

**OBTENCIÓN DE PAPAÍNA A PARTIR DEL LÁTEX DE LA *Carica papaya*
POR MEDIO DE UN SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS**

JUAN DAVID BALCÁZAR VALENCIA
ANGÉLICA MARÍA VICTORIA STERLING

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2012

**OBTENCIÓN DE PAPAÍNA A PARTIR DEL LÁTEX DE LA *Carica papaya*
POR MEDIO DE UN SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS**

JUAN DAVID BALCÁZAR VALENCIA
ANGÉLICA MARÍA VICTORIA STERLING

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero
químico

Director:

Jaime Restrepo Osorio, Ph.D

Codirector:

John Wilman Rodriguez, M.Sc

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2012

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por proporcionarnos las herramientas necesarias para conseguir este logro y por las múltiples bendiciones recibidas.

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todas las personas que aportaron al desarrollo exitoso de este trabajo de grado.

Al Doctor Jaime Restrepo y al Ingeniero John Wilman Rodríguez por orientarnos durante la investigación.

A Gloria Lasso y monitores del laboratorio de investigaciones de la Escuela de Ingeniería Química, por su constante apoyo y disponibilidad.

A Ronny Orobio y al profesor Yesid Zambrano por su acompañamiento durante las largas jornadas en el laboratorio.

A los profesores de la Escuela de Ingeniería Química por contribuir a nuestro desarrollo como profesionales integrales.

A nuestros compañeros y todas las personas que nos acompañaron durante todo el proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ANTECEDENTES.....	4
3. MARCO CONCEPTUAL.....	5
3.1 ENZIMAS.....	5
3.1.1 Actividad enzimática.....	6
3.1.1.1 Concentración del sustrato	6
3.1.1.2 Concentración de la enzima	6
3.1.1.3 Cambios en la temperatura.....	7
3.1.1.4 Cambios en el pH.....	7
3.1.2 Hidrolasas.....	7
3.1.3 Espectrometría Infrarroja	8
3.2 PAPAÍNA	9
3.2.1 Características de la enzima	9
3.2.2 Fuente de obtención	10
3.3 SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS (SDFA).....	12
3.4 MERCADO DE LA PAPAÍNA.....	14
3.4.1 Tamaño del mercado	14

3.4.2 Tipos de mercado	15
3.4.2.1 Industria de las bebidas alcohólicas	15
3.4.2.2 Industria de la carne	16
3.4.2.3 Industria farmacéutica y cosmética	16
3.4.3 Uso de la papaína como enzima sustituta	16
3.4.4 Evolución tecnológica en los procesos de producción.....	17
 4. METODOLOGÍA	 18
4.1 MÉTODO EXPERIMENTAL	18
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA EDAD DE LOS FRUTOS	21
4.3 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX DE LA PAPAYA	22
4.4 PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA.....	23
4.5 PRECIPITACIÓN Y LIOFILIZACIÓN	24
4.6 ENSAYO CUALITATIVO DE BIURET.....	26
4.7 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	26
4.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	27
 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 30
5.1 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX DE LA PAPAYA	30
5.2 PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA.....	31
5.3 PRECIPITACIÓN Y LIOFILIZACIÓN.....	34
5.4 ENSAYO CUALITATIVO DE BIURET.....	37
5.5 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	37
5.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	40
5.7 ANÁLISIS DE INFRARROJO.....	44
5.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES	47
5.8.1 Análisis de varianza y diagrama de pareto.....	48
5.8.2 Superficies de respuesta	50
5.8.3 Evaluación del modelo estadístico	52
5.9 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE PURIFICACIÓN	53

6. CONCLUSIONES	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Características de las enzimas presentes en el látex de la <i>Carica papaya</i>	11
Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas en las que se utiliza papaína	17
Tabla 3. Variables y niveles del diseño factorial 2^4 con punto central.....	18
Tabla 4. Valores de las variables para cada experimento	24
Tabla 5. Protocolo para el ensayo cuantitativo de Biuret.....	27
Tabla 6. Cantidad de látex por extracción.....	30
Tabla 7. Relación de fases experimental y teórica.	34
Tabla 8. Relación de fases experimental para el proceso de separación de la enzima disuelta en el PEG	35
Tabla 9. Mediciones de absorbancia para las soluciones estándar de BSA	38
Tabla 10. Concentración de proteína en las muestras	39
Tabla 11. Mediciones de absorbancia para las soluciones estándar de papaína	40
Tabla 12. Actividad específica de las muestras.....	42
Tabla 13. Actividad enzimática de las muestras	43
Tabla 14. Valores para el espectro IR de la papaína estándar.....	44
Tabla 15. Valores para el espectro IR de la muestra.....	44
Tabla 16. Comparación de las bandas teóricas de la papaína con las de la muestra.....	47
Tabla 17. Análisis de varianza ANOVA para la actividad específica de la enzima	48
Tabla 18. Valores de los coeficientes para el ajuste del modelo.....	53

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la papaína.....	10
Figura 2. Distribución esquemática de las moléculas en un SDFA.....	13
Figura 3. Diagrama de fases en equilibrio para PEG 6000-sulfato de amonio-agua a 298,15K	19
Figura 4. Diagrama de bloques del procedimiento experimental	20
Figura 5. Caracterización de la edad de los frutos	21
Figura 6. Extracción del látex de los frutos verdes	22
Figura 7. Liofilización de las muestras	25
Figura 8. Muestras en el baño térmico para la prueba de actividad enzimática	28
Figura 9. Sistema de dos fases acuosas (SDFA).....	31
Figura 10. Diagrama de fases en equilibrio para PEG 6000-sulfato de amonio-agua con puntos de operación	33
Figura 11. Muestras liofilizadas que se almacenaron herméticamente.....	36
Figura 12. Prueba cualitativa de Biuret.....	37
Figura 13. Curva de calibración con BSA	38
Figura 14. Curva de calibración con papaína estándar.	41
Figura 15. Espectro IR de la papaína estándar.....	45
Figura 16. Espectro IR de la muestra.....	45
Figura 17. Diagrama de Pareto estandarizado para la actividad específica de la enzima....	49
Figura 18. Gráficas de superficie de respuesta para la actividad enzimática.....	51
Figura A1. Centrífuga refrigerada.....	62
Figura A2. Liofilizador.....	62
Figura A3. Espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific.....	63
Figura A4. Espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300.....	63

ABREVIATURAS

% p/p	Porcentaje másico
%T	Transmitancia
[P]	Concentración de proteína (mg/ml)
°C	Grados centígrados
AE	Actividad enzimática (U/ml)
A_{esp}	Actividad específica (U/mg)
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Seroalbúmina bovina
Da	Dalton
IR	Infrarrojo
K	Kelvin
LLC	Longitud de línea de corte
M	Concentración molar (mol/L)
mg/ml	Miligramos sobre mililitro
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
Pa	Pascales
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
SDFA	Sistema de dos fases acuosas
US\$/kg	Dólares sobre kilogramo
UV	Ultravioleta
TCA	Ácido tricloacético
VR	Relación de fases

RESUMEN

Se utilizó un sistema de dos fases acuosas polietilenglicol 6000 (PEG) – sulfato de amonio para purificar papaína contenida en el látex de la *Carica papaya*. Se obtuvo un sistema líquido-líquido formado por una fase inferior donde se concentró el sulfato de amonio y una fase superior donde se concentró el PEG, la enzima se recuperó en esta última.

La fase superior se separó del sistema, se le adicionó KClO_4 en solución y se aumentó su concentración de PEG hasta 20 % (p/p), esto ocasionó la precipitación de la enzima hacia la solución salina. Posteriormente se liofilizó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 9,8 Pa para obtener el producto en polvo.

Se determinó la actividad enzimática del producto por medio de un método analítico para cuantificar la actividad proteolítica vegetal y se calculó la concentración de la enzima por medio del método cuantitativo de Biuret. A partir de estos valores se determinó la actividad específica de la enzima que fue la variable de respuesta.

Se evaluó el efecto de la concentración inicial de la muestra, el pH, la concentración de PEG y la concentración de sulfato de amonio, para determinar las mejores condiciones de purificación. Las variables que tuvieron un efecto significativo en el proceso fueron el pH, la concentración inicial de la muestra y la concentración de sulfato de amonio. La actividad específica se favoreció para el nivel alto de concentración de sulfato de amonio y los niveles bajos de pH y concentración inicial de la muestra.

El mejor sistema de purificación consistió en 12% PEG 6000, 15% sulfato de amonio, 10 mg/ml de muestra inicial y se efectuó a pH 4. Por medio de este sistema se obtuvo un producto con actividad específica de 6560 U/mg.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción de frutas es una actividad económica que no ha considerado otros principios activos como los complejos enzimáticos, estos también se pueden obtener de los cultivos y tienen gran cantidad de aplicaciones industriales como clarificantes, saborizantes, catalizadores de diferentes reacciones químicas para elaborar otros productos, entre otros.

En muchas plantas circula látex que tiene un rol en su mecanismo de defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros. Este fluido es un complejo proteico que incluye diferentes enzimas con aplicaciones biotecnológicas, generalmente son proteasas y quitinasas. El látex se comercializa después de pasar por procesos de secado al sol o en hornos con la gran desventaja de un alto nivel de contaminación, ya que estos procesos de purificación son básicos, con rendimientos muy bajos y en ocasiones inactivan las enzimas.

Una de las plantas de las cuales se puede obtener este tipo de complejos proteicos es la papaya que pertenece a la familia *caricaceae*, ésta incluye cuatro géneros diferentes entre los cuales el más importante es *Carica*. Dentro de este género hay gran diversidad de especies, una de ellas es *Carica papaya* originaria de Centroamérica, de ésta se obtiene una enzima que se llama papaína.

Anteriormente el látex de papaya que se encontraba disponible en el comercio provenía de países del oriente de África como Uganda y el Congo, pero los problemas políticos que se generaban en estas zonas tenían como consecuencia una inestabilidad en la oferta de la papaína y un aumento en el costo de la misma [21]. En la actualidad hay otras zonas productoras como Centroamérica, India y Vietnam, lo que ha favorecido el crecimiento del mercado de esta enzima.

El precio de la papaína depende de la actividad enzimática que se mide en unidades de tirosina (U/mg), la enzima con baja pureza cuesta alrededor de 15 US\$/kg (70 U/mg) y 95 US\$/kg (700 U/mg), mientras que el precio de la enzima pura puede alcanzar un valor de hasta 400 US\$/kg [10].

Colombia tiene todas las condiciones agrícolas para el cultivo de papaya y se puede convertir en un país exportador de papaína, la obtención de esta enzima como producto secundario representaría una fuente de ingresos para el productor y su exportación una fuente de divisas para el país.

En la zona norte del Valle del Cauca se siembran alrededor de 600 hectáreas de papaya, es la principal productora de la fruta en el país, sin embargo solamente se comercializa el fruto mas no se aprovecha el látex que se tiene en gran cantidad en los cultivos, esto debido principalmente a que se desconoce su valor comercial y la tecnología de producción. Por esta razón, los productores de papaya en la región están perdiendo la oportunidad de diversificar su producción y aprovechar una materia prima para un subproducto de elevado valor agregado como lo es la papaína.

El presente trabajo es una investigación que evalúa la actividad enzimática de la papaína que se obtiene a partir del látex de la *Carica papaya* y determina las mejores condiciones para su purificación según el diseño experimental que se planteó. Se utiliza un sistema de dos fases acuosas conformado por polietilenglicol (PEG) y sulfato de amonio, esta técnica integra procesos de clarificación, concentración y purificación de enzimas en una sola operación unitaria, con la ventaja de ser fácilmente escalable.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL.

Obtener papaína a partir del látex de la *Carica papaya* por medio de un sistema de dos fases acuosas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Caracterizar el grado de madurez de los frutos de la *Carica papaya*, materia prima para la investigación.
2. Estimar el efecto de la concentración de las fases, la concentración inicial de la muestra y el pH en el proceso de purificación.
3. Obtener las mejores condiciones de purificación de papaína a partir del látex de la *Carica papaya* por medio de un sistema de dos fases acuosas.
4. Calcular la actividad enzimática de la papaína que se obtiene.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

En la literatura se reportan estudios que evalúan el efecto de algunas variables en el rendimiento del látex (g látex extraído/kg papaya) tales como la hora de recolección, la edad de la fruta, el número de incisiones por fruta, el intervalo entre las extracciones, el manejo de la plantación y la humedad relativa del aire [21, 27, 36]. Sin embargo, estas investigaciones son limitadas porque analizan el efecto de las variables sólo en la etapa de extracción del látex y únicamente se utiliza el secado para concentrar la papaína, no se evalúa un método de purificación que aumente la actividad enzimática del producto final.

Otros estudios señalan los sistemas de dos fases acuosas como un método efectivo y con potencial de escalamiento para la recuperación primaria de compuestos biológicos [3], analizan la influencia de parámetros como el peso molecular del polímero, la longitud de línea de corte del sistema, la relación de volúmenes y el pH, a partir de los resultados generan un modelo predictivo que permite seleccionar sistemas adecuados para la purificación de enzimas.

En cuanto a la purificación de papaína, se realizó un estudio que compara los sistemas de dos fases acuosas y la precipitación con sal [25]. En la investigación se concluye que en el caso del método de precipitación con sal, la papaína que se obtiene está contaminada con otras proteínas, la pureza que se alcanza depende su concentración inicial y de la sustancia que se utiliza para procesarla. En el caso del método de dos fases acuosas, se obtiene papaína con elevada pureza y se señala la ventaja de que no se necesita un pretratamiento del látex. En el estudio se concluye que aunque el método de dos fases acuosas es fácilmente escalable, algunas técnicas complementarias al proceso no lo son, por ejemplo la recuperación de los componentes de las fases para reutilizarlos y disminuir costos.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que actúan como potentes y eficaces catalizadores. Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción química hasta hacerla instantánea porque disminuye la energía de activación, actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, ni tampoco modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución. Las enzimas como biocatalizadores tienen una creciente importancia en la optimización de los procesos porque reducen el tiempo invertido, la cantidad de energía que se consume y favorecen la selectividad de un producto de interés.

La característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad, que no permite que se formen subproductos y que se manifiesta en el sustrato y en la acción.

- *Especificidad de sustrato:* El sustrato es la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica.
- *Especificidad de acción:* Cada reacción está catalizada por una enzima específica.

La acción enzimática se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición de acuerdo a la Ecuación 1:



Donde:

E es la enzima.

S es el sustrato.

ES es el complejo transitorio enzima-sustrato.

P es el producto de la reacción.

El sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones débiles como puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas o electrostáticas en el centro activo, éste es una pequeña porción de la enzima constituida por aminoácidos que interaccionan con el sustrato.

3.1.1 Actividad enzimática Es la medida de la velocidad con la que una enzima convierte el sustrato en productos. Se obtiene midiendo la disminución de la concentración del sustrato o el aumento en la concentración del producto, en un intervalo de tiempo determinado.

En el Sistema Internacional de Unidades se utiliza la Unidad de actividad enzimática (U) que equivale a 1 μ mol de sustrato convertido por minuto. También se puede expresar en términos de **actividad específica** que representa la actividad de la enzima por mg (U/mg) y representa la pureza de la misma.

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente, su valor depende de factores como la concentración del sustrato y de la enzima, cambios en la temperatura y el pH [31]:

3.1.1.1 Concentración del sustrato La velocidad de reacción aumenta con la concentración del sustrato hasta que se adquiere un valor máximo, a una concentración de enzima constante. Cuando la concentración del sustrato es alta, los centros catalíticos están llenos, por esta razón se alcanza un valor máximo para la velocidad de la reacción.

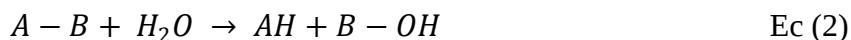
3.1.1.2 Concentración de la enzima La velocidad de la reacción aumenta con la concentración de la enzima, a una concentración de sustrato constante.

3.1.1.3 Cambios en la temperatura En las reacciones que se catalizan con enzimas, al superarse la temperatura óptima, las estructuras secundarias y terciarias de los complejos enzimáticos se rompen. Muchas enzimas se degradan a temperaturas mayores a 60 °C.

3.1.1.4 Cambios en el pH Un cambio en el pH del medio afecta la actividad de la enzima porque altera su estructura y la forma del sitio activo, se rompen los enlaces iónicos y de hidrógeno.

3.1.2 Hidrolasas Las hidrolasas son un tipo de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, permiten que se rompan moléculas de alto peso molecular, haciéndolas reaccionar con moléculas de agua, con este método se pueden romper enlaces peptídicos, ésteres o glicosídicos. Componen el grupo de enzimas digestivas más importantes.

La reacción general se representa de acuerdo a la Ecuación 2:



Donde:

A - B es un compuesto de alto peso molecular.

Las hidrolasas de mayor interés están representadas por las enzimas proteolíticas que actúan directamente sobre enlaces peptídicos, son casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial. Se estima que en el mundo las industrias que utilizan enzimas para sus productos invierten anualmente cerca de un trillón de dólares en su comercialización, el 75% son enzimas hidrolíticas, de este porcentaje las enzimas proteolíticas representan el 60% de total de las ventas mundiales [20, 26].

Las enzimas proteolíticas también se denominan proteasas, proteinasas o peptidasas, se caracterizan porque catalizan de forma específica la hidrólisis del enlace peptídico (enlace entre el grupo amino y el carboxilo).

Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las peptidasas a su vez se dividen en dos grandes grupos: las **endopeptidasas** que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína y las **exopeptidasas** que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino.

3.1.3 Espectrometría infrarroja Es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, se puede utilizar para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra.

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración.

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Se repite esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) y se construye un gráfico, la intensidad de cada banda de absorción se expresa como porcentaje de luz transmitida o transmitancia (%T). Se pueden generar gráficos bien resueltos con muestras de una sola sustancia de gran pureza.

3.2 PAPAÍNA

La papaína es una enzima de actividad proteolítica contenida en el látex de la papaya, se ha empleado en la industria más que cualquier otra proteasa de origen vegetal. Tiene gran cantidad de aplicaciones como el ablandamiento de carnes, la elaboración de cerveza, la industria farmacéutica, la industria textil, el tratamiento de efluentes industriales, la manufactura de cueros, entre otros. Perteneció al grupo de las peptidasas cisteínicas, grupo que más se ha estudiado y es responsable de los principales avances de la enzimología general. Esta enzima fue la primera proteasa cisteínica a la que se le ha determinado la estructura tridimensional, por lo que se le considera el arquetipo de esta clase de peptidasas.

3.2.1 Características de la enzima La papaína es una enzima con amplia especificidad, hidroliza gran variedad de proteínas y péptidos. Se encuentra disponible en el mercado de diferentes formas físicas como cristales, gel de agarosa, suspensiones acuosas, polvo liofilizado y polvo crudo [9].

Esta enzima tiene un peso molecular relativamente bajo (23400 Da), es una cadena con 212 aminoácidos como se ilustra en la Figura 1. Tiene tres sitios en los cuales dos moléculas de cisteína están unidas por un enlace de disulfuro entre dos cadenas paralelas, además contiene un grupo tiol libre (-SH) del que depende su actividad enzimática, ya que es su sitio activo.

La enzima es inestable para valores de pH inferiores a 2,8 o superiores a 8, para estas condiciones se produce su inactivación rápida e irreversible, incluso a temperatura ambiente. Se activa principalmente por acción de la cisteína y sus inhibidores son sustancias que reaccionan con el grupo -SH como metales pesados y reactivos de carbonilo.

La papaína purificada es casi completamente soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos, y puede conservar su actividad enzimática por un periodo de 6 a 12 meses si se mantiene refrigerada [37].

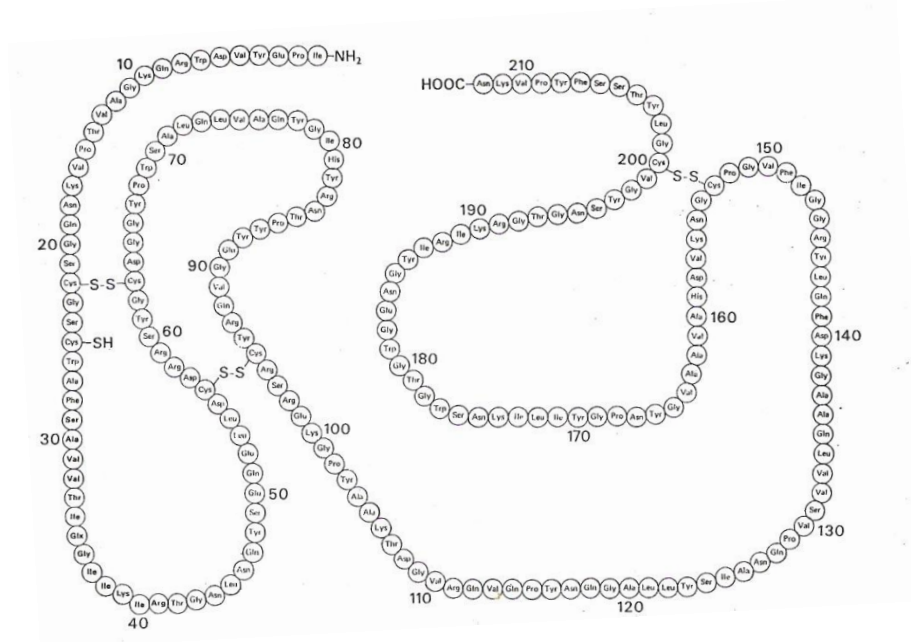


Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la papaína

3.2.2 Fuente de obtención El látex de la especie tropical *Carica papaya* es conocido por ser una fuente rica de endopeptidasas cisteínicas como papaína, quimopapaína, glicil endopeptidasa y caricaína [11]. Estas enzimas se encuentran en forma inactiva en los laticíferos de la planta y al ser liberadas de forma abrupta de estos conductos [19], se convierten en enzimas maduras en un tiempo aproximado de 2 minutos [23].

Los laticíferos están formados por una red de grandes tubos articulados que se extienden por toda la planta, excepto el sistema radical. De esta manera, la extracción se puede efectuar de forma eficiente tanto en los frutos como en las hojas, troncos y peciolo; aunque en los frutos es más fácil y se obtiene un producto de mejor calidad.

La composición del látex que se extrae de la papaya varía según el país de origen pero en promedio es 15% materia seca, de los cuales el 40% está formado por un complejo enzimático que incluye la papaína, la quimopapaína, la caricaína y la glicina endopeptidasa [2]. Cada una de las enzimas difiere en cuanto a su actividad proteolítica, estabilidad,

concentración en el látex y productos resultantes después de catalizar una reacción, en la Tabla 1 se listan las características de estas enzimas. La papaína se encuentra en menor cantidad (entre 5 y 8% [22]) y su acción proteolítica es menos específica que otras proteasas, hidroliza tanto pequeños péptidos como proteínas, produciendo gran cantidad de amidas y aminoácidos libres; tradicionalmente se purifica por métodos de precipitación, sin embargo el producto final continúa contaminado con otro tipo de proteasas.

Tabla 1. Características de las enzimas presentes en el látex de la *Carica papaya* [5]

Enzima	Peso molecular	Punto isoelectrico	Concentración en el látex (%)
Papaína	23400	8,75	10
Quimopapaína	27000		45
A		10,10	
B		10,40	
Lizosima	25000	10,50	20

Es importante mencionar que el complejo enzimático puede perder rápidamente su actividad por la oxidación, por tanto en el momento de la extracción se debe evitar el contacto del látex con el aire, el agua y los metales pesados.

Algunos factores que provocan pérdida en la actividad enzimática de la papaína son:

- Exposición prolongada al aire (Semanas).
- Exposición al sol (Horas).
- Coagulación.
- Cambios de pH.
- Crecimiento microbiano.
- Calentamiento por encima de 70°C (Minutos)
- Contacto con metales pesados como hierro, zinc y mercurio.

Se debe extraer el látex de frutos verdes pero completamente desarrollados, si se extrae de frutos muy jóvenes se altera su desarrollo y maduran prematuramente, adicional el porcentaje de humedad de la papaya aumenta para frutos más maduros lo que indica un menor porcentaje compuesto por enzimas y proteínas, la edad óptima es entre 2,5 y 3 meses. Algunos autores recomiendan realizar 3 incisiones por fruta con un intervalo de cuatro días entre cada extracción [21].

Los rendimientos de látex seco reportados por la literatura son entre 50 y 70 kg de papaína cruda por hectárea (Densidad de 2000 árboles por hectárea), durante un periodo de explotación de 5 años [21]. Otros autores mencionan que a partir de 1 kg de papaya se puede obtener 9 g de látex [29].

3.3 SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS (SDFA)

Los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) son una técnica que ha demostrado tener potencial para la recuperación primaria de compuestos biológicos. Los primeros estudios realizados con SDFA demostraron que era posible separar y recuperar componentes celulares (organelos), así como pigmentos de algas y cianobacterias utilizando dicha técnica.

Existen SDFA polímero – polímero (polietilenglicol (PEG) – Dextrano, PEG – Polivinil alcohol, etc.), sin embargo el uso de dichos sistemas está limitado por los costos de algunos polímeros, principalmente el dextrano. Adicionalmente, el PEG forma sistemas de dos fases acuosas cuando se mezcla con soluciones salinas concentradas (PEG – sulfato de amonio, PEG – fosfato de potasio, PEG – sulfato de sodio, etc.). Debido a su bajo costo, baja viscosidad y corto tiempo de separación los sistemas PEG – sal se emplean frecuentemente [7].

Estos sistemas líquido-líquido se forman al mezclar dos sustancias solubles en agua, las cuales al superar cierta concentración se vuelven inmiscibles entre sí dando como resultado

la formación de dos fases en equilibrio. El polímero se concentra en la fase superior y la sal predomina en la fase inferior, el compuesto biológico que se desea recuperar se puede distribuir en cualquiera de las fases, dependiendo de parámetros como los componentes de las fases, las propiedades fisicoquímicas del compuesto y su interacción.

Después de formarse el sistema, el compuesto de interés se debe concentrar en una de las fases mientras que las partículas no deseadas, como otras enzimas o proteínas, se concentran en la fase opuesta. En la Figura 2 se muestra como es el comportamiento general de los SDFA.

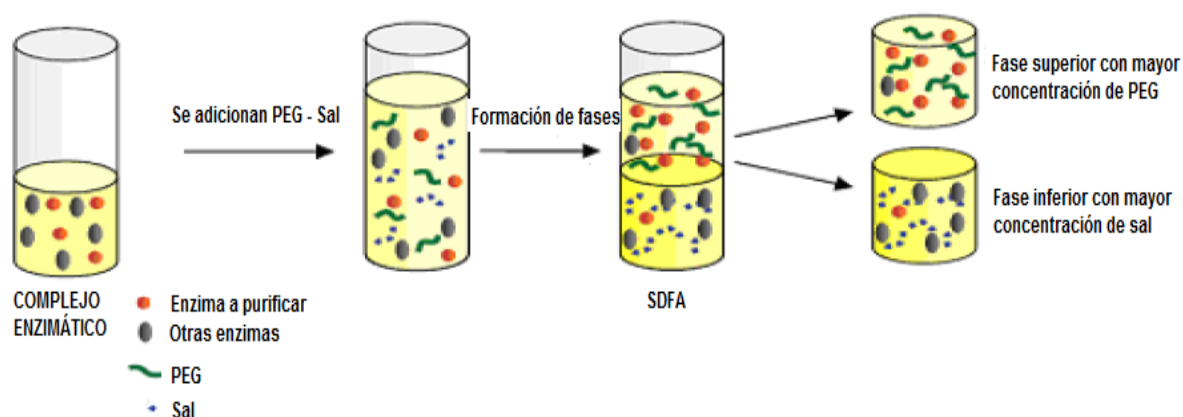


Figura 2. Distribución esquemática de las moléculas en un SDFA [30].

En años recientes el interés sobre la aplicación de los SDFA como método de recuperación primaria y purificación parcial de compuestos biológicos aumentó notablemente, entre las principales ventajas que ofrece esta técnica de recuperación se encuentra: su alta eficiencia, factibilidad de escalamiento, bajos costos de inversión y operación, y generalmente permiten la recuperación y purificación de compuestos biológicos en su forma nativa, lo cual es de gran valor ya que al conservar la estructura se conserva al mismo tiempo la función específica de los mismos.

Los SDFA se pueden usar en conjunto con otros procesos de separación sin afectar las etapas previas o posteriores de recuperación, esto en contraste con otros métodos de purificación que incluyen diferentes técnicas de cromatografía como intercambio iónico, covalente y de afinidad, ya que estas requieren un procesamiento inicial del látex y tienen dificultad para aplicarse a procesos industriales [17]. Este proceso ha adquirido auge, ya que tiene la capacidad de integrar (sustitución de dos o más operaciones unitarias por una sola) e intensificar los procesos (procesamiento de mayor cantidad de material biológico utilizando equipo de la misma capacidad).

Esta técnica ha demostrado tener un amplio campo de aplicación, pero las investigaciones se enfocan en la recuperación de proteínas dejando a un lado compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, el uso de esta técnica se limita por la escasa información disponible acerca de los procesos y fenómenos fisicoquímicos involucrados en la partición del compuesto de interés.

Generalmente el desarrollo de procesos para la recuperación de compuestos biológicos con esta técnica, conlleva a la ejecución de experimentos factoriales completos en los cuales los parámetros del sistema como concentración de polímero y sal (asociado a la longitud de línea de corte LLC), peso molecular del polímero, relación de volumen entre la fase superior e inferior y pH, se varían dentro de un amplio rango de valores para determinar las condiciones que favorecen la partición del compuesto de interés hacia una fase particular del sistema [3].

3.4 MERCADO DE LA PAPAÍNA

3.4.1 Tamaño del mercado Se calcula actualmente que el mercado fluctúa entre 900 y 1.000 toneladas de papaína anuales, la oferta ha incrementado en los últimos años debido a que las plantaciones que se sembraron durante la escasez de papaína a principios de los 90, están comenzando a producir.

La papaína se compra y distribuye por compañías especialistas en alimentos principalmente en Europa y EEUU, luego se redistribuye a otros países como producto final. El número de compañías involucradas en la compra primaria es relativamente pequeño y todas tienen sus fuentes tradicionales. El mercado total en Europa se estima en varios cientos de toneladas al año, el crecimiento del mercado estadounidense se estima como el doble de este mercado (entre 300 y 400 toneladas por año). Las importaciones directas a EEUU provienen en su mayoría desde India, con proveedores más pequeños en China, el Congo e Indonesia [18].

En el mercado global los principales países productores de papaína son Uganda, Tanzania y República Democrática del Congo, siendo este último el mayor abastecedor del mundo. Otros productores son Australia, India, y Brasil.

La demanda de papaína por parte de las cervecías ha disminuido porque se están usando sustitutos más baratos y fácilmente disponibles. Sin embargo el uso de la papaína continua expandiéndose en la industria alimenticia y farmacéutica, se encuentra en una etapa de crecimiento rápido ya que continúan encontrando nuevos usos.

La mayoría de las empresas existentes tienen plantaciones propias que producen papaína y en algunos casos, otros productos relacionados con la papaya. También es importante mencionar que la mayoría de las empresas existentes en el mercado producen papaína cruda, lo que permite venderlas a laboratorios alimenticios y farmacéuticos que la procesan y la transforman en productos finales que son materias primas de otras industrias como la de la carne y la cerveza.

3.4.2 Tipos de mercado La papaína tiene alta demanda en muchos tipos de industrias, principalmente en las bebidas alcohólicas, la carne y la farmacéutica.

3.4.2.1 Industria de las bebidas alcohólicas Las bebidas alcohólicas generalmente se enfrían antes de su uso, proceso en el cual se genera un aspecto turbio debido a la formación de fenoles proteicos-polihídricos complejos. Para evitar este fenómeno se

emplea la papaína, que degrada estos fenoles complejos a pequeñas partículas de tamaño tal que no generan turbidez a la cerveza. En USA el 80% de las cervezas son hechas con propiedades anticongelantes a través del uso de papaína.

3.4.2.2 Industria de la carne La terneza de la carne depende de factores como el tejido conjuntivo presente en el músculo, la hidratación, el contenido de grasa entre las fibras musculares y la integridad de las proteínas. La terneza se determina naturalmente por enzimas propias llamadas catepsinas, éstas son responsables del proceso de maduración que le proporciona a la carne un nivel óptimo de textura, pero toma semanas de refrigeración; la maduración se puede acelerar mediante la adición de enzimas proteolíticas como la papaína que actúa por proteólisis en las fibras musculares y los compuestos del tejido conectivo, como el colágeno y la elastina. Esta técnica se aplica principalmente en carnes de menor calidad, justamente para mejorar el producto final.

3.4.2.3 Industria farmacéutica y cosmética En estas industrias se utiliza para la fabricación de cremas desmanchadoras de la piel, tienen una participación aproximada de 10% del mercado mundial y está incrementando.

En Estados Unidos por ejemplo, se le han descubierto propiedades para tratar enfermedades hepáticas y dolores lumbares, para esto se inyecta la enzima al líquido céfalo-raquídeo de la espina dorsal, con el fin de disipar dolores del disco intervertebral. El procedimiento tiene un éxito hasta en 60 % de los pacientes tratados y un riesgo mínimo de alergia.

3.4.3 Uso de la papaína como enzima sustituta La papaína cumple con funciones en otras tecnologías enzimáticas, primordialmente con enzimas proteolíticas vegetales como la bromelaína y la ficina, con proteasas animales como la renina, la tripsina y la pepsina y también con proteasas microbicas, ya sean bacteriales o fungales.

La papaína es el sustituto ideal para la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas ya que es funcional y fácil de producir, en la Tabla 2 se especifican los procesos en los cuales se

prefiere el uso de esta enzima, debido a que tiene ventajas en su acción específica y su precio debido a que su producción es más económica y sencilla.

Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas en las que se utiliza papaína [4]

Aplicación	Enzima adecuada	Otras
Alimentos y bebidas		
Clarificación de la cerveza	Papaína	Bromelaína, ficina
Ablandamiento de la carne	Papaína	Bromelaína, ficina
Extracción de proteína de pescado	Papaína	Proteasas: bacteriales y fungales
Fabricación de quesos	Papaína	Bromelaína, ficina
Alimentos dietéticos y para bebés	Pepsina	Papaína
Farmacéutica		
Preparación de vacunas	Papaína	Ninguna
Tratamiento de la piel, cirugía de los palatinos	Papaína	Ninguna
Tos ferina en ganado, insuficiencia gástrica, desparasitación, dispepsia, difteria	Pepsina, tripsina, quimiopapaína	Bromelaína, ficina, papaína
Otras aplicaciones		
Curtido de piel	Tripsina	Papaína
Textiles y lavanderías: decoración, suavizador de lanas, desgomado de seda	Proteasa bacteriales, papaína	Bromelaína, ficina
Papel	Papaína	Ninguna

3.4.4 Evolución tecnológica en los procesos de producción En los años 50 la producción de papaína era artesanal, se utilizaban procesos de secado al sol y el producto que se obtenía era de baja calidad (por su baja actividad enzimática). En los años 70 surgieron en la industria otras tecnologías de secado, se inició el uso del horno con lo que comenzó a obtenerse papaína de mayor actividad enzimática. Actualmente, existen varios proyectos de producción de papaína por medio de la liofilización como técnica de secado, para obtener papaína con mayor actividad enzimática y mejor calidad [10].

4. METODOLOGÍA

4.1 MÉTODO EXPERIMENTAL

Se planteó un diseño factorial 2^4 con punto central para el desarrollo de la investigación, en la Tabla 3 se resumen las variables y los niveles del diseño experimental. Se varió el pH, la concentración inicial de la muestra (solución de látex), la concentración de polietilenglicol 6000 (PEG) y la concentración de sulfato de amonio en la etapa de purificación de papaína. Se mantuvo como variable fija el peso molecular del PEG con un valor de 6000 Da porque es menor que el de la papaína (23400 Da), esto favorece la recuperación en la fase superior del sistema debido principalmente al fenómeno de volumen excluido [3].

La papaína es una enzima estable a valores de pH entre 2,8 y 8, por fuera de este rango se inactiva y pierde su actividad proteolítica. Para el diseño predictivo se variaron los valores de pH aproximadamente cinco unidades por debajo del punto isoeléctrico ($pI = 8,75$), para garantizar la estabilidad del compuesto de interés. Para estos valores de pH la literatura recomienda utilizar sistemas PEG-sulfato [3].

Tabla 3. Variables y niveles del diseño factorial 2^4 con punto central

Variables	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (1)
Concentración inicial de la muestra (mg/ml)	10	25	40
Concentración de PEG 6000 (% p/p)	6	9	12
Concentración de sulfato de amonio (% p/p)	9	12	15
pH	4	6	8

Para la selección de las concentraciones se utilizó la información que proporciona el diagrama de fases del sistema PEG 6000 - sulfato de amonio, Figura 3. Un sistema que contenga cantidades cercanas a 12% (p/p) de PEG 6000 y 15% (p/p) sulfato de amonio, resulta en dos fases y se puede utilizar para la purificación de papaína. Los sistemas cuyas concentraciones de PEG superan el 12% (p/p) resultan en una mezcla altamente viscosa y los que contienen concentraciones de sulfato de amonio mayores al 15% (p/p) provocan la precipitación de la enzima desde el látex [25], de esta manera se definieron los valores para las variables de modo que no superaran esas concentraciones. Con el objetivo de alcanzar mejor rendimiento en el proceso y mayor remoción de contaminantes, el PEG que resultó del SDFA se aisló del sistema y se aumentó su concentración, con el objetivo de precipitar la enzima y retenerla en una solución salina que se liofilizó.

Se realizaron en total 20 experimentos en los que se evaluaron las mejores condiciones para la purificación, se cuantificó la actividad enzimática (U/ml) y la cantidad de proteína (mg/ml) para los experimentos, con estos datos se calculó la actividad específica (U/mg).

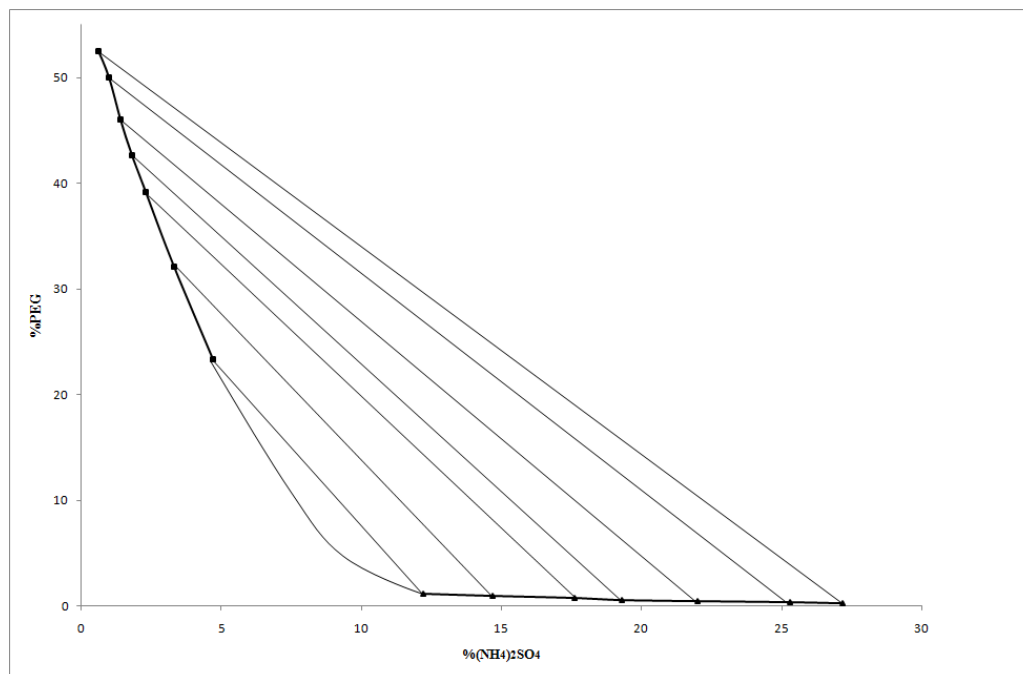


Figura 3. Diagrama de fases en equilibrio para PEG 6000-sulfato de amonio-agua a 298,15K [32].

En la Figura 4 se esquematiza el diagrama del procedimiento experimental para la purificación de papaína a partir del látex de la *Carica papaya*.

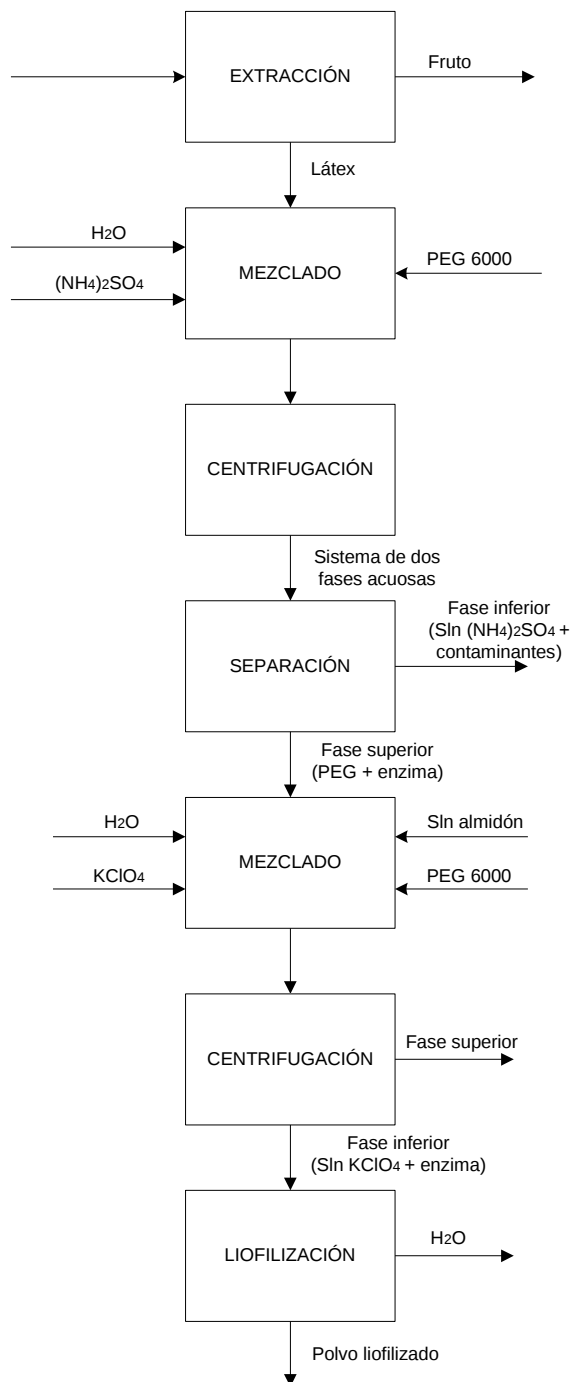


Figura 4. Diagrama de bloques del procedimiento experimental

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA EDAD DE LOS FRUTOS

Para el proceso se utilizó como materia prima los frutos verdes de la *Carica papaya* que se encontraban ubicados en la Estación de Biología edificio 358 y en la zona verde detrás del edificio 342, sede Meléndez de la Universidad del Valle.

Según lo que se reporta en algunos estudios la mayor actividad enzimática se obtiene para frutos de 2 a 3 meses edad [27]. Para garantizar igual grado de madurez, se determinó la edad de los frutos por medio de un método que se desarrolló a partir de observaciones hechas en la Cooperativa El Silencio [21, 27], consiste en dividir el tronco en segmentos comprendidos entre dos hojas que se orientan en la misma dirección, como se observa en la Figura 5. Se parte desde la hoja que posea la primera papaya totalmente desarrollada hasta la última papaya del árbol (fruto maduro). Se divide la edad de esta papaya entre el número de secciones que se obtienen y se puede determinar de forma aproximada la edad de los frutos en las diferentes secciones.

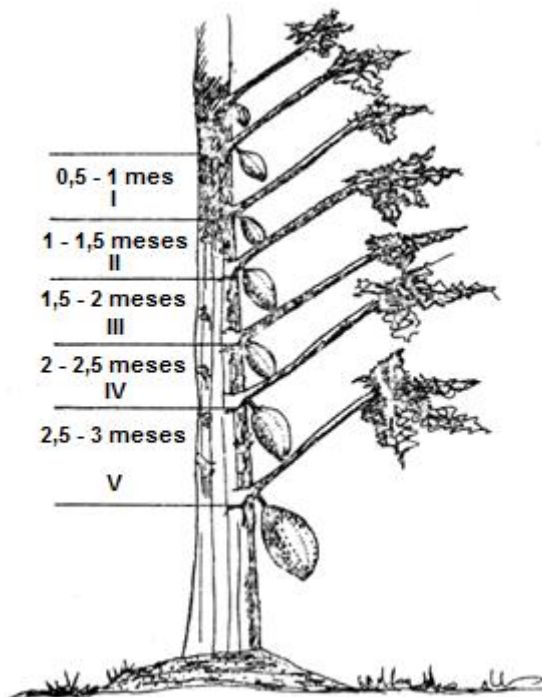


Figura 5. Caracterización de la edad de los frutos

4.3 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX DE LA PAPAYA

Se realizaron cinco incisiones longitudinales en frutos verdes completamente desarrollados de un mismo árbol [1], para la cual se utilizó un cuchillo de plástico ya que no se debe utilizar materiales oxidables para este proceso. La profundidad de las incisiones fue aproximadamente 2 mm y la edad de los frutos fue de 2 a 3 meses. Si se extrae látex de los frutos antes de que lleguen a esta edad, se puede alterar su desarrollo y madurar prematuramente [21].

El látex que emanan las incisiones se recolectó en recipientes plásticos previamente lavados con agua destilada (Figura 6), se taparon inmediatamente y se almacenaron en frío en una caja térmica con bolsas de gel refrigerado para mantenerlo a baja temperatura durante su transporte al laboratorio, solamente se recolectó el látex no coagulado. Las muestras se pesaron para determinar la cantidad de látex extraído.

Para determinar el rendimiento del látex por kg de papaya, se realizó extracción a frutos de un mismo árbol con una frecuencia de 3 veces por semana hasta su maduración y se registró el promedio de las cantidades obtenidas.



Figura 6. Extracción del látex de los frutos verdes

4.4 PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA

Se prepararon 30 g de las soluciones de látex utilizando agua destilada. Se ajustó el pH de cada muestra a los valores determinados por el experimento, haciendo uso de soluciones 6 M de HCl o 6 M de NaOH.

Posteriormente se trasvasaron las soluciones a tubos de centrifuga de 50 ml y se adicionaron las cantidades correspondientes de PEG 6000 y sulfato de amonio, ambos reactivos de grado analítico de Clariant. Estas muestras se llevaron a 50 g con agua destilada.

Las muestras se colocaron en una centrifuga refrigerada EC Centra MP4R por 30 minutos a 9000 x g, manteniendo la temperatura a 4°C para acelerar el equilibrio de fases y la partición de los compuestos en el sistema, se registraron los volúmenes de estas fases.

En la Tabla 4 se registran las cantidades que se utilizaron para cada muestra de acuerdo al modelo experimental que se planteó.

Tabla 4. Valores de las variables para cada experimento

Experimento	Concentración de la muestra (mg/ml)	Concentración de PEG (%p/p)	Concentración de sulfato de amonio (%p/p)	pH
1	40	12	15	8
2	10	12	15	8
3	10	12	9	8
4	10	6	9	8
5	10	6	9	4
6	40	6	9	4
7	40	6	15	4
8	40	12	15	4
9	10	6	15	4
10	10	12	15	4
11	10	12	9	4
12	40	6	9	8
13	40	6	15	8
14	40	12	9	8
15	10	6	15	8
16	40	12	9	4
17	25	9	12	6
18	25	9	12	6
19	25	9	12	6
20	25	9	12	6

4.5 PRECIPITACIÓN Y LIOFILIZACIÓN

Debido a que la papaína es una enzima con mayor grado de hidrofobicidad comparada con otras proteasas [25], se esperaba mayor recuperación en la fase superior del sistema debido a que el volumen de agua excluido de esta fase sería significativo.

Con el objetivo de incrementar el rendimiento del proceso y la pureza de la enzima, se realizó un tratamiento a la fase superior de PEG, para lo cual ésta se separó del sistema. La enzima se puede recuperar adicionando una pequeña cantidad de almidón y elevando la concentración del PEG hasta un valor de 20% (p/p), esto ocasiona la precipitación de la enzima. El efecto se puede incrementar adicionando una sal como el KClO_4 que permite que la enzima se precipite a valores de altos de pH [16].

Por cada 6 ml que se obtuvo de esta fase se adicionaron 0,06 g de KClO_4 de Carlo Erba Reagents y 0,004 g de una solución de almidón al 20% (p/p). Posteriormente se ajustó el pH de todas las muestras a un valor de 8 con una solución 6 M de NaOH. Se adicionó a las muestras la cantidad de PEG necesaria para elevar su concentración al 20% y se centrifugaron por 10 minutos a 500 x g y una temperatura de 4 °C. De esta manera la enzima se recuperó en la fase inferior de las muestras.

Las fases inferiores se separaron y se congelaron por un periodo de 12 horas. Se utilizó un liofilizador Eyela FDU 2100 (Figura 7) a una presión de 9.8 Pa y una temperatura de -80 °C durante 17 horas, para obtener las muestras en forma de polvo que se mantuvieron refrigeradas.



Figura 7. Liofilización de las muestras

4.6 ENSAYO CUALITATIVO DE BIURET

Para determinar la presencia de proteína se utilizó la prueba cualitativa de Biuret, ésta se realizó a cuatro de las muestras escogidas al azar, antes de realizar la liofilización.

Se adicionó a 3 ml de cada muestra 3 ml de una solución de NaOH al 10% (p/p) y alrededor de 5 gotas de reactivo de Biuret. Este se preparó con sulfato de cobre pentahidratado de Merck al 0,15% (p/p). Las muestras se agitaron y transcurridos 2 minutos se analizó su coloración.

4.7 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se realizó el ensayo cuantitativo de Biuret para determinar las proteínas totales contenidas en las muestras [35]. El reactivo de Biuret se preparó con una solución de sulfato de cobre al 0,15% (p/p) y NaOH al 3% (p/p).

Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) de Sigma al 1% (p/p) y para las muestras incógnita se prepararon soluciones que contenían 1 mg/ml. Para todos los ensayos se realizaron réplicas, en la Tabla 5 se describen las cantidades que se pipetearon en cada tubo, los ensayos del 1 al 8 se realizaron para la curva de calibración y los ensayos X y Y se realizaron para cada muestra incógnita.

Se utilizó un espectrofotómetro UV- visible Thermo Scientific serie Genesys 10S para leer la absorbancia de las muestras a 550 nm, usando aire para iniciarlo.

Tabla 5. Protocolo para el ensayo cuantitativo de Biuret

Tubo	Solución BSA (ml)	Muestra (ml)	Agua (ml)	Reactivo de Biuret (ml)
Blanco	-	-	1,0	4,0
1	0,2	-	0,8	4,0
2	0,2	-	0,8	4,0
3	0,4	-	0,6	4,0
4	0,4	-	0,6	4,0
5	0,8	-	0,2	4,0
6	0,8	-	0,2	4,0
7	1,0	-	-	4,0
8	1,0	-	-	4,0
X	-	1,0	0,9	4,0
Y	-	1,0	0,9	4,0

4.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar la actividad enzimática del polvo que se obtuvo, se utilizó el método analítico de la actividad proteolítica vegetal [8]. Este análisis se efectuó por medio de una hidrólisis proteolítica sobre un sustrato de caseína grado Hammarsten, durante 60 minutos a 40 °C y con un pH de 6. El sustrato no hidrolizado se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) de Merck, se centrifugó y se removió por filtración. Finalmente, la caseína solubilizada se midió con el espectrofotómetro.

Se preparó 100 ml de la solución sustrato que contenía una concentración (p/v) de 1,77% fosfato disódico anhidro y 2% caseína. Durante la preparación de esta solución primero se utilizó calentamiento y posteriormente se dejó enfriar en un baño de agua fría, durante todo el proceso se mantuvo agitación.

Se preparó 2000 ml de solución buffer que contenía una concentración (p/v) de 0,71% fosfato disódico anhidro de Merck, 0,61% L-cisteína de Sigma Chemicals y 1,40% EDTA de Carlo Erba Reagents. El pH de esta solución se ajustó a 6 con una solución 1 N de

NaOH. La solución que se utilizó para detener la reacción contenía 30% (p/v) de TCA.

Se prepararon 4 ml de solución de las muestras con una concentración de 0,1308 mg/ml y una solución madre con el estándar de papaína de Raw Chemicals (3000 U/mg) con una concentración de 1 mg/ml. A partir de esta solución madre se realizó una dilución en serie para obtener 6 soluciones a diferentes concentraciones, con las cuales se realizó la curva de calibración. Todas las soluciones se prepararon el mismo día en que se realizaron las pruebas.

Se etiquetaron los tubos de ensayo que correspondían a las muestras para la curva estándar, las muestras a calcular la actividad enzimática y los blancos. Se transfirieron 5 ml del sustrato a cada uno de ellos y se equilibraron en un baño de agua a 40 °C por 15 minutos (Figura 8).

Posteriormente, en el tiempo cero se adicionó a cada tubo 2 ml de la solución de la enzima correspondiente y se agitaron vigorosamente para dar inicio a la reacción. Se realizó la adición de la enzima con 1 minuto de intervalo para tener un control total del tiempo de reacción en cada tubo.



Figura 8. Muestras en el baño térmico para la prueba de actividad enzimática

Después de 60 minutos exactos se adicionó a cada tubo 3 ml de la solución de TCA para finalizar la reacción, se agitaron nuevamente y se regresaron al baño de agua por 30 minutos para completar la coagulación de la caseína que se precipitó. Después se retiraron los tubos del baño de agua y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Para los blancos primero se adicionó 3 ml de solución de TCA al sustrato y posteriormente 2 ml de la solución madre de papaína. Se agitaron y se mantuvieron en el baño por un periodo de 30 minutos, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Una vez los tubos se enfriaron, las muestras se centrifugaron y se filtraron a través de papel filtro de porosidad media. Se utilizó un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 de Merck para leer la absorbancia de los filtrados a 280 nm, usando aire para iniciarlo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX DE LA PAPAYA

En la tabla 6 se muestran los promedios de látex extraídos a frutos de un mismo árbol hasta su maduración, con el objetivo de determinar el rendimiento.

Tabla 6. Cantidad de látex por extracción

Extracción	Cantidad promedio de látex (g)
1	1,71
2	1,43
3	1,12
4	0,82
5	0,56
6	0,31
7	0,28
Total	6,23

Debido a que las extracciones aceleran el proceso de maduración, los frutos alcanzaron su estado maduro en un periodo aproximado de dos semanas, en las cuales se realizaron 7 extracciones. Como se puede observar a medida que aumentan las extracciones, el rendimiento del látex disminuye.

El peso promedio de los frutos en estado maduro fue de 760,5 g, por lo tanto el rendimiento fue de 8,19 g de látex/kg de papaya, lo cual es similar a los valores reportados en la literatura (9 g de látex/fruta, para frutos con un peso entre 0,5 y 1,0 kg) [24].

De esta manera, si en el Valle del Cauca el rendimiento de cultivo es de 56,96 toneladas de papaya/hectárea [13], se obtiene un rendimiento de 466,50 kg de látex/hectárea para procesar, hasta que los frutos alcancen su estado maduro.

5.2 PURIFICACIÓN DE LA PAPAÍNA

Se obtuvo entonces dos fases para cada uno de los experimentos, los sistemas estaban conformados por una fase superior donde se concentró el PEG y una fase inferior conformada por una solución acuosa de la sal, como se ilustra en la Figura 9.



Figura 9. Sistema de dos fases acuosas (SDFA)

La relación de volumen experimental se obtuvo por medio de los volúmenes de la fase inferior y superior que se midieron, se calcula por medio de la Ecuación 3 [16, 28]:

$$V_{RExp} = \frac{V_T}{V_B} \quad Ec (3)$$

Donde:

V_T es el volumen de la fase superior.

V_B es el volumen de la fase inferior.

La relación de fases se puede comparar con el valor teórico que se obtiene a partir del diagrama de fases del sistema (Figura 10), aplicando la regla de la palanca por medio de la Ecuación 4 [16]:

$$V_{Rteórico} = \frac{C_n B_n}{C_n T_n} \quad Ec (4)$$

Donde:

$C_n B_n$ es el segmento de recta que une los puntos de concentración total del sistema y concentración de la fase inferior.

$C_n T_n$ es el segmento de recta que une los puntos de concentración total del sistema y concentración de la fase superior.

En el diagrama de fases la línea de corte (LLC) es la recta que conecta dos nodos en la curva binodal, estos representan las concentraciones finales de los componentes en cada una de las fases. El porcentaje de longitud de línea de corte se calcula de acuerdo a la Ecuación 5 [16]:

$$LLC = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} \quad Ec (5)$$

Donde:

ΔX es la diferencia de las concentraciones de sulfato de amonio entre la fase inferior y la superior.

ΔY es la diferencia de las concentraciones de PEG entre la fase superior y la inferior.

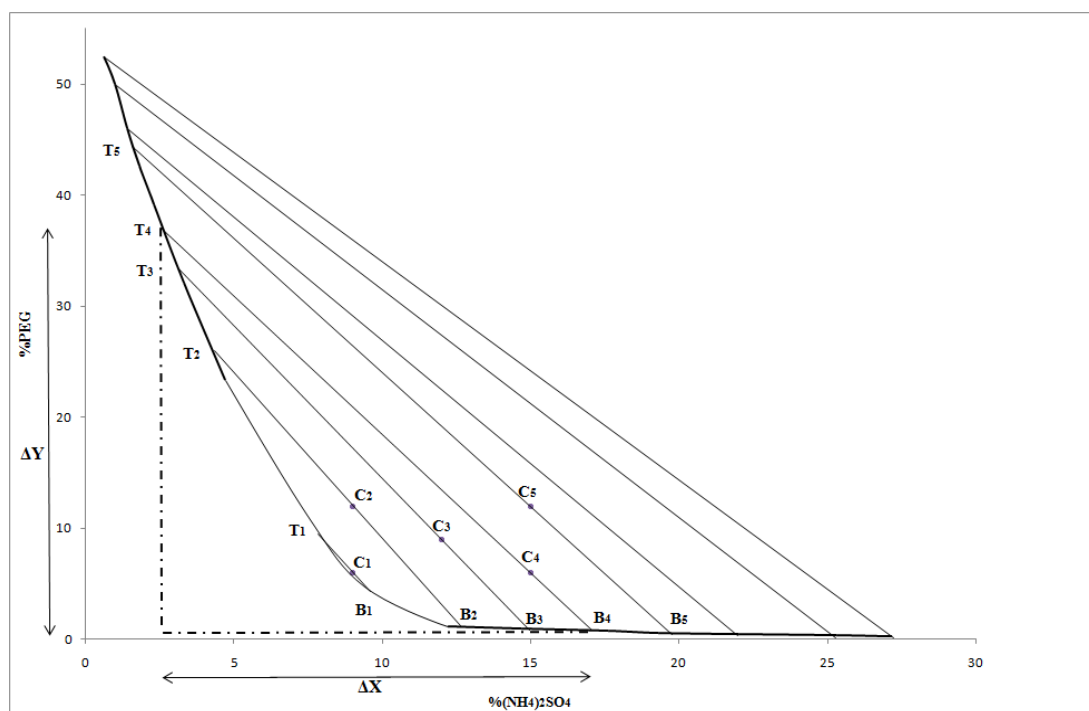


Figura 10. Diagrama de fases en equilibrio para PEG 6000-sulfato de amonio-agua con puntos de operación

Los volúmenes de las fases y la relación de volumen experimental que se obtuvo se muestran en la Tabla 7. Como se puede observar los valores experimentales y teóricos para la relación de volumen son similares, el sistema se comportó de acuerdo a lo esperado según las condiciones del proceso y el diagrama de fase. En términos generales se obtuvo un volumen mayor para la fase inferior en las muestras porque el volumen de agua excluido de la fase superior era significativo.

Los % LLC son mayores para los puntos que se encuentran sobre las líneas de corte más alejadas del punto binodal, en este último punto el valor es cero. El % LLC representa el efecto de la composición del sistema en la partición de la enzima de interés, un incremento en este parámetro favorece la cantidad de volumen excluido y la hidrofobicidad de la fase superior, por lo tanto se puede recuperar la enzima en esta fase.

Tabla 7. Relación de fases experimental y teórica.

Experimento	V_T (ml)	V_B (ml)	V_{RExp}	$V_{RTeórico}$	% TLL (%w/w)
1	13	37	0,35	0,36	47,47
2	13	37	0,35	0,36	47,47
3	24	26	0,92	0,78	26,06
4	15	35	0,43	0,54	5,31
5	14	36	0,39	0,54	5,31
6	16	34	0,47	0,54	5,31
7	7	43	0,16	0,17	38,63
8	14	36	0,39	0,36	47,47
9	7	43	0,16	0,17	38,63
10	13	37	0,35	0,36	47,47
11	25	25	1,00	0,78	26,06
12	17	33	0,52	0,54	5,31
13	7	43	0,16	0,17	38,63
14	25	25	1,00	0,78	26,06
15	8	42	0,19	0,17	38,63
16	25	25	1,00	0,78	26,06
17	14	36	0,39	0,32	34,60
18	13	37	0,35	0,32	34,60
19	13	37	0,35	0,32	34,60
20	13	37	0,35	0,32	34,60

5.3 PRECIPITACIÓN Y LIOFILIZACIÓN

En la tabla 8 se registran las cantidades de solución de $KClO_4$ en la cual se recuperó la enzima, la cantidad resultante de muestra liofilizada y el porcentaje de remoción de agua que se calcula por medio de la Ecuación 6 [14]:

$$\% \text{ Remoción} = \frac{W_0 - W}{W_0} * 100 \quad Ec(6)$$

Donde:

W_0 es el peso inicial de la muestra.

W es el peso de la muestra liofilizada.

Tabla 8. Relación de fases experimental para el proceso de separación de la enzima disuelta en el PEG

Experimento	W_0 (g)	W (g)	% de Remoción
1	31,106	0,448	98,602
2	29,220	0,523	98,262
3	21,680	0,265	98,813
4	21,680	0,683	96,941
5	22,622	0,376	98,386
6	21,680	0,270	98,791
7	25,450	0,220	99,161
8	28,278	0,320	98,901
9	22,622	0,654	97,193
10	29,220	0,653	97,830
11	20,737	0,630	97,050
12	23,565	0,130	99,464
13	24,507	0,590	97,663
14	19,795	0,567	97,219
15	23,565	0,570	97,652
16	20,737	0,490	97,706
17	28,278	0,360	98,764
18	28,278	0,420	98,558
19	26,393	0,384	98,587
20	26,393	0,409	98,495

Los porcentajes de remoción de humedad resultaron en todos los casos ser mayores al 95%, esto confirma que la liofilización es un método eficiente de concentración para el proceso debido a que se lleva a cabo a muy bajas temperaturas (-80°C), ausencia de aire y la pérdida de humedad de la sustancia ocurre de forma homogénea; adicional tiene la ventaja de preservar la actividad proteolítica de la enzima.

El producto que se obtuvo de la liofilización (Figura 11) se mantuvo almacenado a 4°C para conservar su actividad enzimática, sus características principales se describen a continuación:

Estado: Sólido, polvo liofilizado.

Color: Blanco.

Humedad: 2 a 3% (p/p).

Solubilidad: Totalmente soluble en agua.

Higroscopia: Parcialmente higroscópico.



Figura 11. Muestras liofilizadas que se almacenaron herméticamente

5.4 ENSAYO CUALITATIVO DE BIURET

Cuando una proteína se mezcla con el reactivo de Biuret se produce un producto de color violeta, esto se debe a que se detecta la presencia de un enlace peptídico. La coloración se debe a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{+2} y los electrones no compartidos del nitrógeno en los enlaces peptídicos.

En las cuatro muestras a las que se realizó el ensayo se notó cambio de coloración leve hacia un tono violeta como se muestra en la Figura 12, de esta manera se confirmó la presencia del complejo enzimático en las muestras.



Figura 12. Prueba cualitativa de Biuret

5.5 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

En la tabla 9 se registran los valores de absorbancia que se obtuvo para las soluciones de BSA, corresponde al promedio de las réplicas. Se graficó la curva de calibración utilizando los datos que generaron una tendencia lineal como se muestra en la Figura 13.

Tabla 9. Mediciones de absorbancia para las soluciones estándar de BSA

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia a 550 nm
1	2	0,777
2	4	0,867
3	8	1,035
4	10	1,120

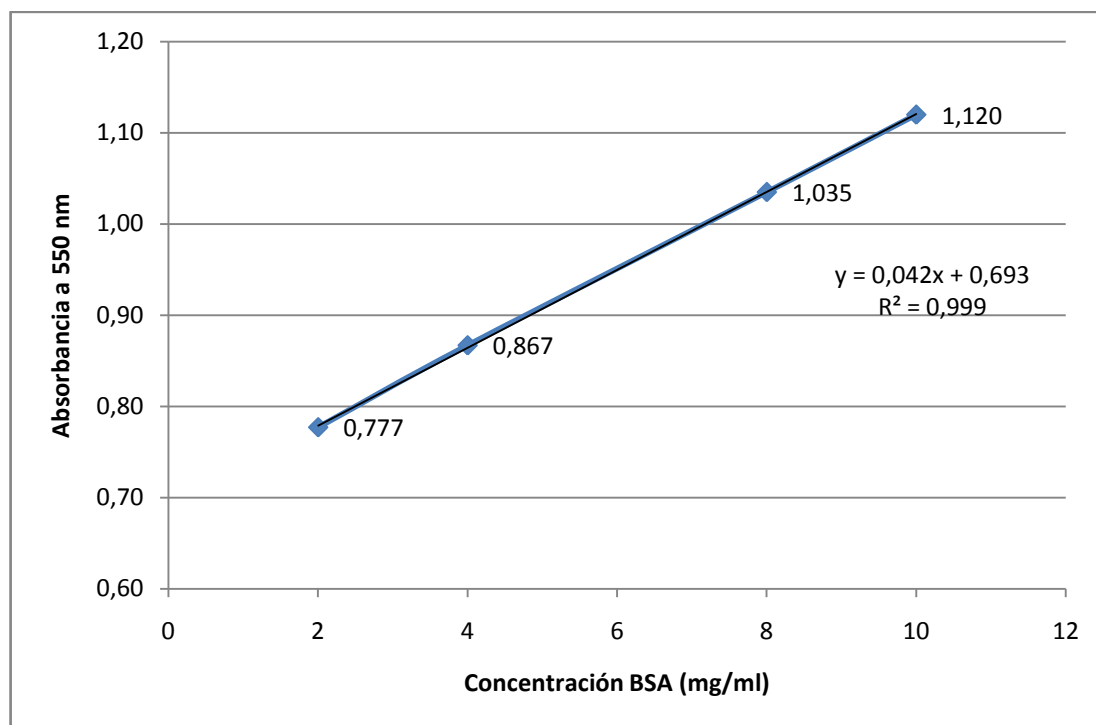


Figura 13. Curva de calibración con BSA

Se determinó la concentración de las muestras incógnitas extrapolando, los resultados se muestran en la Tabla 10. Se obtuvo que las concentraciones de proteína fueron mayores para las muestras en las cuales la relación de fases era cercana a uno (valores registrados en la Tabla 7), a medida que incrementa el valor de esta variable el sistema logra sobrellevar los fenómenos de saturación que se presentan, lo que favorece el desplazamiento de la enzima hacia la fase superior [3].

Tabla 10. Concentración de proteína en las muestras

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia a 550 nm
1	14,10	1,285
2	14,33	1,295
3	20,36	1,548
4	18,67	1,477
5	13,48	1,259
6	10,00	1,113
7	16,40	1,382
8	18,60	1,474
9	15,00	1,323
10	12,07	1,200
11	21,21	1,584
12	11,24	1,165
13	10,29	1,125
14	20,81	1,567
15	13,52	1,261
16	18,17	1,456
17	19,24	1,501
18	23,79	1,692
19	19,36	1,506
20	22,79	1,650

Debido a que el PEG que se utilizó fue de un peso molecular alto, en la fase superior del sistema se generó un aumento en la hidrofobicidad e incrementó el volumen de agua excluido de esta fase. A medida que las cadenas poliméricas incrementan su longitud, las fuerzas de interacción entre las mismas aumentan y el volumen libre entre ellas se reduce, esto ocasiona que los compuestos con alto peso molecular no se alojen en el reducido volumen disponible [3]. Por esta razón el elevado peso molecular de los componentes de no interés, ocasiona que estos se precipiten hacia la fase inferior y se favorezca la concentración de la papaína en la fase superior.

Una forma adicional de aumentar el volumen excluido de la fase superior es incrementando la longitud de línea de corte (LLC). Un incremento en el % LLC favorece una mayor concentración de PEG en la fase superior del sistema, por lo tanto mayor es el volumen excluido de la misma [3]. Las mayores concentraciones de la enzima fueron para experimentos en que los que el % LLC fue mayor al 20%.

5.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En la tabla 11 se registran los valores de absorbancia que se obtuvo para los filtrados de las muestras estándar y su concentración, a cada uno de los valores se le restó el valor de la absorbancia del blanco (0,060). Se graficó la curva de calibración utilizando los datos con que generaron una tendencia lineal como se muestra en la Figura 14.

Tabla 11. Mediciones de absorbancia para las soluciones estándar de papaína

Concentración (mg/ml)	Absorbancia a 280 nm
0,004	0,103
0,006	0,180
0,008	0,129
0,010	0,142
0,012	0,111
0,014	0,167

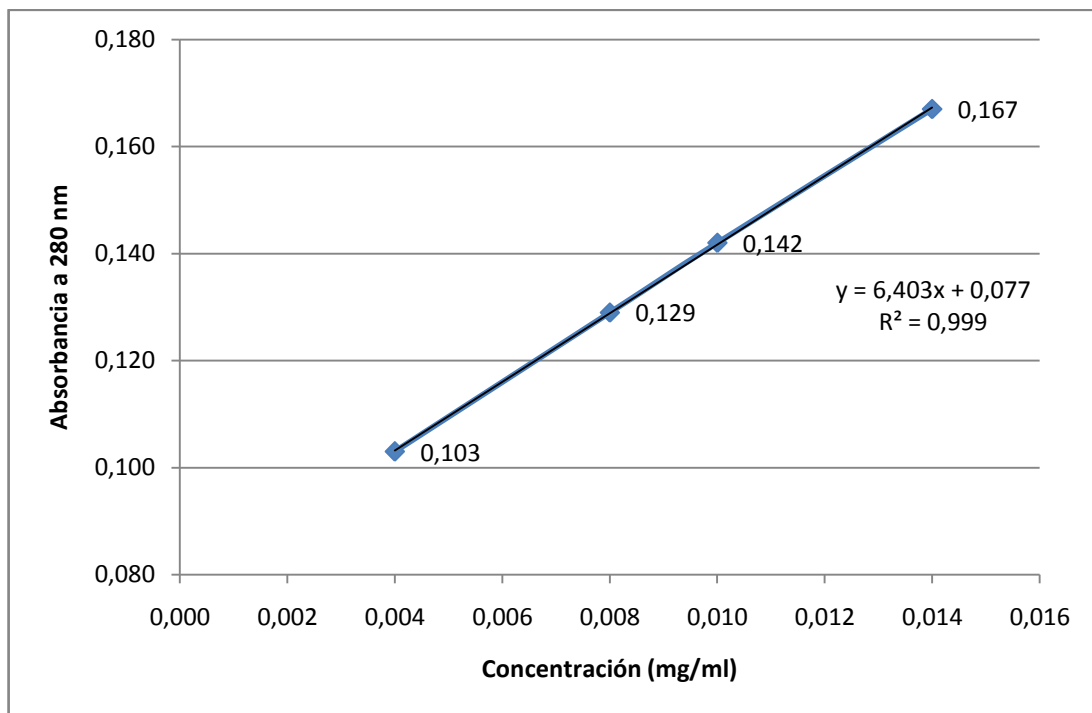


Figura 14. Curva de calibración con papaína estándar

Utilizando la curva de calibración, se determinó la concentración de las muestras por extrapolación y se calculó la actividad específica de la enzima utilizando la Ecuación 7 [8]:

$$A_{esp} = \frac{A \times C \times V}{W} \quad Ec (7)$$

Donde:

A_{esp} es la actividad específica de la enzima (U/mg).

A es la actividad específica de la papaína estándar (3000 U/mg).

C es la concentración de cada muestra, extrapolado de la curva de calibración (mg/ml).

W es el peso de la preparación original de la enzima (0,2616 mg).

V corresponde al volumen total de las muestras (10 ml).

Finalmente, se calculó la actividad enzimática por medio de la Ecuación 8 [28, 34]:

$$AE = A_{esp} [P] \quad Ec (8)$$

Donde:

AE es la actividad enzimática (U/ml).

[P] es la concentración de proteína (mg/ml).

En la Tabla 12 se muestran la absorbancia, los resultados de concentración que se obtuvo de la curva de calibración y la actividad específica de las muestras.

Tabla 12. Actividad específica de las muestras

Muestra	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
1	0,199	0,019	2.178
2	0,261	0,029	3.288
3	0,253	0,027	3.145
4	0,204	0,020	2.267
5	0,269	0,030	3.432
6	0,245	0,026	3.002
7	0,332	0,040	4.560
8	0,307	0,036	4.112
9	0,237	0,025	2.858
10	0,444	0,057	6.560
11	0,415	0,053	6.046
12	0,154	0,012	1.372
13	0,236	0,025	2.844
14	0,187	0,017	1.963
15	0,388	0,049	5.565
16	0,263	0,029	3.328
17	0,298	0,034	3.951
18	0,308	0,036	4.130
19	0,312	0,037	4.202
20	0,300	0,035	3.987

Se calculó la actividad enzimática a partir de la Ecuación 8, utilizando la actividad específica y la concentración de proteína en las muestras, los resultados se muestran en la Tabla 13.

Los valores de actividad enzimática fueron entre 15000 y 128000 U/ml, de esta manera el proceso genera un producto con alta actividad proteolítica. Los experimentos para los cuales se obtuvo mayor actividad enzimática se realizaron a valores bajos de pH, esto coincide con resultados obtenidos en estudios anteriores [25, 29], donde se encontró que los valores más altos de actividad enzimática se lograron a valores de pH de 3 y 5.

Tabla 13. Actividad enzimática de las muestras

Muestra	Actividad específica (U/mg)	Concentración (mg/ml)	Actividad enzimática (U/ml)
1	2178	14,10	30697,71
2	3288	14,33	47132,44
3	3145	20,36	64023,79
4	2267	18,67	42325,34
5	3432	13,48	46244,77
6	3002	10,00	30017,47
7	4560	16,40	74804,61
8	4112	18,60	76466,93
9	2858	15,00	42876,98
10	6560	12,07	79188,57
11	6046	21,21	128271,70
12	1372	11,24	15417,77
13	2844	10,29	29252,57
14	1963	20,81	40848,18
15	5565	13,52	75260,00
16	3328	18,17	60458,67
17	3951	19,24	76009,45
18	4130	23,79	98237,10
19	4202	19,36	81333,47
20	3987	22,79	90842,24

5.7 ANÁLISIS DE INFRAROJO

Se realizó el espectro infrarrojo de las muestras para determinar la presencia de la papaína, para ello se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo de la transformada de Fourier FT/IR – 4100 JASCO, usando como técnica pastillas de KBr. El espectro de las muestras se comparó con el de la papaína estándar para identificar las similitudes en las bandas de absorción, la Figura 15 corresponde al espectro infrarrojo de la papaína estándar y la Figura 16 el de una de las muestras más representativas, en las Tablas 14 y 15 se registran los valores de la longitud de onda y la transmitancia para estos espectros.

Tabla 14. Valores para el espectro IR de la papaína estándar

Número	Posición (cm ⁻¹)	Intensidad (%T)
1	3247,540	91,6358
2	2885,950	82,0325
3	1466,600	86,2971
4	1424,170	87,8267
5	1346,070	89,5234
6	1110,800	60,3105
7	958,448	87,4567
8	841,776	87,5584
9	617,109	85,7181

Tabla 15. Valores para el espectro IR de la muestra

Número	Posición (cm ⁻¹)	Intensidad (%T)
1	3239,820	88,2721
2	2885,950	72,2017
3	1466,600	78,9458
4	1424,170	83,007
5	1347,030	83,9407
6	1109,830	45,5578
7	956,520	79,7949
8	841,776	80,5516
9	618,074	79,1753

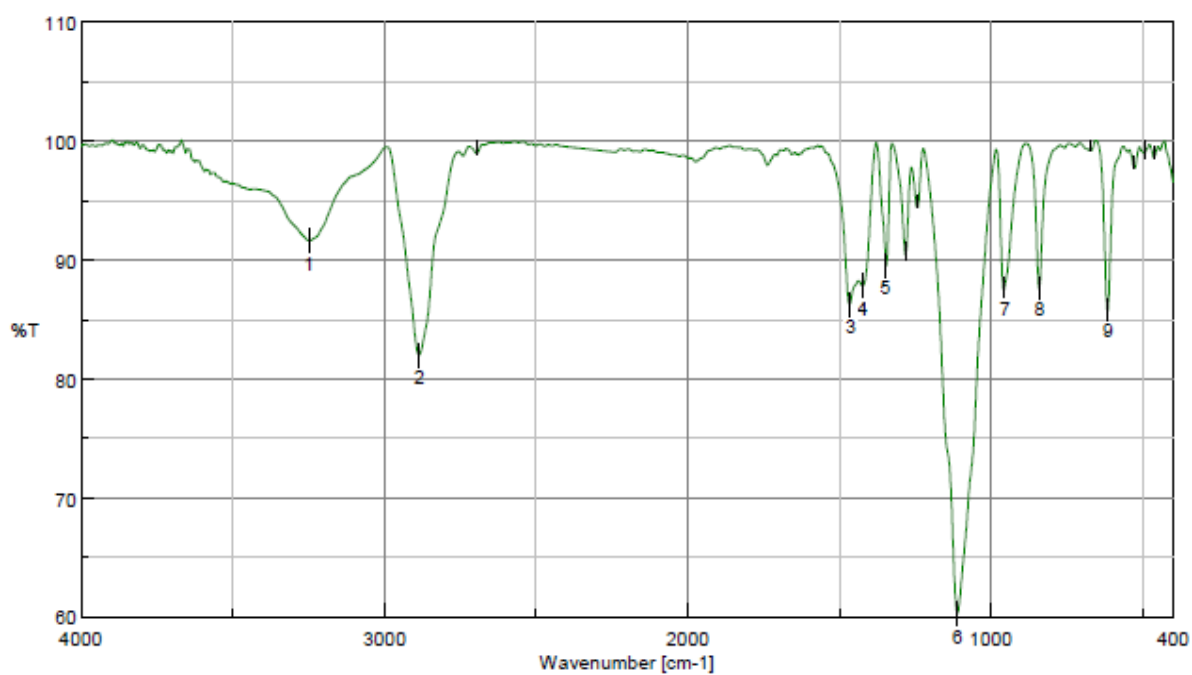


Figura 15. Espectro IR de la papaína estándar

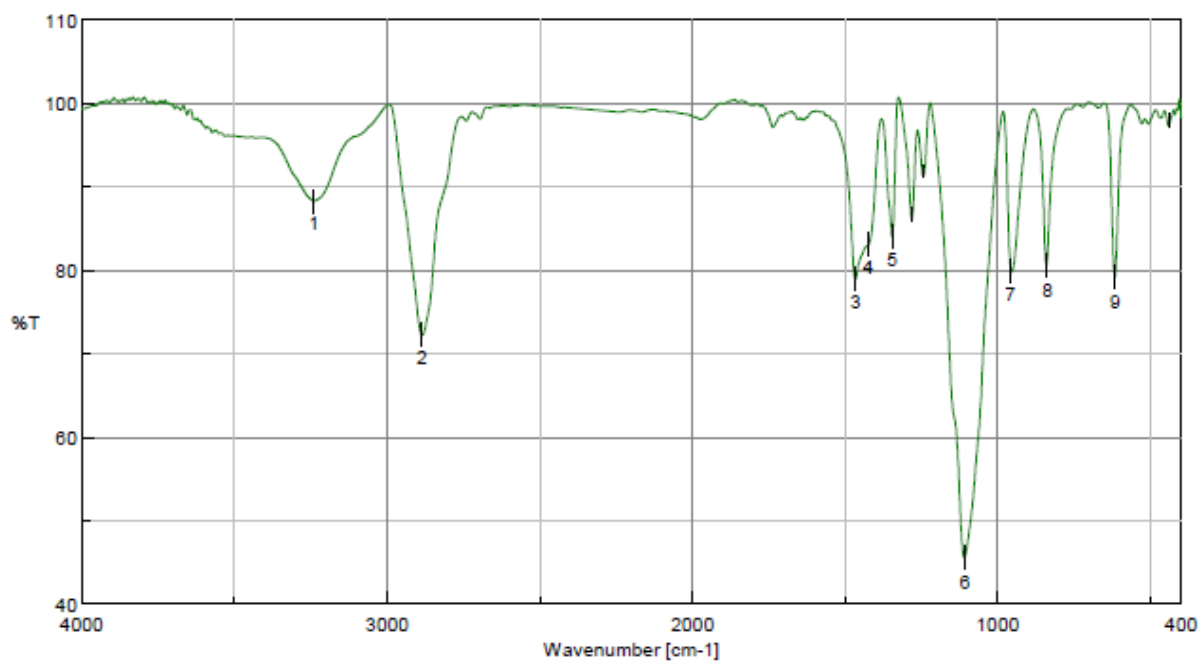


Figura 16. Espectro IR de la muestra

Los espectros IR que se obtuvieron proporcionan diferentes tipos de información, en primer lugar las bandas de absorción que se señalan en el espectro IR de la papaína estándar coinciden con los valores del espectro IR de la muestra. Adicional las señales que se encuentran entre una longitud de onda de 1000 a 1650 cm^{-1} generalmente representan la huella digital del compuesto porque es característico de cada sustancia, por ende es un medio adecuado de identificación al comparar la muestra con el estándar de la enzima, y se observa que las bandas de absorción coinciden en posición con valores de intensidad similares. De esta manera, se puede inferir la presencia de papaína en la muestra.

En Tabla 16 se comparan los valores obtenidos de las bandas para una de las muestras, con los valores teóricos del espectro IR de la papaína [15,33]. En la figura 16 que corresponde al espectro de la muestra, se observan las diferentes bandas características de los grupos funcionales como se explica a continuación:

- En una longitud de onda de 3239,8 cm^{-1} , la banda que se debe al estiramiento del enlace N-H de las amidas secundarias N-sustituidas (Punto 1).
- En una longitud de onda de 2885,9 cm^{-1} , la banda que se debe al estiramiento del enlace C-H (Punto 2).
- En una longitud de onda de 1466,6 cm^{-1} , la banda que se debe al estiramiento del enlace C=O, anión carboxilato y un grupo amida (Punto 3).
- En una longitud de onda de 1424,2 cm^{-1} , la banda que se debe a la deformación del enlace N-H y al estiramiento del enlace C-N (Punto 4).
- En una longitud de onda de 1347,0 cm^{-1} , la banda que se debe a la deformación del enlace C-H unido a las cadenas alquílicas de los aminoácidos (Punto 5).
- En las longitudes de onda entre 500 y 1200 cm^{-1} , los picos pronunciados se deben a al estiramiento de los enlaces C – S, sulfuros y disulfuros (Puntos 6 - 9).

Tabla 16. Comparación de las bandas teóricas de la papaína con las de la muestra

Número	Posición teórica (cm ⁻¹)	Origen de la banda	Posición (cm ⁻¹)
1	3225 - 3450	Estiramiento del enlace N - H	3239,82
2	2859 - 2968	Estiramiento del enlace C - H	2885,95
3	Alrededor de 1640	Estiramiento del ión carboxilato y un grupo amida	1466,60
4	Alrededor de 1500	Estiramiento del enlace C - H y deformación del enlace N - H	1424,17
5	Alrededor de 1400	Deformación del enlace C - H	1347,03
6	500 - 1200	Estiramiento del enlace C - S	1109,83
7	500 - 1200	Estiramiento del enlace C - S	956,52
8	500 - 1200	Estiramiento del enlace C - S	841,77
9	500 - 1200	Estiramiento del enlace C - S	618,07

5.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI, se analizaron los efectos de las variables por medio de gráficas de Pareto y superficies de respuesta. Se utilizó la siguiente nomenclatura para el análisis de las variables:

- A: Concentración inicial de muestras (ConcMuestra).
- B: Concentración de PEG (ConcPEG).
- C: Concentración de sulfato de amonio (ConcSulfAmonio).
- D: pH.

Se analizaron las siguientes interacciones entre las variables:

- AB
- AC
- AD
- BC
- BD

- CD

Los datos experimentales se procesaron en el programa de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Tipo de diseño: Factorial 2⁴.
- Puntos centrales por bloque: 4.
- Total de ejecuciones: 20.
- Número de variables de respuesta: 1

5.8.1 Análisis de varianza y diagrama de Pareto Se evaluó el efecto de las variables en la actividad específica de la papaína mediante el análisis de varianza ANOVA (Tabla 17) y el diagrama de Pareto (Figura 17).

Tabla 17. Análisis de varianza ANOVA para la actividad específica de la enzima

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: ConcMuestra	8,5644E6	1	8,5644E6	19,24	0,0018
B: ConcPEG	495616,	1	495616,	1,11	0,3188
C: ConcSulfAmonio	5,42191E6	1	5,42191E6	12,18	0,0068
D: pH	1,0857E7	1	1,0857E7	24,39	0,0008
AB	644006,0	1	644006,	1,45	0,2597
AC	98596,0	1	98596,0	0,22	0,6491
AD	756,25	1	756,25	0,00	0,9680
BC	2,2515E6	1	2,2515E6	5,06	0,0511
BD	2,07648E6	1	2,07648E6	4,67	0,0591
CD	55460,3	1	55460,30	0,12	0,7322
Error total	4,00581E6	9	445090,00		
Total (corr.)	3,44716E7	19			

R² = 88,38 %

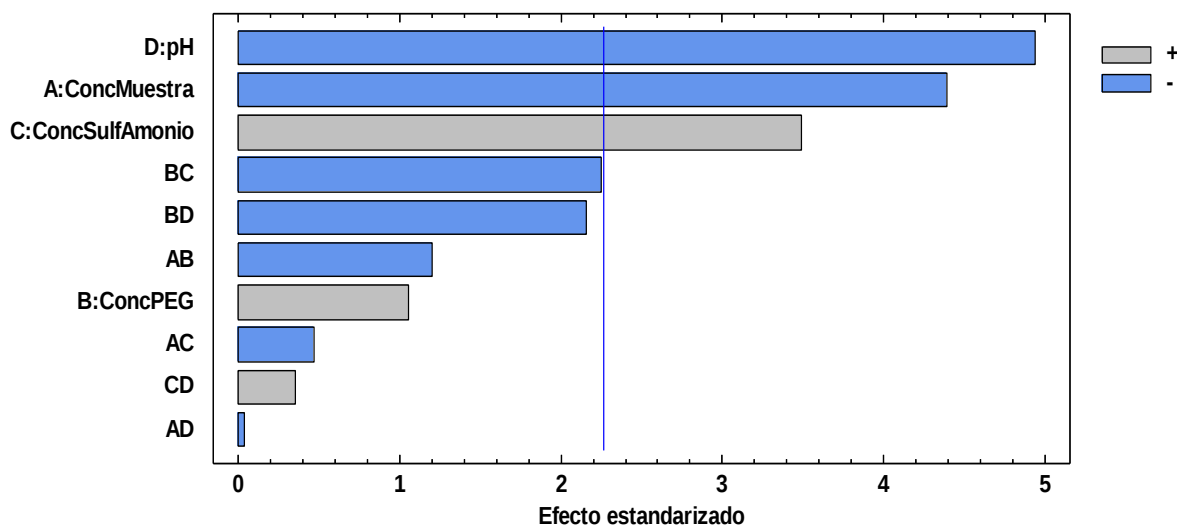


Figura 17. Diagrama de Pareto estandarizado para la actividad específica de la enzima

Los factores que tuvieron un efecto significativo en el proceso con un nivel de confianza del 95 % fueron el pH, la concentración de la muestra y la concentración del sulfato de amonio.

El pH ejerció efecto inverso en la actividad específica de la enzima, es decir valores bajos de pH favorecieron el aumento de la variable de respuesta. Generalmente los sitios activos de las enzimas están compuestos por grupos ionizables que deben tener la forma iónica apropiada para mantener la estructura del sitio y así catalizar la reacción, por esta razón las condiciones de pH del medio tienen una influencia directa en la actividad enzimática. En el caso de la papaína se han reportado resultados favorables para la actividad enzimática a valores de pH de 3 y 5 [25, 29].

De igual forma, la concentración inicial de la muestra ejerció un efecto inverso en la actividad específica de la enzima. Debido a que el PEG que se utilizó era de un peso molecular alto, al aumentar las concentraciones iniciales de la muestra se genera un efecto de solvatación limitado en el polímero [25], se aumenta el volumen excluido de la fase

superior y por ende parte del compuesto de interés se precipita hacia la fase inferior del sistema.

La concentración de sulfato de amonio tuvo un efecto proporcional al aumento de la actividad específica, esto se generó debido al efecto *salting out* [25]. Al aumentar la concentración de sulfato de amonio en la fase inferior, las moléculas de agua rodean las moléculas de sal, limitando la cantidad de moléculas disponibles para solubilizar la enzima, por ende ésta no puede ingresar a la fase inferior y se concentra en la fase del PEG donde se recupera.

Adicional se observa que la concentración del PEG al igual que las interacciones entre las variables, no tuvieron un efecto significativo en la actividad específica de la enzima, esto coincide con resultados reportados en estudios previos [25].

5.8.2 Superficies de respuesta Se realizaron gráficas de superficie para visualizar el efecto de las variables significativas en la variable de respuesta (Figura 18), la altura de la superficie representa la actividad específica de la enzima (U/mg) y los colores representan el perfil de cambio de esta variable.

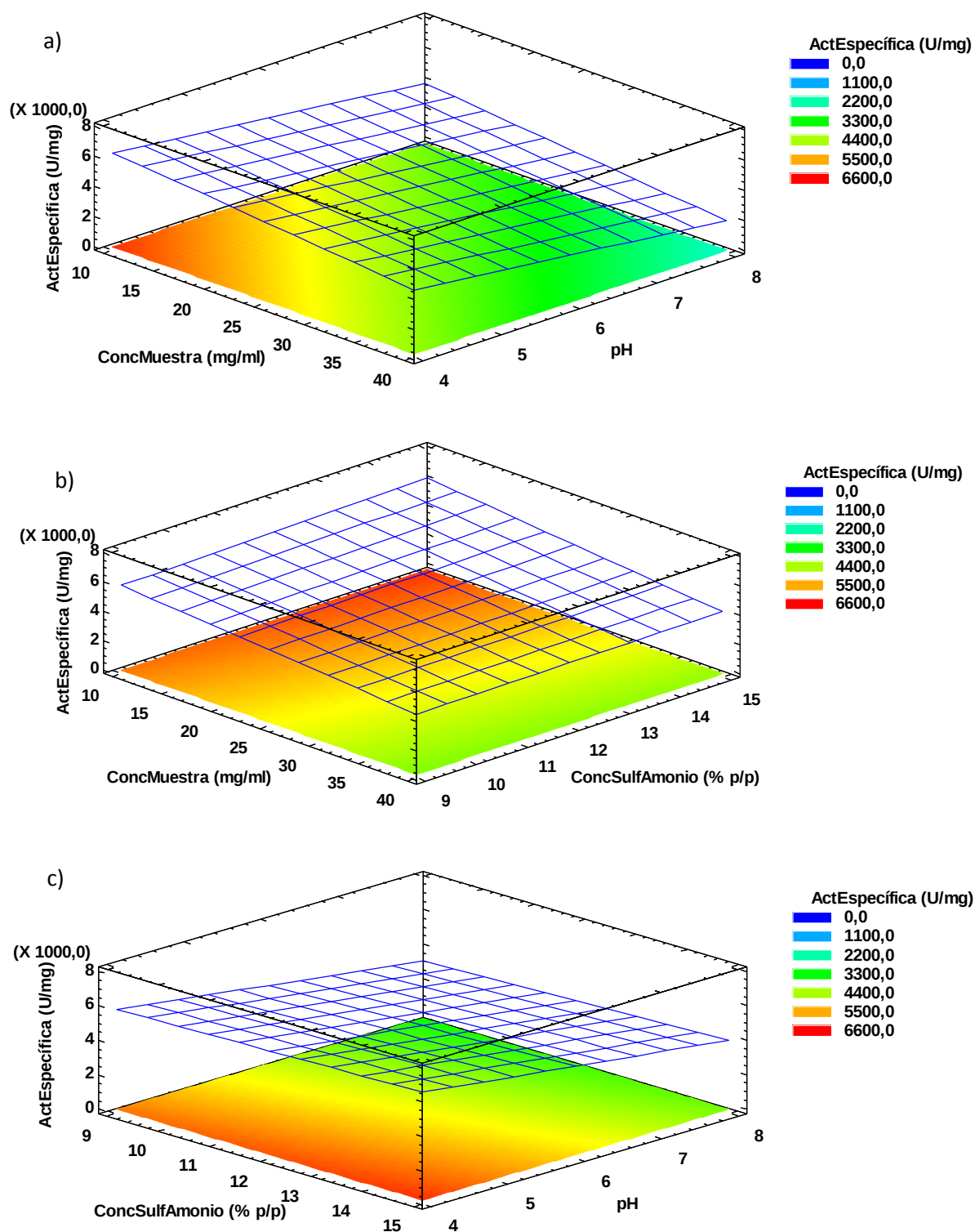


Figura 18. Gráficas de superficie de respuesta para la actividad específica de la enzima

En cada una de las gráficas es posible analizar el efecto de dos de las variables para lo cual se dejan fijas las dos restantes, se utilizaron los valores que generan la mayor actividad específica de la siguiente manera:

- Figura 18.a: Se mantuvo fija la concentración de PEG en 12% y la concentración de sulfato de amonio en 15%.
- Figura 18.b: Se mantuvo fija la concentración de PEG en 12% y el pH en 4.
- Figura 18.c: Se mantuvo fija la concentración de PEG en 12% y la concentración inicial de la muestra en 10 mg/ml.

Se puede observar que las regiones de color rojo de las superficies representan las condiciones del proceso para las cuales se alcanza el mayor valor de actividad específica en el producto final.

En la Figura 18.a se observa los efectos de la concentración de la muestra y el pH, la actividad específica aumenta a medida que los valores de estas dos variables disminuyen, en la Figura 18.b se observa que los valores máximos de la variable de respuesta se alcanzan para el nivel más bajo de la concentración inicial de la muestra y el nivel más alto de la concentración de sulfato de amonio, adicional en la Figura 18.c se puede analizar que los valores mayores de la actividad específica se alcanzan para el nivel más alto de la concentración del sulfato de amonio y el nivel más bajo de pH.

5.8.3 Evaluación del modelo estadístico El ajuste del modelo estadístico que realizó STATGRAPHICS Centurion XVI fue una ecuación de segundo orden que está formada por cada factor experimental aislado (efectos principales) y términos que acompañan la interacción de cada par de factores, definido así:

$$Y = \lambda_0 + \lambda_A A + \lambda_B B + \lambda_C C + \lambda_D D + \lambda_{AB} AB + \lambda_{AC} AC + \lambda_{AD} AD + \lambda_{BC} BC + \lambda_{BD} BD + \lambda_{CD} CD \quad Ec (9)$$

Donde:

Y es la actividad específica (Variable de respuesta).

λ_n son los coeficientes de la ecuación.

A, B, C, y D son las variables del diseño.

En la Tabla 18 se registran los valores de los coeficientes, la regresión tiene un valor de $R^2 = 88,38 \%$.

Tabla 18. Valores de los coeficientes para el ajuste del modelo

Coeficientes	Estimado
λ_0	-4029,260
λ_A	13,658
λ_B	1030,540
λ_C	553,903
λ_D	16,479
λ_{AB}	-4,458
λ_{AC}	-1,744
λ_{AD}	-0,229
λ_{BC}	-41,680
λ_{BD}	-60,041
λ_{CD}	9,812

5.9 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE PURIFICACIÓN

La pureza de una enzima se expresa en términos de la actividad específica, esta magnitud relaciona la actividad enzimática con la concentración de proteínas totales. A partir del análisis estadístico que se realizó en STATGRAPHICS Centurion XVI se encontró que las mejores condiciones de acuerdo al diseño experimental son las siguientes:

- Concentración inicial de la muestra de 10 mg/ml.
- Concentración de PEG de 12% (p/p).
- Concentración de sulfato de amonio 15% (p/p).
- pH 4.

Este resultado también se puede verificar en la Tabla 13 donde se observa que para estas condiciones del proceso se obtiene el mayor valor de actividad específica de la enzima, que es la variable de respuesta. Con la Ecuación 9 que proporciona el modelo estadístico se calculó la variable de respuesta utilizando las mejores condiciones, se obtuvo una actividad específica de 6560 U/mg, valor cercano al que resultó en las pruebas experimentales.

La concentración inicial de la muestra resultó ser el nivel más bajo, lo que indica que el proceso de purificación se puede aplicar desde bajas concentraciones de látex. En cuanto a las concentraciones de las fases, las mejores condiciones del proceso requieren las cantidades más altas definidas en el proceso experimental para procesar bajas cantidades de muestra. Este resultado coincide con lo reportado en la literatura, donde se especifica que la partición de compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular se ve influenciada de forma positiva por el uso de concentraciones altas de polímero y sal [3]. Entre las enzimas presentes en el látex de la *Carica papaya*, la papaína tiene el menor peso molecular y mayor comportamiento hidrofóbico. El pH del medio que favorece el proceso de purificación resultó ser bajo y favoreció la conservación de la actividad enzimática de la papaína.

Para las mejores condiciones de purificación el % LLC fue 47,47 %, esto está acorde a las referencias consultadas donde se establece que para compuestos hidrofóbicos se deben utilizar % LLC mayores al 40% para aumentar la hidrofobicidad de la fase del PEG y favorecer la recuperación de la enzima en esta fase [3].

6. CONCLUSIONES

El sistemas de dos fases acuosas (SDFA) polietilenglicol 6000 (PEG) – sulfato de amonio es una técnica efectiva para purificar papaína a partir del látex de la *Carica papaya*. Permite recuperar la papaína en la fase superior del sistema y separarla de otras proteasas contenidas en el látex, sin necesidad de realizar un pretratamiento en el que se elimine material insoluble.

El SDFA PEG 6000 – sulfato de amonio, se puede utilizar en conjunto con un proceso de separación en el que se aumenta la concentración de PEG hasta 20 % (p/p) para precipitar la enzima, sin afectar negativamente la recuperación ni la actividad enzimática.

Para frutos con 2 a 3 meses de edad se obtuvo un rendimiento de extracción de 8,19 g látex/kg de papaya, en un periodo aproximado de dos semanas, pasado este tiempo los frutos maduraron y no liberaron más cantidad de látex. Si en el Valle del Cauca se obtiene un promedio de 56,96 toneladas de papaya/hectárea [13], se tiene un potencial de extracción de 466,50 kg de látex/hectárea para procesar, lo que daría un valor agregado a los cultivos de papaya en el departamento y una forma de diversificar en cuanto a productos para el mercado colombiano, ya que la papaína es una enzima con múltiples aplicaciones industriales.

En el procedimiento experimental, el sistema se comportó de acuerdo al diagrama de fases del PEG 6000 – sulfato de amonio. El incremento del % LLC favoreció el volumen de agua excluido y la hidrofobicidad de la fase superior, beneficiando la recuperación de la enzima. Las mayores concentraciones de la enzima se obtuvieron para los sistemas en los que el % LLC fue mayor al 20%.

La liofilización resultó ser un método eficiente de concentración de la enzima, para todas las muestras se obtuvo un porcentaje de remoción de humedad superior al 95 %, adicional este proceso de secado preservó la actividad proteolítica de la papaína.

El espectro IR de las muestras obtenidas para el sistema de dos fases acuosas fue similar al espectro de la papaína estándar, ya que las bandas de absorción que son características del compuesto resultaron en la misma longitud de onda y con valores de transmitancia muy cercanos.

El análisis de varianza ANOVA y el gráfico de Pareto indicaron que los factores que tuvieron un efecto significativo en el proceso, con un nivel de confianza del 95 %, fueron el pH, la concentración de la muestra y la concentración del sulfato de amonio. La actividad específica de la enzima se favoreció para el nivel más alto de concentración de sulfato de amonio y los niveles más bajos del pH y la concentración inicial de la muestra.

El ajuste de los datos experimentales por medio del modelo estadístico generó una ecuación de segundo orden conformada por los factores experimentales aislados y términos que acompañan la interacción de cada par de factores, el R^2 fue de 88,38 %.

Se encontró que las mejores condiciones de purificación fueron 10 mg/ml para la concentración inicial de la muestra, 12% (p/p) para la concentración de PEG, 15 % (p/p) para la concentración de sulfato de amonio y pH 4. Con estas condiciones de purificación se obtuvo una actividad específica de la muestra de 6560 U/mg.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUIRRE, E y CASTILLO, P. Extracción y estudio comparativo de las enzimas proteolíticas del fruto toronche (*Carica-Stipulata*) y de la papaya (*Carica-Papaya*) y su aplicación en la industria alimenticia. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. 2009.
- [2] AZARKAN, M. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. En: Journal of Chromatography. 2003. Vol. 790, p 229-238.
- [3] BENAVIDES, J; PALOMARES M. Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol – sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. En: Revista mexicana de ingeniería química. 2008. Vol. 7, No. 2, p 99-111.
- [4] CANO, E; MARTINEZ, E. Análisis de prefactibilidad de la producción y obtención de la enzima papaína. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana, 2004. p 16-17.
- [5] CHAVERRI, A. Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos. Tesis para optar al título de licenciada en tecnología de alimentos. Universidad de Costa Rica. Carrera interdisciplinaria en tecnología de alimentos, 1983. p 3.
- [6] CHEN, T; *et al.* Comparison: Adsorption of papain using immobilized dye ligands on affinity membranes. En: Colloids and Surfaces B: Biointerface. Marzo, 2009. Vol. 72, p. 25-31.
- [7] CISNEROS, M; RITO. Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. En: Revista mexicana de ingeniería química. 2005. Vol. 4, No. 1, p 131-139.

- [8] ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. Método analítico de la actividad proteolítica vegetal (FCC-PU) [en línea]. [Citado 23 de marzo de 2012]. Disponible en: http://www.enzymedevelopment.com/es/pdf/Assays/zz5PLANT_Sp.pdf
- [9] FEIJOO L; VILLA, T. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. En: Food bioprocess technol. Septiembre, 2010.
- [10] FERNÁNDEZ, J. Plan de negocios para la producción de papaína en la séptima región. Tesis para optar al título de ingeniero civil industrial. Curicó: Universidad de Talca. Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Civil Industrial, 2005. p 15 -21.
- [11] GALINDO, E. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. En: Process biochemistry. Junio, 2009. Vol. 44, p 77-82.
- [12] GILBOTA, G; GARRO, O y JUDIS, A. Comparación de distintos métodos para medir la actividad enzimática del látex de *Carica papaya*. Chaco: Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas, 2000.
- [13] GOBERNACIÓN DEL VALLE DEL CAUCA. Guía de costos agrícolas [en línea]. [Citado 21 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.valledelcauca.gov.co/agricultura/publicaciones.php?id=966>
- [14] GUTIÉRREZ, G; *et al.* Determinación del efecto de la maduración de la lechosa (*Carica papaya* L.) sobre la concentración de la papaína. Maracaibo: Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería.
- [15] GYÖRGY, E; *et al.* Biomolecular papain thin films grown by matrix assisted and conventional pulsed laser deposition: A comparative study. En: Journal of applied physics. Diciembre, 2009. International Journal of Nanomedicine. Septiembre, 2011.

- [16] HATTI-KAUL, R. Aqueous two phase systems: methods and protocols: Methods in biotechnology. Center for chemistry and chemical engineering. Totowa: Humana Press, 2000. p. 355-360.
- [17] JOHANSSON, G. Recovery of proteins and phase components. En: Methods in biotechnology. 2000. Vol. 11, No 4, p 355-361.
- [18] KRISHNAIAH, D; *et al.* Commercialisation of papain enzyme from papaya. En: Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources. Abril, 2002. Vol. 1, p 244-250.
- [19] KYNDT, T; *et al.* Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. Belgica: Ghent University. Facultad de Biociencias e Ingeniería, 2006. p 451- 462.
- [20] LIGGIERI, C; *et al.* Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. En: Acta Biochim Biophys (ABBS). Noviembre, 2008. p 154-162.
- [21] MADRIGAL, L. Efecto de algunas variables sobre el rendimiento de la papaína. Tesis de tecnología de alimentos. San José: Universidad de Costa Rica. Carrera interdisciplinaria en tecnología de alimentos, 1978. P 1-4.
- [22] MINGLIANG, L; *et al.* Purification and in situ immobilization of papain with aqueous two-phase system. En: Plos One. Diciembre, 2010. Vol. 5, No. 12.
- [23] MOHAMED, A; *et al.* Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. En: Journal of chromatography. 2003. Vol. 790, p 129-138.

- [24] MONTI, R; BASILIO, C; TREVISAN, H y CONTIERO, J. Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. En: Brazilian archives of biology and technology. Septiembre, 2004. Vol. 43, No. 5, p 501-507.
- [25] NITSAWANG, S; HATTI-KAULB, R y KANASAWUDA, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. En: Enzyme and microbial technology. Center for Chemistry and Chemical Engineering. Febrero, 2006. Vol. 39, p. 1103-1107.
- [26] OBREGÓN, W. Hidrolasas de látex de especies del género *Araujia*. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis de doctorado. La Plata: Universidad de Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas, 2008. p 1-22.
- [27] ORTIZ, A. Estudio sobre la actividad proteolítica y secado del látex de la papaya (*Carica papaya* L.) en Costa Rica. Tesis de tecnología de alimentos. San José: Universidad de Costa Rica. Carrera interdisciplinaria en tecnología de alimentos, 1978. p 3-8.
- [28] PHANUPHONG, C; RAWDKUENB, S; BENJAKULC, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol–salts biphasic system. En: Process Biochemistry. Abril, 2010. No. 45, p 1148–1155.
- [29] QUINO, J; BERNAL, N. Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada. En: Revista Ingeniería, 2008, n° 26, p 201-229.
- [30] RATANAPONGLEKA, K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. En: International journal of chemical engineering and applications. Agosto, 2010. Vol. 1, No. 2, p 191 – 198.
- [31] RESTREPO, J; ZULUAGA, H. Fundamentos estructurales de bioquímica. Programa Editorial. Cali, 2011.

- [32] SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. En: Fluid phase equilibrium. Junio, 2001. p 489-498.
- [33] SHARMA, M; *et al.* Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. En: International Journal of Nanomedicine. Septiembre, 2011. p 2097 – 2111.
- [34] SINCHE, M. Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*. Tesis para optar al título de ingeniero agroindustrial. Quito: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial, 2009. p 50-51.
- [35] UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Cuaderno de prácticas de bioquímica [en línea]. [Citado 13 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.ucm.es/info/biomol3/practicas/guiones/guion%20BQH.u.pdf>
- [36] VALLE, M; ALVARADO, S. Estudio de factibilidad para el establecimiento de una planta procesadora de papaína cruda en Honduras. Tesis para optar al título de ingeniero agrónomo. Costa Rica: Universidad Earth. Facultad de Ingeniería, 2003. p 24-25.
- [37] WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. Characteristics of Papain from *Carica papaya* [en línea]. [Citado 22 de enero 2012]. Disponible en: <http://www.worthington-biochem.com/pcyp/default.html>.

ANEXOS
FOTOGRAFÍAS DE LOS EQUIPOS



Figura A1. Centrífuga refrigerada



Figura A2. Liofilizador



Figura A3. Espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific



Figura A4. Espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300