantidad de producto (tirosina) para ser leído. Esto se corrobora con la información obtenida de la revista Información tecnológica, 1998; donde indica que se puede obtener un buen secado hasta 90°C y nuestros valores llegaron a 91°C \pm 2°C, como se mostró en la tabla 8, comprobando así que la papaína si es termorresistente porque sino la actividad hubiese sido nula; sólo que a partir de una temperatura de entrada de aire de 130°C, la actividad de la papaína ya comienza a descender considerablemente.

Una vez descartada la temperatura de entrada de 130°C, es necesario comparar los datos de las actividades proteolíticas de las muestras secada a 110°C y 120°C, para conocer si hay diferencia entre estos dos datos, razón por la cual se ejecuta la prueba de Tukey, la misma que

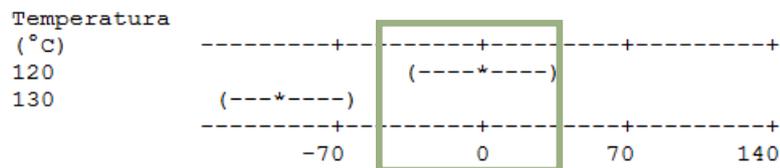
efectúa la comparación entre las tres temperaturas. A continuación, en la figura 3.6 se presentan los resultados obtenidos de la prueba.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Temperatura

Nivel de confianza individual = 98,00%

Temperatura (°C) = 110 restado de:

Temperatura (°C)	Inferior	Centro	Superior
120	-32,40	1,39	35,17
130	-129,45	-95,66	-61,87



Temperatura (°C) = 120 restado de:

Temperatura (°C)	Inferior	Centro	Superior
130	-130,83	-97,05	-63,26

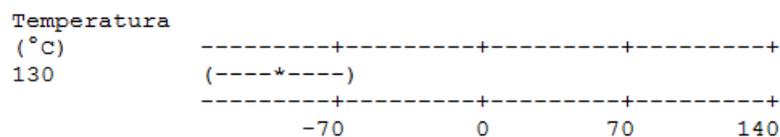


Figura 3.6 Prueba de Tukey para las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Temperatura
Fuente: Minitab 15

Dado que en la comparación entre la temperatura de 110°C y 120°C, el intervalo presentado si incluye el cero se puede decir que, la actividad proteolítica de las muestras secadas a 110°C es igual a la actividad proteolítica de las muestras secadas a 120°C.

Por lo tanto, en base a la actividad proteolítica, el látex de *Carica papaya* L. microencapsulado con goma arábica puede ser secado por aspersion con temperaturas de entrada de aire de 110°C y 120°C, puesto que a estos valores se obtendrá las mayores actividades proteolíticas, pero como también es necesario un bajo porcentaje de humedad en el látex seco, la operación a 110°C no sería factible puesto que como se observa en la tabla 10 a esta temperatura no se ajusta con el intervalo deseado de porcentaje de humedad (5% - 8%). Quedando como mejor alternativa para el secado de látex microencapsulado con goma arábica, la temperatura 120°C, con un flujo de alimentación de 10ml/min, 4 bares de presión y 25% de goma arábica.

Al comparar la actividad proteolítica del látex de *Carica papaya* L. secado por aspersion con otros métodos de secado (Tabla 13), es importante percatarse que se obtiene mayor actividad enzimática cuando se procesa el látex por medio de secado por aspersion, puesto que en esta operación el contacto entre el producto y el aire de secado son relativamente cortos, efectuando una adecuada deshidratación y provocando pocos daños en las enzimas.

El látex liofilizado es el que presenta una segunda mejor actividad proteolítica, esto se produce porque se efectúa a vacío, con lo cual no hay contacto con el oxígeno, factor que altera la actividad enzimática. El inconveniente en este proceso es el costo que implica la operación mediante este tipo de secado. Además, el tiempo de operación de este proceso, y el del resto de métodos de secado que se continúan mencionado, es largo (5 - 6h aproximadamente).

Método de Secado	Actividad Proteolítica (TU/mg)	Aspecto	Tratamiento adicional
Por atomización	672,92 ± 32,54	Polvo blanco	-
Liofilización	318,89 ± 12,68	Polvo blanco	-
Secado al vacío	279,03 ± 10,87	Polvo cremoso	Molienda
Con Aire caliente	260,91 ± 10,87	Polvo oscuro y grumoso	Molienda
Secado al Sol	239,17 ± 9,06	Polvo más oscuro, muy grumoso	Molienda

Tabla 13. Comparación de las actividades proteolíticas según diferentes métodos de secado
Fuente: Chaverri, 1983

El látex secado a vacío tiene una elevada actividad proteolítica debido a que no hay exposición al aire durante el secado, y como ya se mencionó el oxígeno es un factor que altera la actividad proteolítica; además de

que por ser al vacío se efectúa a una menor temperatura (50°C - 55°C) con lo cual no se afecta tanto la actividad enzimática.

Por otra parte, cuando se seca con aire caliente se obtiene una menor actividad proteolítica en comparación con el método anterior debido a la presencia de oxígeno. Además, por este método es necesario efectuar la molienda, porque no se obtiene un polvo, dicha operación también puede afectar la actividad debido a la fuerza de fricción que tiene que ocurrir en la reducción del tamaño de partículas, con lo cual se somete al producto a más calentamiento y más exposición al aire; por lo tanto se afecta todavía más a la actividad proteolítica.

Finalmente, el secado al sol es el que presenta menor actividad proteolítica que todos los métodos de secado, porque los rayos solares y el oxígeno atmosférico ejercen acción oxidativa sobre la papaína cruda. El producto obtenido en este método de secado, también necesita una molienda posterior, con lo cual se presenta los mismos problemas mencionados en el secado con aire caliente.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La goma arábica actúa como un buen agente de secado para el látex de papaína centrifugado, puesto que esta no varía el pH de la sustancia lo cual permite conservar la actividad de la enzima. Además de que evita la formación de aglomerados durante el secado por aspersión y le brinda protección a la papaína.
- Al momento de seleccionar una enzima es importante tener en consideración los parámetros bajo los cuales se haga la selección, por lo general se desea que tengan una elevada actividad proteolítica y un bajo contenido de humedad. Estos requerimientos se pueden conseguir cuando se seca por aspersión el látex de papaya microencapsulado con goma arábica a una temperatura de entrada de aire de 120°C, con un flujo de alimentación de 10ml/min, 4 bares de presión y 25% de goma arábica.

- Si el único parámetro es la obtención de mayor actividad proteolítica del látex microencapsulado de *Carica papaya* L., se puede operar con temperaturas de entrada de aire de 110°C y 120°C, puesto que a estas temperaturas se obtiene actividades proteolíticas de 671,53±31,16 TU/mg y 672,92±32,54 TU/mg respectivamente; y de acuerdo al análisis de varianza no existe diferencia significativa entre estos tratamientos térmicos.
- Cuando la temperatura de entrada del aire que va a secar la papaína cruda microencapsulada con goma arábiga es de 130°C se obtiene una actividad proteolítica menor (575,87±11,48 TU/mg). Esta actividad es menor, puesto que con dicho valor se obtiene una temperatura en la enzima de alrededor de 91±2°C, y al presentar valores mayores a 90°C se presenta una desnaturalización en la enzima, logrando así la pérdida de su actividad proteolítica al ser alterados los puentes disulfuros que intervienen en la formación de su sitio activo.
- El porcentaje de humedad final de las muestras secadas por aspersión a 130°C es 6,51±0,35%, mientras que a 110°C y 120°C es 10,60±0,30% y 7,89%±0,27% respectivamente. El menor valor de

humedad se presenta a 130°C porque en la cámara de secado al ser constante el flujo con el que ingresa en la zona de secado en los tres tratamientos, se produce una mayor remoción del agua de la sustancia atomizada en aquel que tenga mayor transferencia de calor y de masa y esto se logra a 130°C.

- La actividad proteolítica depende del tratamiento de secado realizado. En base a este estudio el proceso de secado por aspersión es la mejor alternativa para la deshidratación del látex de *Carica papaya L.*, puesto que con este proceso se obtiene una mayor actividad enzimática, la cual es $672,92 \pm 32,54$ TU/mg, en comparación con la liofilización y el secado al vacío, procesos con los cuales tampoco se requieren un tratamiento posterior del polvo. Las actividades enzimáticas de los tratamientos de liofilización y secado al vacío fueron $318,89 \pm 12,68$ TU/mg y $279,03 \pm 10,87$ TU/mg respectivamente, datos tomados de referencia bibliográfica.
- Sería recomendable que se elabore un proyecto de implementación de una planta de procesadora de papaína cruda, para así poder conocer la rentabilidad económica del proceso.

- Se propone que se efectuó un estudio de purificación de la enzima papaína para conocer el porcentaje de diferencia de la actividad proteolítica entre un látex purificado secado por aspersion y otro no purificado.
- Sería recomendable efectuar proyectos que promuevan el desarrollo de nuevos productos a base de papaya, puesto que los frutos después de la extracción adquieren un aspecto físico que no es tan agradable para la venta en supermercados.

ANEXO A

Influencia de los factores en las características del producto secado por atomización

Parámetro / Dependencia	Caudal de aire de atomización	Caudal de líquido de entrada	Concentración de solutos a atomizar	Caudal del aire de secado	Humedad del aire de entrada	Temperatura de entrada
Humedad final del producto	No afecta	Mayor humedad pues más agua conduce a una P. parcial más alta	Menor humedad porque haya menos agua para evaporar, menor P. parcial	Mayor humedad pues baja la P. parcial del agua evaporada	Mayor humedad porque hay una P. parcial más alta del aire de secado	Menor humedad por menor humedad relativa del aire de entrada
Rendimiento de producción	No afecta	Depende de la aplicación	Mayor, partículas mas grandes conducen a una mejor separación	Mayor rendimiento en la separación del ciclón	Menor rendimiento debido a mayor humedad	Mayor rendimiento porque se evita la pegajosidad
Temperatura de salida	Mas cantidad de aire fresco que tiene que calentarse	Menor T° pues se evapora más cantidad de agua	Mayor T° porque es menor la cantidad de agua evaporada	Mayor T° pues hay menos perdidas de calor	Mayor T°, mas energía almacenada en humedad	Mayor T° de salida, hay una proporción directa
Tamaño de partícula	Disminuye el tamaño pues aumenta la energía para la dispersión	Mayores partículas pues hay mayor cantidad de fluido	Mayor tamaño pues hay mas producto	No afecta	No afecta	No afecta

ANEXO B

MÉTODO ANALÍTICO DE LA UNIDAD DE TIROSINA (TU)

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

Preparación de reactivos:

Sustrato de caseína

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

suficiente de agua para que el vaso este estable y no derrame su contenido.

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

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

- 1) Colocar en un agitador magnético un vaso de precipitado de 1000 ml o más.
- 2) Añadir aproximadamente 400 ml de agua destilada.
- 3) Agregar cuantitativamente:

3,55 g de fosfato de sodio dibásico anhídrido

3,05 g de L-cisteína

7,00 g de EDTA

- 4) Agitar todos los ingredientes hasta disolverlos.
- 5) Ajustar el pH del búfer a 6.0 con ácido cítrico monohidratado previamente preparado.
- 6) Transferir el búfer a un matraz aforado de 500 ml y enrazar en agua destilada.
- 7) Repetir el procedimiento anterior si necesita más búfer.

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

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

Análisis de la actividad enzimática

Preparación de la enzima

- 1) Disolver una cantidad apropiada de la enzima en la solución búfer de Cisteína-Versene. Usar el mismo búfer si requiere diluciones seriadas. La enzima diluida 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 (se recomienda utilizar concentraciones del orden de 0.0005g/ml de búfer para realizar el análisis de papaina).

Cálculo para la preparación de la enzima: La Ec. 1 nos indica como calcular la cantidad de enzima en gramos.

$$\text{Peso de la muestra en gramos} = \frac{0.2600 \times (\text{curva de tirosina})}{\text{TU/g (Objetivo)}} \quad \text{Ec.1}$$

Evaluación de la enzima: Cada juego de pruebas consiste de 2 pruebas de enzimas y un blanco. Proceda de la siguiente forma:

- 1) Transferir 10.0 ml del sustrato de caseína en 3 tubos de 25 ml etiquetados, dos para cada enzima y uno para el blanco.
- 2) Equilibrar los tubos a 40° C por aproximadamente 10 minutos.
- 3) Al tiempo cero iniciar el cronómetro y añadir 4.0 ml de la solución de la enzima al primer tubo. Cerrar el tubo e invertir suavemente varias veces. Poner el tubo en un baño de agua a 40° C. Continuar la adición de la enzima a cada tubo, excepto al blanco, a intervalos suficientes (se recomienda 1 minuto).

- 4) Después de exactamente 60 minutos añadir rápidamente a cada tubo con la preparación de la enzima 6.0 ml de la solución TCA. Agitar vigorosamente y regresar los tubos al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
- 5) Para preparar el blanco añadir 6.0 ml de solución TCA al sustrato de caseína seguido por 4.0 ml de enzima. Agitar vigorosamente y regresar el tubo al baño de agua por 30 minutos a 40° C para completar la coagulación de la caseína precipitada.
- 6) Al final de los 30 minutos remover cada tubo del baño de agua y permitir que se enfríen a temperatura ambiente.
- 7) Una vez fríos filtrar a través de papel filtro Whatman #1 o equivalente (los tubos pueden ser agitados antes de filtrarlos para despegar la proteína precipitada). Filtrar de nuevo a través del mismo papel filtro.
- 8) Leer la absorbancia de los filtrados en una cuveta de 1 cm a 280 nm usando aire para iniciar el espectrofotómetro en cero. Corregir el valor de A280 de cada enzima sustrayendo la lectura del blanco de cada muestra.

La curva de tirosina

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

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

- 3) Determinar 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 por ml. Use HCl 0.1N para iniciar el instrumento en cero.
- 4) Graficar la absorbancia contra la concentración de tirosina.
- 5) Determinar la pendiente en términos de absorbancia por µg de tirosina (la pendiente debe caer entre 0.0064 y 0.0076).

Cálculos

Definición de unidad: Una unidad de potencia puede ser definida como la unidad que al actuar sobre el sustrato de caseína bajo las condiciones específicas produce un microgramo de tirosina por minuto.

El número de TU/g en una mezcla de digestión o contenida en la cantidad preparada de enzima se calcula como se indica en la Ec.2:

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

$$D.F = \frac{1}{concentracion\ final\ de\ la\ enzima\ \left(\frac{mg}{ml}\right)} \quad Ec. 3$$

Donde:

O.D. = Densidad óptica de la prueba menos la densidad óptica del blanco

D.F. = Factor de dilución de la solución de enzima (1/concentración final de la enzima)

4 = Volumen de la solución de enzima inyectada

20 = Volumen total del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA)

60 = Duración de la hidrólisis en minutos

Pendiente = Pendiente obtenida de la curva de tirosina (ver la curva de tirosina).

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

Por lo tanto:

$$Actividad\ UT = \frac{A280\ del\ filtrado\ x\ factor\ de\ la\ curva\ de\ tirosina}{concentracion\ final\ de\ la\ enzima\ \left(\frac{mg}{ml}\right)} \quad Ec. 4$$

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%.

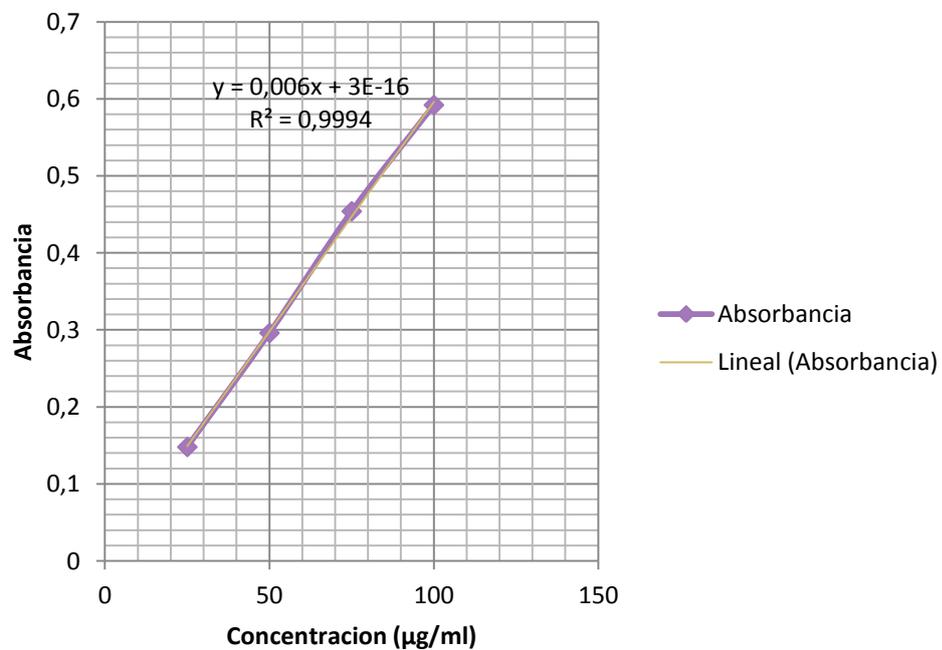
ANEXO C

Curva Patrón de Tirosina

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

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

Se grafican los datos de las absorbancias obtenidas con respecto a las distintas concentraciones de Tirosina (μg) y se realiza un ajuste de datos para obtener la ecuación de la recta que se muestra a continuación:



BIBLIOGRAFÍA

- ARANA, P.; QUIJANO, M. “Extracción, Caracterización y Comparación de Látex Obtenido, en Secado por Aspersión, de tres Variedades de Papaya (Carica papaya L.)”. (Tesis presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral para la obtención del Título de Ingenieras de Alimentos, 2012)
- BACHMAN, K. Biología para médicos. Editorial Reverté S.A, Barcelona-España, 1978. Págs. 27-30
- BADUI, Salvador. Química de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Alhambra Mexicana, México D.F.- México, 1990. Pág. 123 - 293
- BELLO, José. Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos. Editorial Díaz de Santos. Madrid-España, 2000. Págs. 65 y 66.

- BERINGER, Paul. Remington: The Science and Practice of pharmacy. 21 edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2005. Pág. 904.
- BERNAL, J.; TAMAYO, A.; et al. Frutales de Clima Cálido. Cartilla divulgativa, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Colombia, 2001. Pág. 4
- CHAVERRI, Alejandra. “Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos” (Tesis presentada en la Universidad de Costa Rica para la obtención del Título de Tecnóloga en Alimentos, 1983)
- FERRAO, M.; JACOME C. “Obtención y determinación de la actividad proteolítica de las enzimas de papaya (carica papaya Linné)”. (Tesis Colectiva presentada en la Universidad Veracruzana para la obtención del Título de Químico Farmacéutico Biólogo, 1977)
- GUANANGA, L.; GUTIERREZ, M.; PUCHA, J. “Cadena logística de exportación papaya hawaina variedad solo”. (Tesis presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral para la obtención del Título de Ingeniero comercial, 2009)

- HELDMAN, D.; HARTEL, R. Principles of food processing. An Aspen Publication, USA, 1997. Págs. 204-210
- JIMÉNEZ, José. Manual práctico para el cultivo de la papaya. Editorial EARTH. Guacimo, Costa Rica, 2002. Pág. 4
- LEÓN, JORGE. Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales. Primera Edición. Editorial IICA, Lima - Perú, 1968. Págs. 417-422.
- MARTÍNEZ, L. “Dimensionamiento y Simulación de un Secador por Aspersión de Nivel Piloto”. (Tesis presentada en el Instituto Politécnico Nacional para la obtención del título de Maestro en Ciencias en Bioprocesos, México, 2009)
- MAUPOEI, P.; GRAU, A.; et al. Introducción al secado de alimentos por aire caliente. Editorial de la UPV, Valencia-España, 2001. Págs. 34-36.
- MIRAVET, G. “Secado por Atomización de Zumo de Granada”. (Tesis presentada en la Universidad Politécnica de Cartagena para la obtención del título de Máster en Ingeniería Ambiental y Procesos Químicos y Biotecnológicos, 2009)

- MURRAY, R; MAYES P.; et al. Bioquímica de Harper. 14th edición. Manual Moderno, 2005. Págs. 11 y 12.
- NIKOLAI, Shararapin. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Quebecor Impreandes, Bogotá-Colombia, 2000. Pág. 208.
- NONHEBEL, G.; MOSS, A. El secado de los sólidos en la industria química. Editorial Reverté S.A., Barcelona- España, 2002. Págs. 295-307
- NURIA, C.; MOFERRER, A.; VILLALTA, J. Aditivos Alimentario. Colección Tecnología de alimentos. Editorial Mundi-Prensa, Madrid-España, 2002. Págs. 135-136.
- ORREGO, Carlos. Procesamiento de Alimentos. Primera Edición. Universidad Nacional de Colombia. Manizales-Colombia, 2003.Págs. 208-2014
- POLAINA J.; MACCABE A. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Editorial Springer, Netherlands, 2007.Pág. 187

- PRIMO, Eduardo. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. TOMO II. Editorial Reverté, Barcelona-España, 1995 .Págs. 1052, 1053.
- REYES, Luis. “Optimización y Caracterización de la Microencapsulación de la Proteasa Hemisfericina Refinada”. (Tesis presentada en Instituto Politécnico Nacional para la obtención del título de Maestro en Ciencias en Bioprocesos, 2010)
- TEIXEIRA DA SILVA; et al. Tree and Forestry Science and Biotechnology. Papaya biology and biotechnology. Global Science Books, Japón, 2007.
- WHITAKER, J.; VORAGEN, A.; WONG, D. Proteolytics enzymes: Handbook of food enzymology, New York, 2003. Pág. s.n.
- WONG, DOMINIC. Food Enzymes: Structure and Mechanism. Chapman & Hall, USA, 1995. Págs. 139-142

FUENTES ELECTRÓNICAS

- 3 variedades de papaya. Disponible en <http://www.elcomercio.com>. Consultado en: Agosto 2012.
- FT30 MKIII Spray Drier-Provisional. Disponible en: <http://www.discoverarmfield.co.uk>. Consultado en: Agosto 2012.
- Método analítico de la unidad de tirosina desarrollado por Enzyme Development Corporation. Disponible en: <http://www.enzymedevelopment.com>. Consultado en: Agosto, 2012.
- Revista Información Tecnológica. Secado y Conservación de Proteasas en Látex de Carica-Papaya: Diseño de un secador Continuo. Volumen 9. Disponible en: <http://books.google.com.ec>.1998