



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

**ESCUELA DE INGENIERA EN
INDUSTRIAS AGROPECUARIAS**

**“CUANTIFICACIÓN DEL
CONTENIDO DE PAPAÍNA Y SU
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN
SEIS ESPECIES DEL GÉNERO
VASCONCELLEA, NATIVAS
DEL SUR DEL ECUADOR”.**



TESIS PREVIA A LA
OBTENCIÓN DE
INGENIERO EN
INDUSTRIAS
AGROPECUARIAS.

AUTORES:

María Jackeline Viñamagua Cordova
Rosa Aurora Sanchez Pasaca

DIRECTOR:

Ing. MS. Ángel Vicente Tene Tene.

LOJA- ECUADOR
2005

CESION DE DERECHO DE TESIS

NOSOTRAS:

María Jackeline Viñamagua C.

Rosa Aurora Sánchez P.

Declaramos conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: **“Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”**.

María Jackeline Viñamagua C.

Rosa Aurora Sánchez P.

Ing. MS. Ángel Vicente Tene Tene
Profesor de la Escuela de Ingeniería en
Industrias Agropecuarias de la Universidad
Técnica Particular de Loja, Director de Tesis.

Certifica:

Que el presente trabajo ha sido revisado y cumple con los requisitos exigidos para esta clase de investigación, por tanto autorizo su presentación y defensa.

Ing. MS. Ángel Vicente Tene T.

Loja, 24 de octubre de 2005.

AUTORIA

Las ideas, conceptos y contenidos vertidos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de las Autoras.

María Jackeline Viñamagua C.

Rosa Aurora Sánchez P.

DEDICATORIA

Se lo dedico a mis padres por sus consejos, paciencia y apoyo incondicional; a mi esposo Jorge por su ayuda y confianza; a mi pequeña hija Ximena que cada día me alienta con su ternura; a mis hermanos por su colaboración; y en especial a Dios, por darme ese espíritu de lucha y sabiduría, para alcanzar esta meta.

Jackeline.

A mis queridos padres y hermanos, por su ayuda y cariño; a mi esposo Félix y a mis hijos Analy, Gabriel y Michelle por su amor y apoyo incondicional para la culminación de mi carrera profesional.

Rosa

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Técnica Particular de Loja; a la Escuela de Ingeniería en Industrias Agropecuarias; al personal de los laboratorios: de Tecnologías, Química y Métodos Instrumentales pertenecientes al Centro de Transferencia de Tecnología e investigación Agroindustrial (CETTIA); de Biología Molecular del Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) y de Productos Naturales que contribuyeron a la realización de la presente investigación.

En particular nuestro sincero agradecimiento al Ing. **Ángel V. Tene**, por la disección en el desarrollo de esta investigación; al Ing. Hernán Lucero Director de la Escuela de Ingeniería Agropecuaria; al Blgo. Máximo Moreira Director de la Unidad de Micropropagación Vegetal, al Sr. Alex Morales colaborador de esta Unidad, encargados del proyecto “Manejo y Conservación de *Vasconcelleas* del Sur del Ecuador” y al Ing. José Romero de la Fundación Científica San Francisco, por facilitarnos información requerida para esta investigación.

INDICE

	Pág.
Cesión de derechos.....	iii
Certificación.....	iv
Autoría.....	v
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Índice.....	viii
Lista de tablas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Resumen.....	xiii
Summary.....	xv

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN..	2
1.2 FIN DEL PROYECTO.....	5
1.3 PROPÓSITO DEL PROYECTO.....	5
1.4 COMPONENTES DEL PROYECTO.....	5
1.5 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.5.1 Métodos y técnicas.....	6
1.5.2 Diseño experimental.....	7
1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	9

CAPITULO II

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	11
2.1 ENZIMAS.....	11
2.1.1 Características Generales.....	11
2.1.2 Cinética de las reacciones enzimáticas.....	13
2.1.3 Determinación cuantitativa de la actividad enzimática.....	14
2.1.4 Unidades de actividad enzimática.....	15
2.1.5 Principios de aislamiento y purificación de enzimas.....	15
2.2 LA PAPAIA.....	16
2.3 TAXONOMIA GENERAL DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO	
VASCONCELLEA.....	19
2.3.1 <i>Vasconcellea monoica</i>	19
2.3.2 <i>Vasconcellea palandensis</i>	20
2.3.3 <i>Vasconcellea stipulata</i>	21
2.3.4 <i>Vasconcellea x heilbornii nm</i> var. Guisaguiña.....	22
2.3.5 <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	23
2.3.6 <i>Vasconcellea x heilbornii nm.</i> var. Gualel.....	24

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1 MATERIA PRIMA.....	26
3.2 ANALÍISIS DEL FRUTO.....	26
3.3 TECNOLOGÍA APLICADA.....	27
3.3.1 Extracción y conservación de látex.....	27

3.3.2	Separación y conservación de la enzima.....	28
3.3.3	Determinación de la actividad enzimática.....	29
3.3.4	Secado por liofilización.....	30
3.3.5	Trituración.....	31
3.3.6	Envasado.....	31
3.3.7	Almacenamiento.....	32
3.4	DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE PAPAÍNA LIOFILIZADA A NIVEL DE LABORATORIO.....	33

CAPITULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
4.1	UBICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL <i>G. VASCONCELLEA</i>.....	35
4.2	ANÁLISIS DEL FRUTO.....	37
4.3	EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL LÁTEX.....	42
4.4	SEPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA ENZIMA.....	46
4.5	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	50
4.6	SECADO POR LIOFILIZACIÓN.....	55

CAPITULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
5.1	CONCLUSIONES.....	59
5.2	RECOMENDACIONES.....	61

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 4.1 Ubicación de las especies del G. <i>Vasconcellea</i>	35
Tabla 4.2 Análisis Organolépticos de los frutos verdes.....	37
Tabla 4.3 Análisis Organolépticos de los frutos maduros.....	38
Tabla 4.4 Análisis Físico-químico de los frutos verdes.....	39
Tabla 4.5 Análisis Físico-químico de los frutos maduros.....	41
Tabla 4.6 Rendimiento en látex de las especies del G. <i>Vasconcellea</i>	43
Tabla 4.7 Análisis de Varianza.....	44
Tabla 4.8 Análisis físico - químicos de la enzima de las especies estudiadas.....	46
Tabla 4.9 Rendimiento en enzima de las especies estudiadas.....	47
Tabla 4.10 Análisis de Varianza.....	48
Tabla 4.11 Concentración de la enzima en mg/ml de las especies estudiadas.....	51
Tabla 4.12 Actividad enzimática de la enzima de las especies estudiadas..	52
Tabla 4.13 Análisis de Varianza.....	53
Tabla 4.14 Rendimiento en papaína liofilizada de <i>V. stipulata</i> y <i>C. papaya</i> . var. Tocaimera.....	55
Tabla 4.15 Actividad Enzimática de papaína liofilizada de <i>V. stipulata</i> y <i>C. papaya</i> var. Tocaimera.....	56
Tabla 4.16 Análisis de Varianza.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 <i>Vasconcellea monoica</i>	19
Figura 2.2 <i>Vasconcellea palandensis</i>	20
Figura 2.3 <i>Vasconcellea stipulata</i>	21
Figura 2.4 <i>Vasconcellea x heilbornii</i> nm. var. Guisaguiña.....	22
Figura 2.5 <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	23
Figura 2.6 <i>Vasconcellea x heilbornii</i> nm. var. Gualel.....	24
Figura 3.1 Extracción de látex.....	27
Figura 3.2 Separación de látex.....	28
Figura 3.3 Determinación de la actividad enzimática.....	29
Figura 3.4 Secado por liofilización de la papaína.....	30
Figura 3.5 Trituración de la papaína.....	31
Figura 3.6 Envasado de la enzima.....	31
Figura 3.7 Presentación de la enzima.....	32
Figura 4.1 Mapa de ubicación de las especies del G. <i>Vasconcellea</i>	36

RESUMEN

Se cuantificó la Actividad Enzimática de la enzima papaína de seis especies del género *Vasconcellea*, recolectadas en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. Las especies estudiadas fueron: *V. monoica*, *V. palandensis*, *V. stipulata*, *V. x heilbornii nm.* variedad Guisaguiña, *V. cundinamarcensis* y *V. x heilbornii nm.* variedad Gualel.

Para la obtención de esta enzima, se extrajo el látex de los frutos verdes de las especies estudiadas, se transportó en condiciones de congelación y la separación de la misma se realizó por centrifugación a 13400 rpm por 30 minutos. A la enzima purificada se le adicionó Bisulfito de Sodio al 1 % p/p para su conservación.

La Actividad Enzimática se cuantificó a través de una reacción colorimétrica, medida en un espectrofotómetro UV, a una longitud de onda de 280 nanómetros, empleando el Método (9001-73-4) AOAC 54.

Los resultados demostraron, que la *Vasconcellea palandensis* tuvo un mayor rendimiento en látex con un valor de 1,40 % p/p; el mayor rendimiento de la enzima purificada fue la *Vasconcellea x heilbornii nm.* variedad Gualel con un valor de 34.11 % p/p y la Actividad Enzimática de la enzima purificada fue mayor en la *Vasconcellea stipulata* con un valor de 13097,20 USP/mg. Luego del secado por liofilización, la Actividad Enzimática de esta enzima alcanzó un valor de 61281,00 USP/mg.

La Actividad Enzimática de la enzima liofilizada de *Carica papaya* variedad Tocaimera, obtenida en las mismas condiciones, obtuvo un valor de 33766,12 USP/mg, significativamente menor que la enzima liofilizada de la *Vasconcellea stipulata*.

SUMMARY

The Enzymatic Activity of the enzyme papain of six species of the gender *Vasconcellea* was quantified, gatheredes in Loja and Zamora Chinchipe provinces. The species studied were: *V. monoica*, *V. palandensis*, *V. stipulata*, *V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña*, *V.cundinamarcensis*, *V. x heilbornii nm. var. Gualel*.

For the obtaining of this enzyme, the latex of the green fruits of the species studied was extracted and transported under freezing conditions and the separation of the same one was carried out for centrifugation to 13400 rpm for 30 minutes. Purified enzyme was added Bisulfite of Sodium to 1 % p/p for its conservation.

The Enzymatic Activity was quantified through a reaction colorimetric measure in a Spectrophotometer UV, in a wavelength of 280 nanometres, applying the method (9001-73-4) AOAC 54.

The results demonstrated that the *Vasconcellea palandensis* had a high yield in latex with a value of 1,40 % p/p; the biggest yield in the purified enzyme was the *Vasconcellea x heilbornii nm. var. Gualel* with a value of 34,11 % p/p and the Enzymatic Activity of the purified enzyme was bigger in the *Vasconcellea stipulata* with a value of 13097,20 USP/mg. After the drying for liophilization the Enzymatic Activity of this enzyme reached a value of 61281,00 USP/mg.

The Enzymatic Activity of the enzyme papain lyophilized of the *Carica papaya* var. Tocaimera obtained under the same conditions, got a value of 33766,12 USP/mg, meaningly smaller that the enzyme lyophilized of the *Vasconcellea stipulata*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El género *Vasconcellea* es uno de los 6 géneros que conforman la familia de las Caricaceas (Badillo 1993), el cual es uno de los grupos de mayor importancia en el país por su diversidad (Scheldeman, 2002; Soria, 1992), con 21 de las 35 especies de Caricaceas (Van Droogenbroeck, *et. al.* 2004). Ecuador es el país que posee el mayor número de especies del género *Vasconcellea* en el mundo, muchas de las cuales aún no han sido reportadas y son endémicas (Sheldelman, 2002; Van Droogenbroeck, 2004). En los últimos años se ha incrementado el número de especies en Ecuador de 15 a 17 (Badillo 1986, 1992, 1999), casi el 81 % de especies del mundo; el 70 % de estas especies se encuentran en las provincias de Loja, Zamora Chinchipe, El Oro y Azuay, siendo endémicas *V. omnilingua* B. y *V. palandensis* B. (Informe final PROMSA, 2003).

La importancia que esta adquiriendo el género *Vasconcellea* es variada pero se debe principalmente al uso de su diversidad.

Alternativas genéticas para el control biológico por selección de patrones resistentes de plagas y enfermedades como: *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita* en babaco y papaya (Ochoa, J., et al., 1998; Manshardt et. al., 1989; Van Droogenbroeck, 2004), también consideran a las especies del género *Vasconcellea* importantes para aplicaciones

biotecnológicas debido a su resistencia a Papaya Ringspot Virus y tolerancia al frío, patológicas que afectan severamente al cultivo de *Carica papaya*.

Por sus excelentes características organolépticas los frutos del género *Vasconcellea* tiene un alto potencial para productos alimenticios industrializados de alta calidad y aceptación como: fruta en almíbar, jugos, néctares, fruta confitada, mermeladas, etc. (Romero, 2004; Scheldeman, 2002; CORFO, 1980). Hay que destacar que los productos elaborados posiblemente no necesitan conservantes químicos y aditivos como pectina (Scheldeman, X., 2002; Morales, A., 2004).

Otro uso potencial interesante es la obtención de papaína (Scheldenman *et al.*, 2003); esta proteinasa obtenida de látex extraído de la fruta verde, tiene un gran espectro de actividad y es usada en la industria farmacéutica, alimenticia, textil y otras (Drew *et. al.* 1998; Van Droogenbroeck 2004); especialmente el látex de *V. stipulata* y de algunas variedades de *V. x heilbornii* sin clasificar muestran una elevada actividad proteolítica (Scheldeman, 2003) que en el mismo estudio antes citado se indica que poseen cantidades mayores a *Carica papaya* que es la especie de donde se obtiene la papaína comercial, especialmente en África y Asia quienes son los mayores productores a nivel mundial; además en Chile se esta obteniendo y comercializando papaína de *V. cundinamarsensis* especialmente para la industria cárnica y cervecera (Hermosilla, 1985).

La presente investigación se enmarca en el proyecto “Manejo y Conservación de *Vasconcelleas* del Sur del Ecuador” que esta desarrollando la Unidad de Micropropagación Vegetal (UMV)-UTPL, cuyo objetivo principal es conservar este grupo fitogenético y promover estudios que generen información aplicada y practica encaminada hacia un uso sustentable de estos recursos naturales. Dentro de este proyecto se ha planteado diferentes líneas de investigación, una de ellas es la obtención de papaína.

Por las razones expuestas y siendo además una investigación que corresponde a la línea de Tecnología y Biotecnología que desarrolla el Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial (CETTIA), se ha planteado cuantificar el contenido de papaína de seis especies escogidas por su importancia de conservación y potencial productivo, estas son: *V. monoica*, *V. palandensis*, *V. stipulata*, *V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña*, *V. cundinamarcensis* y *V. x heilbornii nm. var. Gualel*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 ENZIMAS

2.1.1 Características Generales

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas y están formados por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.¹

La eficacia catalítica de los enzimas es muy alta por cuanto una molécula de enzima es capaz de transformar de 10.000 a 1'000.000 de moléculas de sustrato por minuto.²

En la actualidad se han identificado cerca de 2000 enzimas diferentes. Muchos de ellos se han aislado en forma pura y homogénea, alrededor de unos 200 se han podido cristalizar.

Se ha adoptado una clasificación sistemática de las enzimas recomendada por la Comisión Internacional de Enzimas, la misma que clasifica a las enzimas en seis clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada; así como: Oxido-reductasas, Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas y Ligasas. Cada enzima es designado por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual; por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación, que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca del enzima.

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otros necesitan además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ion metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima. El complejo enzima cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por si misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de apoenzima. Los enzimas que precisan de iones metálicos se llaman metaloenzimas. Cuando el coenzima se halla unido íntimamente a la molécula de la enzima recibe, normalmente, el nombre del grupo prostético.³

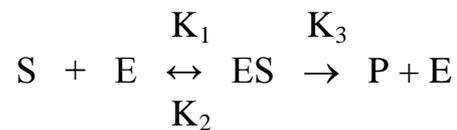
¹BRUCHMANN, Ernst-Erich. Bioquímica Técnica. Editorial Acribia Zaragoza (España)

²FENNEMA, Owen R. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Editorial Reverte, S. A.

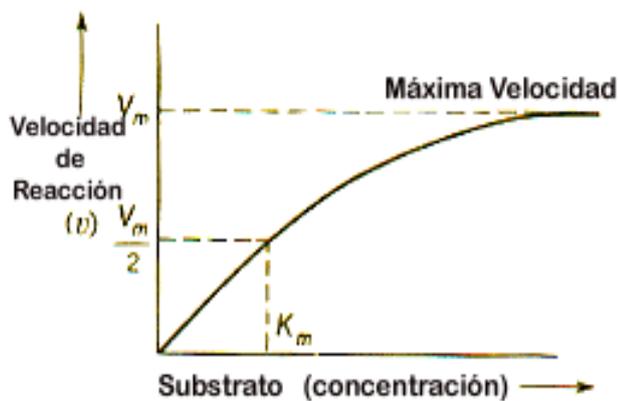
³LEHNINGER, Albert L. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, 1981.

2.1.2 Cinética de las reacciones enzimáticas

El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de la mayor parte de las reacciones químicas catalizadas por las enzimas. En este modelo una enzima (E) se combina con un sustrato (S) para formar un complejo (ES), que puede proseguir hasta originar un producto (P) o disociarse para obtener de nuevo E y S.



La velocidad viene dada por la siguiente ecuación:



$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Efecto de la concentración del sustrato

Donde:

V_{\max} , es la velocidad cuando la enzima está completamente saturado.

K_m , es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

$[S]$, es la concentración de sustrato a la que se satura la enzima.

K_1 y K_2 , son constantes de equilibrio de las reacciones químicas.

K_3 , es el denominado número de recambio, el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por un solo centro catalítico, cuando el enzima está completamente saturado con el sustrato.

2.1.3 Determinación cuantitativa de la actividad enzimática

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o en un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce, para este objetivo es necesario saber:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. Si el enzima precisa de la adición de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. Su dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores, es decir, el valor de K_m para el sustrato y para el cofactor.
4. Su pH óptimo.
5. Una zona de temperatura en el que sea estable y muestre actividad elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato a la aparición de los productos de la reacción.

La determinación cuantitativa de la actividad enzimática se efectúa de modo más rápido y conveniente cuando el sustrato o el producto son coloreados o absorben luz en la región del ultravioleta, ya que la velocidad de aparición o desaparición, de un producto o de un sustrato que absorbe la luz se puede seguir con un espectrofotómetro y permite efectuar un registro continuo del

curso de la reacción si se emplea un registrador provisto de una banda de papel móvil.

2.1.4 Unidades de actividad enzimática

La unidad de actividad enzimática empleada más corrientemente se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de 1.0 μmol (10^{-6} mol) de sustrato por minuto, en condiciones óptimas de pH y temperatura.

La actividad específica es el número de unidades del enzima por mg de proteína. Constituye una medida de la pureza del enzima, que aumenta durante el proceso de su purificación, y llega a ser máxima y constante cuando esta se halla en estado puro.

La actividad molecular o molar que antiguamente se llamaba número de recambio, es el número de moléculas de sustrato transformadas por minuto por una sola molécula de enzima (o por un solo centro activo).⁴

2.1.5 Principios de aislamiento y purificación de enzimas

Los principios básicos de aislamiento y purificación de enzimas que se deben tener en cuenta son: selección de la fuente apropiada, ya sea microbiana, animal o vegetal; detección de la proteína de interés; métodos de solubilización; estabilización del enzima en cada caso; métodos de aislamiento y purificación como : diferencias de solubilidad, cromatografía (adsorción, filtración en gel, intercambio iónico, afinidad) y por

centrifugación; conservación de la muestra; medida de concentración del enzima y criterios de pureza.⁵

2.2 LA PAPAÍNA

Es la única proteína vegetal que se usa en gran cantidad. El producto comercial es el látex seco y pulverizado de la papaya, fruto de la *Carica papaya*; pero que en la actualidad, también se puede obtener esta enzima del género *Vasconcellea*.

La papaína purificada y liofilizada es un polvo fino, blanquecino, amorfo, frágil, casi completamente soluble en el agua e insoluble en alcohol, está constituida por una sola cadena de 212 aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separados por un puente que tiene un centro activo SH.

El número de clasificación de papaína es: EC 3.4.22.2, en donde EC significa, abreviadamente, Comisión de Enzimas; la primera cifra (3) indica el nombre de la clase (hidrolasas), la segunda cifra (4) representa a la subclase (proteinasas), la tercera cifra (22) que esta compuesta por un grupo sulfidrilo (SH-proteinasas) y la cuarta cifra (2) designa a la papaína.

Para la extracción de látex, se procede a rayar los frutos verdes previamente limpios, las incisiones se las realiza introduciendo de 1-2mm en forma vertical y espaciada a intervalos de 2-3 cm hasta el extremo inferior facilitando el escurrimiento del látex. Las primeras incisiones proporcionan

mayor cantidad de látex, las siguientes rinden muy poco. La extracción se realiza en las primeras horas de la mañana y en las últimas de la tarde.

Una vez obtenido el látex y si este se encuentra en forma de gel, se procede a agitarlo para que retorne a su estado original (líquido thixotrópico), caso contrario se procede directamente a centrifugar con la finalidad de remover las impurezas naturales. Este líquido es luego filtrado a través de papel filtro y concentrado bajo vacío.

El líquido purificado es liofilizado, que consiste en la deshidratación de una sustancia por sublimación al vacío, consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria.⁶

La enzima papaína tiene una diversidad de aplicaciones dentro de la industria, entre las que podemos citar:

- ⌘ Industria cervecera: para evitar que la cerveza se enturbie al congelarla. Esta turbidez se debe a las proteínas que al enfriar coagulan formando coloides.
- ⌘ Industria de la carne: la actividad proteolítica de la enzima degrada las proteínas de alto peso molecular, provocando el ablandamiento de la carne. Este método de ablandamiento de las carnes son utilizadas en los frigoríficos luego del rigor mortis.
- ⌘ Industria del cuero: esta operación es un ataque controlado de la proteasa al colágeno para disminuir las protuberancias y dar un fino aspecto al cuero.

- ↵ Industria textil: se usa para desengomar la seda, por lo general con un tratamiento previo al baño desgomizante principal. También se utiliza en la industria de la lana para reducir el encogido al lavar y para mejorar la calidad de las tinturas usadas.
- ↵ Industria medicinal: en el tratamiento de la difteria, úlceras sifilíticas, eczemas, psoriasis, la cera que se forma en los oídos y herpes. También se han encontrado aplicaciones como analgésicos y antiinflamatorios en las dismenorreas femeninas y recientemente en artrosis y osteoporosis.
- ↵ Industria de jugos: es muy utilizada en el pre-tratamiento de las frutas destinadas a jugos y aceites esenciales, y en vinos como clarificante en situación similar a la industria cervecera.
- ↵ Industria dietética: se emplea en la producción de alimentos especiales para bebés.⁷

⁴ALBERT, LEHNINGER. Obra citada.

⁵José Avilez, M (1997). Enzimas. Obtenido en septiembre de 2004 en <http://www.monografías.com/trabajos12/enzim.shtml>.

⁶KIRK Raymond E. Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo VI, cristales-enzimas industriales. Primera Edición en español. México, 1962.

⁷Cooperlib. com. ar. Producción de papaína. Obtenida en noviembre de 2004 en <http://www.cooperlib.com.ar/producción-de-papaina-original.html>

2.3 TAXONOMIA GENERAL DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *VASCONCELLEA*

2.3.1 *Vasconcellea monoica*

La especie *V. monoica* se la encuentra en la provincia de Loja, cantón Olmedo, parroquia La Tingue; y en la parroquia Valladolid del cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe. La figura 2.1 muestra la especie en estado maduro, tomada por las autoras, durante la investigación de campo.



Figura 2.1 Especie *Vasconcellea monoica*

⁸SHELDEMAN, Xavier. Verspreiding en Potentieel van Cherimoya (*Annona Cherimola* Mill.) en Hooglandpapaja's (*Vasconcellea* Spp.) in Ecuador.

2.3.2 *Vasconcellea palandensis*

A esta especie se la encuentra en la provincia de Zamora Chinchipe, cantones: Zumba, parroquia San Andrés y Palanda recinto Agua Dulce. La figura 2.2 muestra la especie en estado verde y maduro, tomada por las autoras, durante la investigación de campo.



Figura 2.2 Especie *Vasconcellea palandensis*

⁹SCHELDEMAN, obra citada.

2.3.3 *Vasconcellea stipulata*

La especie *V. stipulata* se la encuentra en la provincia de Loja, cantones: Amaluza, parroquia Sta Terecita; Loja, parroquias Chuquiribamba, Vilcabamba recinto Yamburara alto y Gualel; Celica; Gonzanamá; Paltas, parroquia Lauro Guerrero; Macará, parroquia La Victoria y Saraguro, parroquia Manú. La figura 2.3 muestra la especie en estado verde, tomado por las autoras, durante la investigación de campo.



Figura 2.3 Especie *Vasconcellea stipulata*

¹⁰SCHELDEMAN, obra citada.

2.3.4 *Vasconcellea x heilbornii* nm. var. Guisaguiña

Esta especie se encuentra en la provincia de Loja, cantón Amaluza, parroquia Sta. Terecita. La figura 2.4 muestra la especie en estado verde y maduro, tomada por las autoras, durante la investigación de campo.

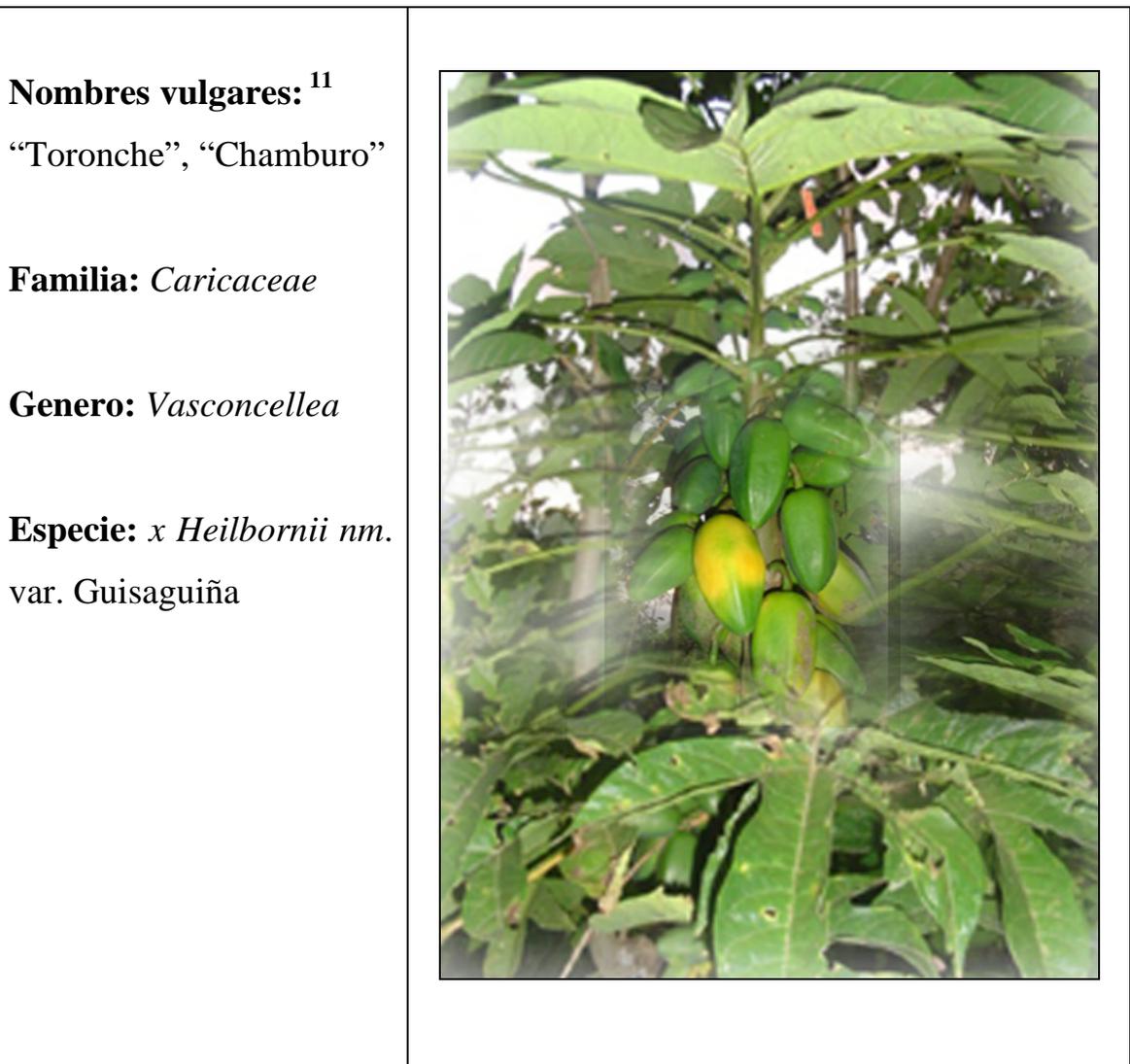


Figura 2.4 Especie *Vasconcellea x heilbornii* nm. var. Guisaguiña

¹¹SCHELDEMAN, obra citada.

2.3.5 *Vasconcellea cundinamarcensis*

La especie *V. cundinamarcensis* se la encuentra en la provincia de Loja, cantón Loja, parroquias San Lucas y Las Juntas sitio Capur. La figura 2.5 muestra la especie en estado verde, tomada por las autoras, durante la investigación de campo.



Figura 2.5 Especie *Vasconcellea cundinamarcensis*

¹²SCHELDEMAN, obra citada

2.3.6 *Vasconcellea x heilbornii* nm. var. Gualel

Esta especie se la encuentra en la provincia de Loja; cantón Loja, parroquias Chuquiribamba, Chantaco y Gualel recinto El Rodeo. La figura 2.6 muestra la especie en estado verde, tomada por las autoras durante la investigación de campo.

Nombres vulgares:¹³
“Toronche”, “Chamburo”

Familia: *Caricaceae*

Genero: *Vasconcellea*

Especie: *x Heilbornii* nm.
var. Gualel



Figura 2.6 Especie *Vasconcellea x heilbornii* nm. var. Gualel

¹³SCHELDEMAN, obra citada.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIA PRIMA

Se utiliza látex extraído de seis especies del género *Vasconcellea* ubicados en cinco lugares de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, tal como se muestra en la tabla 4.1 y figura 4.1. Además se usa látex extraído de *Carica papaya* var. *Tocaimera* recolectada en el Cantón El Pangui de la provincia de Zamora Chinchipe.

El látex se recolecta en las primeras horas de la mañana, realizando su extracción en la misma planta, con el fin de no dañar el fruto para su posterior uso y para obtener un buen rendimiento.

Con el fin de obtener el látex que tenga una mayor Actividad Enzimática, se selecciona la fruta verde, totalmente desarrollada, cuya edad esté entre 2.5-3 meses en el que presenta un color verde brillante.

3.2 ANÁLISIS DEL FRUTO

Se realiza los análisis organolépticos y físico-químicos a los frutos verdes y maduros de las seis especies del género *Vasconcellea*, los resultados se muestran en las tablas 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5.

3.3 TECNOLOGÍA APLICADA

3.3.1 Extracción y conservación de látex

Para extraer el látex se hace incisiones longitudinales de 3 mm de profundidad y espaciadas entre sí aproximadamente 3 cm; el látex que cae del fruto se lo recoge en cajas petri, a este contenido se lo deposita en tubos de centrifuga y se los congela para su conservación. La figura 3.1 muestra el rayado del fruto y la recolección de látex.



Figura 3.1 Extracción y recolección de látex
Fuente: Investigación de campo

3.3.2 Separación y conservación de la enzima

En el laboratorio se descongelan las muestras de látex, se lo agita para que vuelva a su estado inicial, se centrifuga a 13400 rpm por 30 minutos, se filtra recogiendo la parte líquida que es la enzima a la que se mide el pH y los °Brix, cuyos resultados se muestran en la tabla 4.8, y se agrega Bisulfito de Sodio al 1 % p/p como conservante. En la figura 3.2 se muestra los pasos a seguir para obtener la enzima purificada.

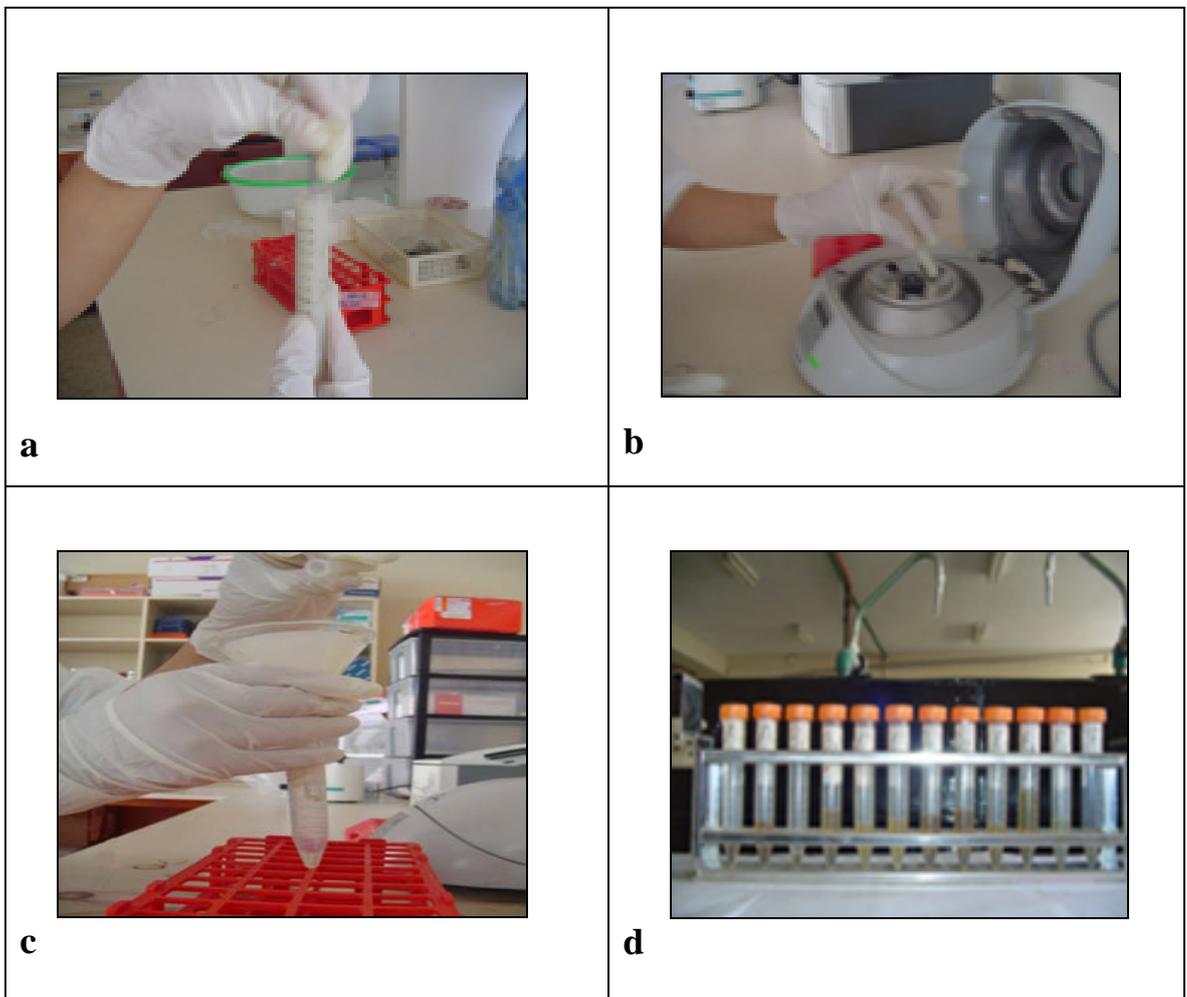


Figura 3.2 Separación de látex
a. Agitación manual; b. Centrifugación; c. Filtración; d. Enzima purificada.

3.3.3 Determinación de la Actividad Enzimática

Para medir la Actividad Enzimática de la enzima extraída de las seis especies del género *Vasconcellea* y del género *Carica papaya* var. *Tocaimera* se utiliza el método (9001-73-4) AOAC 54, descrito en el Anexo 1. La figura 3.3 muestra la introducción de la celda con la enzima en el Espectrofotómetro UV, para su respectiva lectura, con el fin de determinar la Actividad Enzimática.



Figura 3.3 Determinación de la Actividad Enzimática

3.3.4 Secado por liofilización

La enzima se seca utilizando un liofilizador LABCONCO serie 77608, catalogo 75015 - 90 - 89125, en las siguientes condiciones de trabajo: presión de 10 micrones de mercurio y temperatura a - 80 °C. La figura 3.4 muestra este proceso.

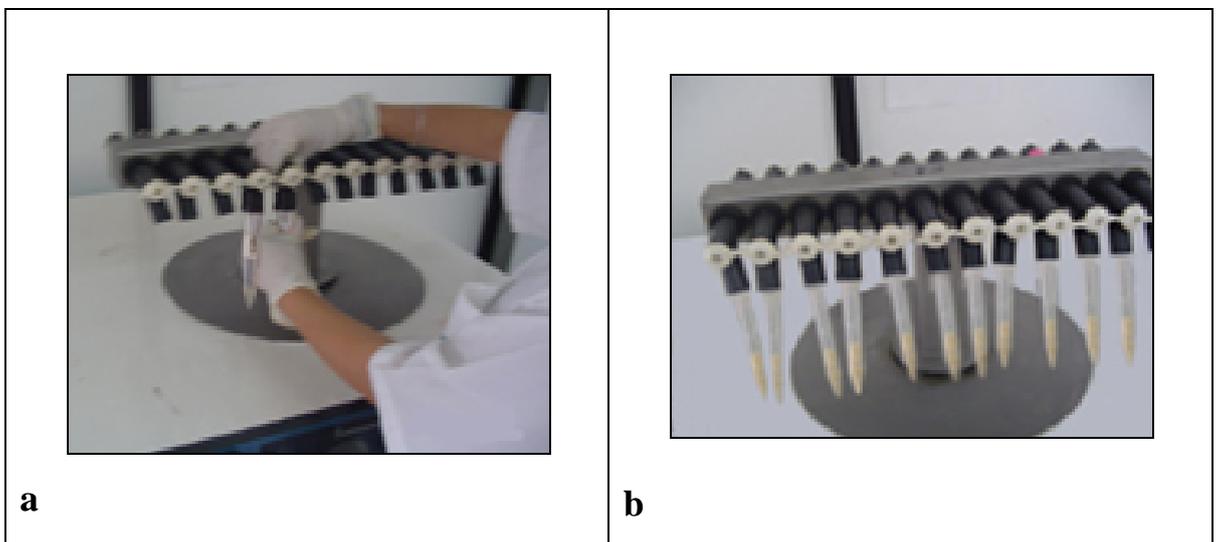


Figura 3.4 Secado por liofilización de la papaína
a. Colocación de la enzima en el liofilizador previamente congelada.
b. Obtención de la enzima seca.

3.3.5 Trituración

A la papaína liofilizada se la tritura manualmente, con el objeto de destruir los aglomerados utilizando un mortero de laboratorio, como se muestra en la figura 3.5.



Figura 3.5 Trituración de la papaína liofilizada

3.3.6 Envasado

La enzima es envasada manualmente en envases ámbar de 5g, como se indica en la figura 3.6.



Figura 3.6 Envasado de la enzima

3.3.7 Almacenamiento

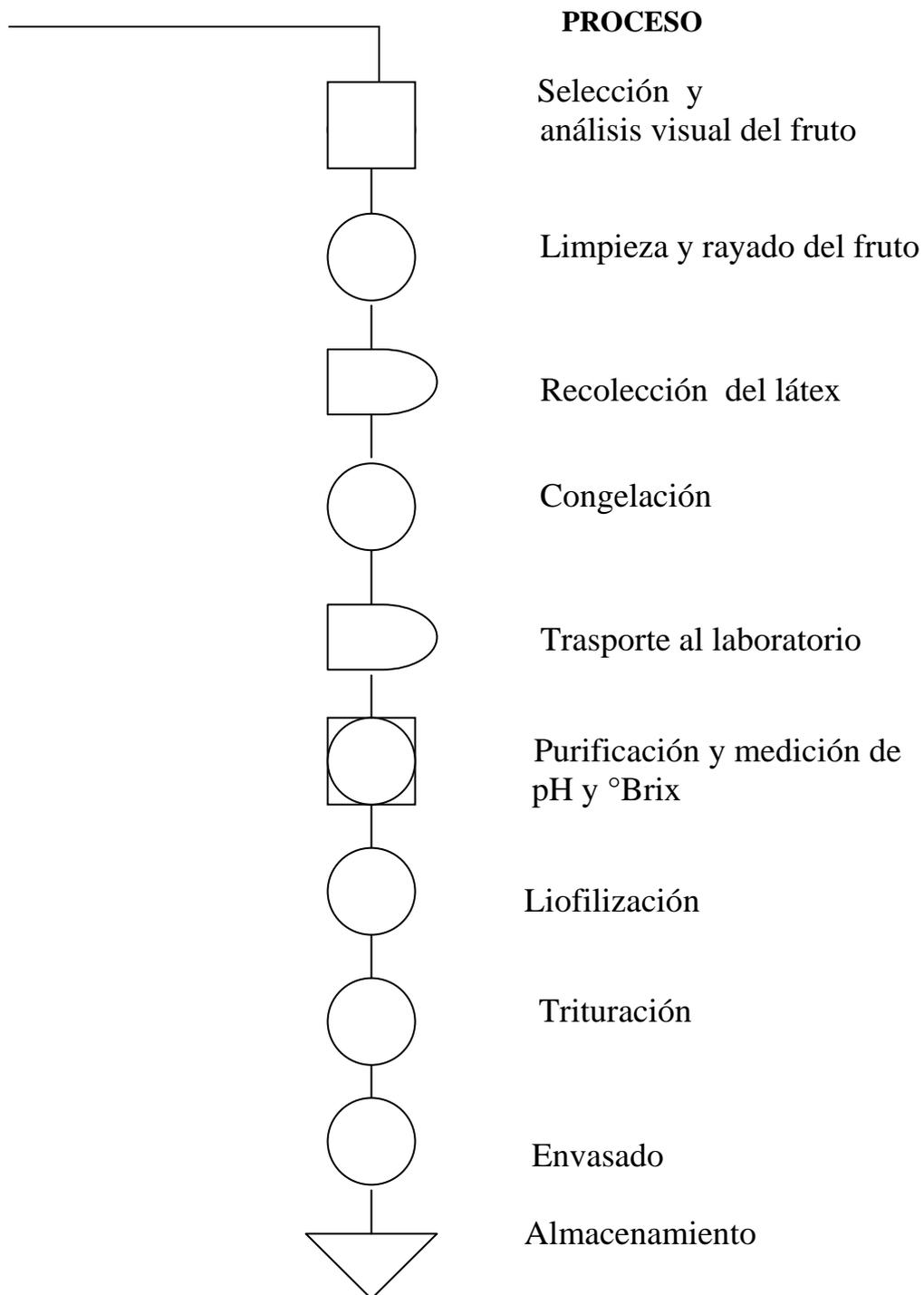
La enzima es debidamente etiquetada y se la mantiene en refrigeración hasta su uso.



Figura 3.7 Presentación de la enzima

3.4 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE PAPAÍNA LIOFILIZADA A NIVEL DE LABORATORIO

El proceso se resume en el siguiente diagrama de flujo:



4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 UBICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL G. VASCONCELLEA

En el proyecto “Manejo y Conservación de *Vasconcelleas* del Sur del Ecuador” ejecutado por la Unidad de Micropropagación Vegetal (UMV)-UTPL se identificaron 6 especies potenciales para la obtención de papaína. Las cuales están ubicadas en los sitios que se muestran en la tabla 4.1 y en la figura 4.1, lugares que se visito en época de fructificación para la extracción de látex.

Tabla 4.1 Ubicación de las especies del G. *Vasconcellea*

NOMENCLATURA	ESPECIE	LUGAR
A	<i>V. monoica</i>	Valladolid
B	<i>V. palandensis</i>	Zumba (San Andres)
C	<i>V. stipulata</i>	Amaluza (Santa Terecita)
D	<i>V. x heilbornii nm.var.</i> Guisaguiña.	Amaluza (Santa Terecita)
E	<i>V. Cundinamarcensis</i>	San Lucas
F	<i>V. x heilbornii nm. var.</i> Gualel	Gualel (Bahín y Rodeo)

Fuente: Proyecto “Manejo y Conservación de *Vasconcelleas* del Sur del Ecuador”
UMV-UTPL

Elaboración: Las Autoras

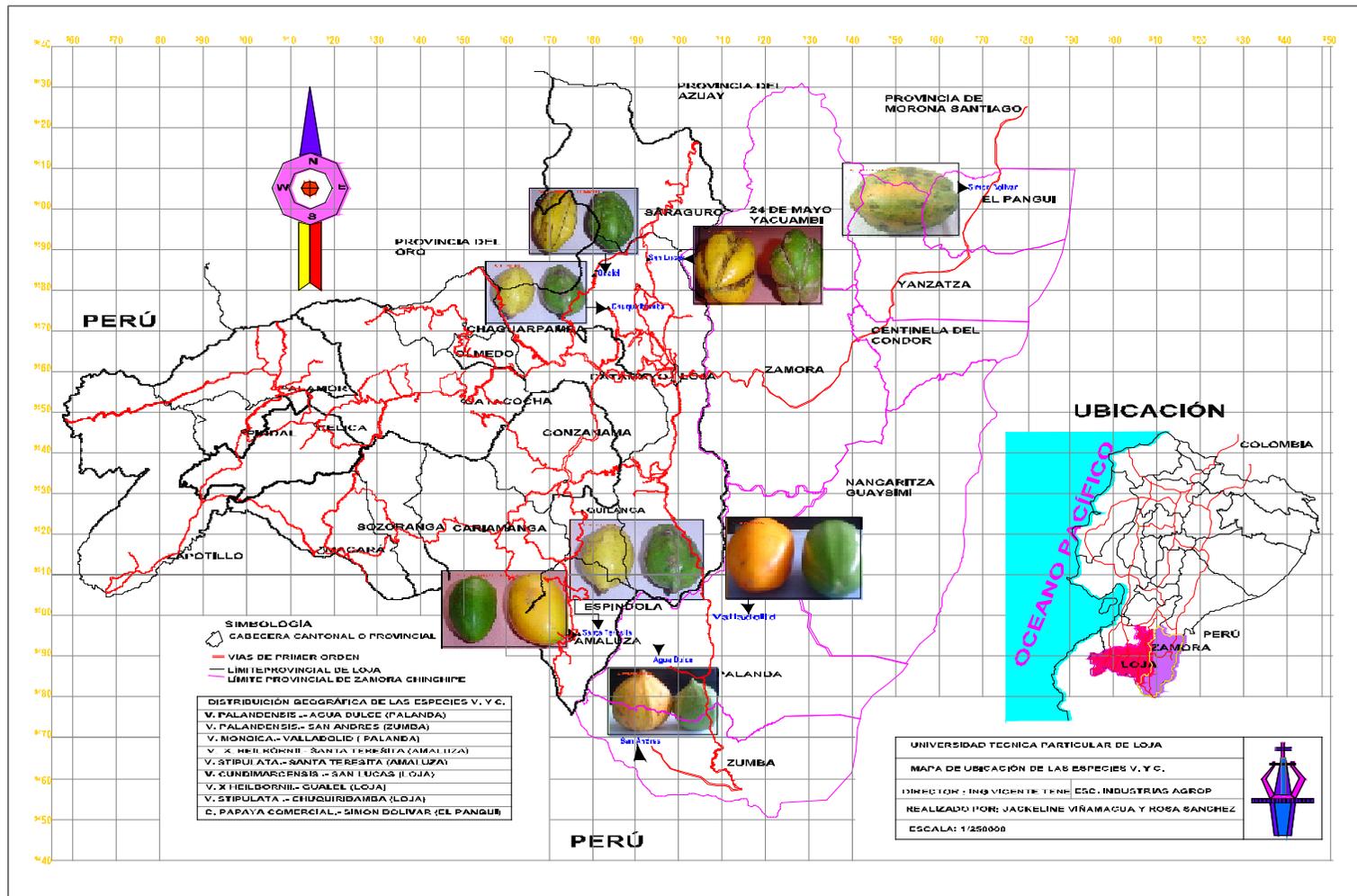


Figura 4.1 Mapa de Ubicación de las seis especies del género *Vasconcellea*

Fuente: Proyecto “Manejo y Conservación de *Vasconcelleas* del Sur del Ecuador” UMV-UTPL

Elaboración: Las Autoras

4.2 ANÁLISIS DEL FRUTO

Los resultados de los análisis organolépticos de los frutos verdes y maduros se muestran en las tablas 4.2 y 4.3.

Tabla 4.2 Análisis Organolépticos de los frutos verdes

ESPECIE	OLOR	SABOR	TEXTURA
<i>V. monoica</i>	Sin olor	Sin sabor	Dura
<i>V. palandensis</i>	Sin olor	Amarga	Dura
<i>V. stipulata</i>	Aromática	Ácida	Blanda
<i>V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña</i>	Sin olor	Ácida	Blanda
<i>V. cundinamarcensis</i>	Sin olor	Amarga	Semidura
<i>V. x heilbornii nm. var. Gualel</i>	Sin olor	Amarga	Semidura

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Como se observa en esta tabla, la *V. stipulata* tiene aroma, sabor ácido y textura blanda; así como la *V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña*, presenta un sabor ácido y textura blanda, pero no tiene aroma.

Tabla 4.3 Análisis Organolépticos de los frutos maduros

ESPECIE	OLOR	SABOR	TEXTURA
<i>V. monoica</i>	Sin olor	Sin sabor	Dura
<i>V. palandensis</i>	Sin olor	Dulce	Semidura
<i>V. stipulata</i>	Aromática	Agridulce	Blanda
<i>V. x heilbornii nm. var. Guisaguña</i>	Sin olor	Agridulce	Blanda
<i>V. cundinamarcensis</i>	Aromática	Agridulce	Blanda
<i>V. x heilbornii nm. var. Gualel</i>	Aromática	Agridulce	Blanda

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Los resultados demuestran que las especies: *V. stipulata*, *V. x heilbornii nm. var. Gualel* y *V. cundinamarcensis*, tienen aroma, sabor agradable y textura blanda, la *V. x heilbornii nm. var. Guisaguña* tiene sabor y textura blanda pero no tiene aroma, lo que las hace aptas para la industrialización de mermeladas, néctares, fruta confitada y jaleas. En cuanto a la *V. monoica* y *V. palandensis*, por sus características observadas, sirven para realizar productos en almíbar.

Los resultados de los análisis físico-químicos, de los frutos verdes y maduros de las seis especies, se muestran en las tablas 4.4 y 4.5

Tabla 4.4 Análisis Físico-químico de los frutos verdes

ESPECIE	TAMAÑO (cm.)	ACIDEZ	pH	BRIX	HUMEDAD (%)	INDICE DE MADUREZ
<i>V. monoica</i>	10,5*5,5	0,22	4,8	4,4	94	20,0
<i>V. palandensis</i>	8,5*8,5	0,20	5,1	4,3	92	21,5
<i>V. stipulata</i>	10,0*5,0	0,44	4,2	8,0	91	18,2
<i>V. x heilbornii nm. var.</i> Guisaguña	11,0*6,3	0,26	4,8	4,8	94	18,5
<i>V. cundinamarcensis</i>	9,5*6,0	0,21	5,0	4,4	93	20,9
<i>V. x heilbornii nm. var.</i> Gualel.	13,0*5,0	0,23	4,9	5,0	93	21,7

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Los frutos que tienen mayor tamaño son: *V. x heilbornii* nm. var. Gualel y *V. x heilbornii* nm. var. Guisaguiña, la *V. stipulata* tiene mayor acidez y °Brix y la *V. monoica* y *V. palandensis* tienen un mayor pH y el índice de madurez varía de 18-22. entre especies.

Tabla 4.5 Análisis Físico-químico de los frutos maduros

ESPECIE	TAMAÑO (cm.)	ACIDEZ	pH	BRIX	HUMEDAD (%)	INDICE DE MADUREZ
<i>V. monoica</i>	10,5*5,5	0,15	5,7	5,2	95	34,6
<i>V. palandensis</i>	8,5*8,5	0,16	5,5	5,6	93	35,0
<i>V. stipulata</i>	10,0*4,5	0,42	4,4	9,6	91	22,8
<i>V. x heilbornii nm. var.</i> Guisaguiña	11,3*6,4	0,23	4,9	5,6	95	24,3
<i>V. cundinamarcensis</i>	9,5*6,0	0,18	5,3	4,8	93	26,7
<i>V. x heilbornii nm. var.</i> Gualel	13,0*5,0	0,19	5,1	5,5	93	28,9

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

En comparación con los frutos verdes, los frutos maduros conservan el mismo tamaño; disminuye su acidez y sube los °Brix, por lo tanto el índice de madurez es mayor.

Estos análisis se los realiza como parte adicional a la investigación, para que estos resultados sirvan de apoyo para posteriores investigaciones.

4.3 EXTRACCIÓN Y CONSERVACION DE LÁTEX

Para determinar el rendimiento en látex entre los frutos de las diferentes especies de *Vasconcellea*, se procede a cuantificar el látex obtenido de un peso de 2380 g de fruto. El rendimiento es la relación entre el peso de látex y el peso del fruto, los resultados se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Rendimiento en látex de las especies del Género *Vasconcellea*

ESPECIE	PESO DE LÁTEX (g)		RENDIMIENTO (%)		TOTAL	Ř (%)
	P ₁	P ₂	R ₁	R ₂		
<i>V. monoica</i>	29,57	21,90	1,24	0,92	2,16	1,08
<i>V. palandensis</i>	34,33	32,40	1,44	1,36	2,80	1,40
<i>V. stipulata</i>	33,13	32,63	1,39	1,37	2,76	1,38
<i>V. x heilbornii</i> nm. var. Guisaguiña	14,53	16,03	0,61	0,67	1,28	0,64
<i>V. cundinamarcensis</i>	26,10	20,70	1,10	0,87	1,97	0,99
<i>V. x heilbornii</i> nm. var. Gualel	20,72	22,63	0,87	0,95	1,82	0,91
Total			6,65	6,14	12,79	6,40

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Las especies que tienen mayor rendimiento en látex son: *V. palandensis* y la *V. stipulata* y la de menor valor es la *V. x heilbornii* nm. var. de Guisaguña.

Para determinar si hay diferencia significativa de rendimiento en látex se realiza un análisis de varianza a los resultados de la tabla anterior.

Tabla 4.7 Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio σ^2	Fc Razón de varianza	Ft_{0.05} Valores tabulados
Especie	0,84544167	5	0,16908833	11,7900059	4,39
Error	0,08605	6	0,01434167		

Fuente: Tabla 4.6

Elaboración: Las Autoras

Fc > Ft

Para las especies el $F_c > F_t$, por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 y se concluye que tienen diferentes rendimientos en látex entre especies.

Para establecer estas diferencias entre especies se aplicó la prueba de significancia de Duncan.

PRUEBA DE DUNCAN

Sx 0.0847
GLE 6
 α 0.05
Amplitud 5

En la tabla 4.8 se muestran los °Brix y pH de la enzima extraída de las seis especies, obtenidos en el laboratorio.

Tabla 4.8 Análisis físico-químicos de la enzima de las especies estudiadas

ESPECIE	pH	°Brix
<i>V. monoica</i>	5,26	17,80
<i>V. palandensis</i>	5,09	22,40
<i>V. stipulata</i>	5,21	27,90
<i>V. x heilbornii nm. var. Guisaguña</i>	5,55	18,00
<i>V. cundinamarcensis</i>	5,33	24,40
<i>V. x heilbornii nm. var. Gualel</i>	5,30	19,40

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Todas las especies presentan un pH óptimo de Actividad Enzimática y la que tiene mayor °Brix es la *V. stipulata*.

El rendimiento en enzima es la relación entre el peso de la enzima y el peso de látex. Sus resultados se detallan en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Rendimiento en enzima de las especies estudiadas

ESPECIE	PESO DE LA ENZIMA (g)		RENDIMIENTO (%)		TOTAL	Ř (%)
	P ₁	P ₂	R ₁	R ₂		
<i>V. monoica</i>	5,18	3,54	17,52	16,16	33,68	16,84
<i>V. palandensis</i>	8,64	7,74	25,17	23,89	49,06	24,53
<i>V. stipulata</i>	8,33	8,2	25,14	25,3	50,44	25,22
<i>V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña</i>	4,00	5,01	27,53	31,25	58,78	29,39
<i>V. cundinamarcensis</i>	6,42	6,46	24,6	31,21	55,81	27,91
<i>V. x heilbornii nm. var. Gualel</i>	7,21	7,56	34,8	33,41	68,21	34,11
Total			154,76	161,22	315,98	157,99

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Las especies que tienen mayor rendimiento en enzima son: *V. x heilbornii* nm. var. Gualel y la *V. x heilbornii* nm. var. Guisaguña, pero la especie que tiene un bajo rendimiento es la *V. monoica*.

Para comprobar si hay diferencia significativa de rendimiento en enzima se realiza un análisis de varianza a los resultados de la tabla anterior.

Tabla 4.10 Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio σ^2	Fc Razón de varianza	Ft_{0.05} Valores tabulados
Especie	334,044075	5	66,808815	12,7354546	4,39
Error	31,47535	6	5,24589167		

Fuente: Tabla 4.9

Elaboración: Las Autoras

Fc > Ft

Para las especies el $F_c > F_t$, por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 y se concluye que cada especie tiene diferente rendimiento en enzima.

Para establecer estas diferencias entre especies se aplicó la prueba de significancia de Duncan.

PRUEBA DE DUNCAN

Sx 1.619
GLE 6
 α 0.05
Amplitud 5

AES	3.46	3.58	3.61	3.68	3.68
RAD	5.602	5.796	5.844	5.958	5.958

	A	B	C	E	D	F	RAD
	16,84	24,53	25,22	27,91	29,39	34,11	
A 16,84		7,69*	8,38*	11,07*	12,55*	17,27*	5,958
B 24,53			0,69	3,38	4,86	9,58*	5,958
C 25,22				2,69	4,17	8,89*	5,844
E 27,91					1,48	6,2*	5,796
D 29,39						4,72	5,602
F 34,11							

Al comparar la diferencia entre las medias con los rangos de amplitud de Duncan (RAD) se obtiene:

A	B	C	E	D	F	
						a
						b

Esta prueba demuestra que no hay deferencia significativa entre las especies:

V. x heilbornii nm. var. Gualel y *V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña*

V. x heilbornii nm. var. Guisaguiña, *V. cundinamarcensis*, *V. stipulata* y *V. palandensis*.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar la concentración de la enzima, se elabora primero una curva de absorbancia vs concentración, utilizando un estándar de papaína de 30 000 USP/mg y el método Espectrofotométrico (9001-73-4) AOAC 54. Esta curva se muestra en el anexo 2.

La absorbancia de cada muestra se lee en el espectrofotómetro UV y la concentración se obtiene utilizando la curva de calibración del estándar de papaína. Los resultados de la concentración en enzima se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4. 11 Concentración de la enzima en mg/ml de las especies estudiadas

ESPECIE	PESO (mg)		ABSORBANCIA		CONCENTRACIÓN (mg/ml)	
	P ₁	P ₂	A ₁	A ₂	C ₁	C ₂
<i>V. monoica</i>	504,20	504,00	1,200	1,189	0,0058	0,0058
<i>V. palandensis</i>	330,77	330,68	0,950	0,866	0,0048	0,0045
<i>V. stipulata</i>	198,63	198,60	1,050	1,039	0,0052	0,0052
<i>V. x heilbornii nm. var. Guisaguña</i>	432,96	432,97	0,988	1,000	0,0050	0,0050
<i>V. cundinamarcensis</i>	387,64	387,69	1,330	1,354	0,0063	0,0064
<i>V. x heilbornii nm. var. Gualel</i>	531,09	531,10	1,690	1,753	0,0078	0,0081

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

Para determinar la Actividad Enzimática de estas especies se toman en cuenta los datos de la tabla anterior y utilizando la formula:

$USP/mg = C \times (100/W) \times (100/4) \times (50/7.5) \times U$ del método AOAC descrito en el Anexo 1.

Los resultados se muestran en la tabla 4.12.

Tabla 4.12 Actividad Enzimática de la enzima de las especies estudiadas

ESPECIE	ACTIVIDAD ENZIMATICA (USP/mg)		TOTAL	ā
	a ₁	a ₂		
<i>V. monoica</i>	5754,56	5756,85	11511,41	5755,70
<i>V. palandensis</i>	7259,43	6807,57	14067,00	7033,50
<i>V. stipulata</i>	13096,21	13098,19	26194,40	13097,20
<i>V. x heilbornii nm.</i> var. Guisaguiña	5777,09	5776,96	11554,05	5777,03
<i>V. cundinamarcensis</i>	8130,16	8258,14	16388,30	8194,15
<i>V. x heilbornii nm.</i> var Gualel	7347,06	7629,50	14976,55	7488,28
TOTAL	47364,51	47327,20	94691,71	47345,85

Fuente: Tabla 4.11

Elaboración: Las Autoras

Se observa una mayor Actividad Enzimática en la especie *V. stipulata*, determinando ser la mejor.

Para comprobar si hay diferencia significativa de la Actividad Enzimática de las especies se realiza un análisis de varianza a los resultados de la tabla anterior.

Tabla 4.13 Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio σ^2	Fc Razón de varianza	Ft_{0.05} Valores tabulados
Especie	74244542,46	5	14848908,5	593,3053362	4,39
Error	150164,5873	6	25027,4312		

Fuente: Tabla 4.12

Elaboración: Las Autoras

Fc>Ft

Para las especies el $F_c > F_t$, por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 y se concluye que las especie son heterogéneas en Actividad Enzimática.

Para establecer estas diferencias entre especies se aplicó la prueba de significancia de Duncan.

PRUEBA DE DUNCAN

Sx	111.86
GLE	6
α	0.05
Amplitud	5

AES	3.46	3.58	3.61	3.68	3.68
RAD	387.03	400.46	403.81	411.64	411.64

	A 5755,7	D 5777,03	B 7033,5	F 7488,28	E 8194,15	C 13097,2	RAD
A 5755,7		21,33	1277,8*	1732,58*	2438,45*	7341,5*	411,64
D 5777,03			1256,47*	1711,21*	2417,12*	7320,17*	411,64
B 7033,5				454,78*	1160,65*	6063,7*	403,81
F 7488,28					705,87*	5608,92*	400,46
E 8194,15						4903,05*	387,03
C 13097,2							

Al comparar la diferencia entre las medias con los rangos de amplitud de Duncan (RAD) se obtiene:

A D B F E C
 _____ a

Esta prueba demuestra que no hay diferencia significativa entre las especies: *V. monoica* y la *V. x heilbornii* nm. var. Guisaguña.

4.6 SECADO POR LIOFILIZACIÓN

El secado por liofilizado da como resultado una humedad del 3 % que es óptima para su conservación. El rendimiento de papaína liofilizada de los dos géneros: *Vasconcellea stipulata* y *Carica papaya* var. Tocaimera se muestran en la tabla 4.14.

Tabla 4.14 Rendimiento en Papaína Liofilizada de *V. stipulata* y *C. papaya* var. Tocaimera

GENERO	PESO DE PAPAÍNA (g)	PESO DE PAPAÍNA LIOFILIZADA (g)	RENDIMIENTO (%)
<i>V. stipulata</i>	38,623	6,484	17
<i>C. papaya</i> var. Tocaimera	44,341	4,474	10

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Atoras

Para obtener estos resultados se parte de los siguientes datos:

Peso de fruto de *V stipulata*: 12331g y peso de látex: 171,65g

Peso de fruto de *C. papaya* var. Tocaimera: 52832 g y peso de látex 102,87g

En esta tabla se observa que la *V. stipulata* tiene un mayor rendimiento en papaína liofilizada que la *C. papaya* var. Tocaimera.

Los datos de la comparación de la Actividad Enzimática de los dos géneros se describen en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Actividad Enzimática de papaína liofilizada de *Vasconcellea stipulata* y *Carica papaya* var.

Tocaimera

GENERO	PESO DE PAPAINA LIO. (mg)		ABS.		C. (mg/ml)		ACTIVIDAD ENZIMATICA USP/mg		TOTAL	ā
	P1	P2	A1	A2	C1	C2	a ₁	a ₂		
<i>V. stipulata</i>	40,10	39,90	0,974	0,974	0,0049	0,0049	61127,80	61434,21	122562,01	61281,005
<i>C. papaya</i> var. Tocaimera	68,30	68,00	0,897	0,894	0,0046	0,0046	33691,80	33840,44	67532,24	33766,12
Total							94819,6	95274,65	190094,25	950047,125

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaboración: Las Autoras

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que la Actividad Enzimática de papaína liofilizada de la especie *V. stipulata* tiene el doble de Actividad Enzimática que la papaína liofilizada de *C. Papaya* var. Tocaimera.

Para comprobar si hay diferencia significativa de la Actividad Enzimática de papaína liofilizada de la especie *V. stipulata* y *C. papaya* var. Tocaimera se realiza un análisis de varianza a los resultados de la tabla anterior.

Tabla 4.16 Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio σ^2	Fc Razón de varianza	Ft_{0.05} Valores tabulados
Géneros	757068899,5	1	757068899,5	26111,45	18,51
Error	57987,5	2	28993,75		

Fuente: Tabla 4.15

Elaboración: Las Autoras

Fc>Ft

Para los géneros el $F_c > F_t$, por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 y se deduce que el género *V. stipulata* tiene diferente Actividad Enzimática en papaína liofilizada que la *C. papaya* var. Tocaimera.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- De las especies estudiadas en fruto verde y maduro, la *V. stipulata* fue aromática y presentó una textura blanda, lo que demuestra que esta fruta cumple con las características adecuadas para ser industrializada.
- El látex que se extrajo de los frutos verdes del género *Vasconcellea*, presentó un color blanco-crema y de acuerdo al diseño utilizado, los mejores rendimientos en látex de las seis especies fueron la *V. palandensis* y la *V. stipulata*.
- Se observó que para obtener un buen rendimiento en látex, es importante que el terreno tenga buenas condiciones de riego y suelo.
- La especie del género *Vasconcellea* que tuvo un mayor porcentaje de papaína o látex purificado fue la *V. x heilbornii* nm. var. *Gualel*, lo que significa que el rendimiento en papaína purificada no depende del rendimiento en látex.
- El color de látex purificado o papaína de las especies estudiadas fue de color amarillento cristalino y su pH osciló entre 5-5.5, óptimo para su Actividad Enzimática.

- La papaína purificada de la especie del género *Vasconcellea* que presentó la mayor Actividad Enzimática fue la *V. stipulata*.
- La Actividad Enzimática es característica de cada especie es decir que no depende del lugar de recolección de látex.
- La Actividad Enzimática de papaína liofilizada de *V. stipulata* fue cuatro veces mayor a la Actividad Enzimática de papaína purificada de la misma especie.
- La papaína liofilizada de *C. papaya* var. *Tocaimera* dio un menor rendimiento con respecto a la papaína liofilizada de *V. stipulata*.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que la Actividad Enzimática de papaína liofilizada de *V. stipulata* es mayor a la Actividad Enzimática de papaína liofilizadas de *C. papaya* var. *Tocaimera*.

5.2 RECOMENDACIONES

- De acuerdo a la revisión bibliográfica se recomienda extraer el látex en las primeras horas de la mañana o en las últimas de la tarde debido a que hay un mayor rendimiento en látex.
- Al látex purificado o papaína es necesario adicionar un conservante, para que preserve su Actividad Enzimática.
- Para el proceso de la Actividad Enzimática, los análisis se deben realizar con una buena precisión, en pesos de muestra, reactivos y diluciones, para que el resultado no sea muy variable.
- Se debe despertar interés a los agricultores, para el cultivo de estas especies, ya que se adaptan a cualquier tipo de suelo, especialmente la *V. stipulata*.
- Que este estudio sirva de base para que se desarrollen nuevos temas de investigación con el fin de potenciar su cultivo y uso industrial.
- Que las autoridades de la Universidad Técnica Particular de Loja pongan especial interés en la producción y comercialización de *papaína*, ya que por ser rica en Actividad Enzimática tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional.

- Se debe hacer un estudio minucioso a la especie *V. palandensis* en estado verde por sus características físicas al licuar, en el que presentó una mezcla gelatinosa.

BIBLIOGRAFIA

1. BRUCHMANN, Ernst-Erich. Bioquímica Técnica. Editorial Acribia Zaragoza (España), 1980.34-44p.
2. BRAVERMAN, J. B. S. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Primera Edición española, Ediciones Omega S.A. Barcelona, 1967.169-189p.
3. FESSENDEN, Ralph J. Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamericano, 1982. 885-889, 924-931p.
4. LEHNINGER, Albert L. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, 1981. 189-222p.
5. FISCHER, Robert B. Análisis Química Cuantitativo. Tercera Edición, 1968 Philadelphia. 588-590p.
6. FENNEMA, Owen R. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Editorial Reverte, S. A., 1982. 334-336, 342-352p.
7. FIESER, Louis F. Experimentos de Química Orgánica. Editorial Reverté, S. A., 1967. 381p.
8. FRENCH, Chester D. La Papaya. Primera Edición, Octubre de 1981. 16-20, 71-73p.

9. COPELAND, Robert A. Enzymes a practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Second Edition. 223-263p.
10. YUFERA, Eduardo. Química de los Alimentos. Editorial Síntesis, S. A., 1998. 442-446p.
11. GARCÍA, Mariano. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa, S. A., 1998. México. 104-105p.
12. BADUI, Salvador. Química de los Alimentos. Primera Edición, 1981. México. 320-324p.
13. KIRK, Raymond E. Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo VI, cristales- enzimas industriales. Primera Edición en español. México, 1962. 1002-1003, 1008-1009p.
14. SCHELDEMAN, Xavier. Verspreiding en Potentieel van Cherimoya (Annona Cherimola Mill.) en Hooglandpapaja's (Vasconcellea Spp.) in Ecuador. Academiejaar 2001-2002. Faculteit Landbouwkundige Wetenschappen. 42-61p.
15. CHECHETKIN, A. V. Prácticas de Bioquímica del ganado y aves de corral. Editorial Mir Moscú. Impreso en la URSS, 1984.209-222p.

16. ROMERO, José. Potencial de Vasconcelleas Silvestres “Toronches” en el sur del Ecuador. Colección, Caracterización y Transformación. ONG Naturaleza y Cultura Internacional. Loja, Ecuador, 2004.

17. BADILLO, V. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Maracay - Venezuela, 1993.

18. WILLIAN, H. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 2000, 17 th edition. Volume II. CH 47, pp. 38-40.

19. PROMSA. Proyecto IG-CT-067. (2003) “Conservación Ex Situ y obtención de parámetros para el manejo Agrotécnico Y Micropropagación de los géneros *Carica* y *Rubus* en la región Sur del Ecuador”. FCSF. UTPL. Loja, Ecuador.

20. Van Droogenbroeck B, Kyndt T, Maertens I, Romeinn-Peeters E, Scheldeman X, Romero-Motoche J, Van Damme P, Goetghebeur P, Gheyse G. 2004 “Phylogenetic análisis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP” Theor Appl Genet 108: 1473-1486.

José Avilez, M (1997). Enzimas. Obtenido en septiembre de 2004 en <http://www.monografías.com/trabajos12/enzim.shtml>.

J. M. Macarulla, F. M. Goñi (2001). Enzimas. Obtenido en septiembre de 2004 en

<http://www.ehu.es/biomoléculas/ENZ/ENZ.html>

Holding Atichile LTA. (1999). Bioplanet-industria. Obtenido en octubre de 2004 en

<http://www.bioplanet.net/magazine/bio-novdic-1999/industria.html>.

Vicente Martínez C. (1999). Propiedades medicinales de las papayas. Obtenido en octubre de 2004 en

<http://www.botanical-online.com/papayas propiedades medicinales.html>.

Rubén Hernández (2001). Enzimas. Obtenido en octubre de 2004 en

<http://www.Forest.ula.ve/rubenhg/enzimas.html>.

Corporación Proexant (1997). Producción de exportaciones agrícolas no tradicionales. Obtenido en octubre de 2004 en

<http://www.proexant.org.ec/manual%20de%20papaya.html>.

Cooperlib. com. ar. Producción de papaina. Obtenida en noviembre de 2004 en

<http://www.cooperlib.com.ar/producción-de-papaína-original.html>

Cirad-Flhor (2000). Project for neotropical fruits, Vasconcellea species.

Obtenida n noviembre de 2004 en

<http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits-from-americas/frutales/9especies%20vasconcellea.html>.

Silver Plotteer (2000). Biológico Abstracts. Obtenida noviembre de 2004

<http://www.silverplotteer.com.html>.

ANEXO 1

Método Espectrofotométrico

(9001-73-4) AOAC 54

a. Reactivos

1. Solución fosfato de Na 0.05M.- Se disuelve 7.1g de fosfato de Na en suficiente agua hasta completar 1lt., añada unas gotas de tolueno.
2. Solución de ácido cítrico 0.05M.- Disuelva 10.5g de ácido cítrico monohidrato en suficiente agua para completar 1lt., añada unas gotas de tolueno.
3. Substrato de caseína.- Disperse 5g de caseína de tipo hamensten en 250ml de fosfato de Na 0.05M, coloque en un baño de agua caliente, durante 30 minutos con agitación ocasional, enfríe a temperatura ambiente y añada ácido cítrico 0.05M hasta un pH de 6.0 ± 0.1 . Agite la solución rápidamente y continúe durante la adición de ácido cítrico para prevenir la precipitación de caseína. Diluya a 500ml con agua. Se prepara diariamente.
4. Solución buffer de fosfato cisteina disodio etilen dinitrotetraacético (EDTA).- Disolver 3.55g de fosfato de sodio en 400ml de agua en un frasco volumétrico de 500ml. Adicionar 7.0g de disodio etilen dinitrotetraacético $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ y 3.05g de cisteina $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Ajuste el pH a 6.0 ± 0.1 con HCl

1N o NaOH 1N, diluya a volumen con H₂O hasta 500ml. Preparar diariamente.

5. Solución ácido tricloroacético (TCA) 30%.- Disuelva 60g de ácido tricloroacético en agua y diluya a 200ml con agua.

6. Solución estándar de papaína.- Pese exactamente 100mg de papaína, USP estándar, en un frasco volumétrico de 100ml y añada la solución buffer (4). Diluya adicionalmente 4ml de esta solución a 100ml con solución buffer, debe usarse dentro de los 30 minutos de prepararse.

b. Preparación de la muestra

- Exactamente pese la cantidad de muestra que contenga una actividad equivalente a 100mg de referencia estándar y proceda exactamente como la preparación de solución estándar de papaína.

c. Determinación

- Dentro de los 12 frascos volumétricos de 100ml. Pipetee 25ml de sustrato de caseína. Etiquetar los frascos por duplicado (los análisis se hacen por duplicado, excepto el blanco). S1, S2 y S3 para la solución estándar de papaína y U2 para la solución de la muestra.

- Etiquete los 4 frascos restantes (blancos) con S1b, S2b, S3b y U2b. Añada 5, 2.5 y 0ml de solución buffer respectivamente a los frascos S1, S2 y S3 y,

también a los respectivos blancos S1b, S2b y S3b. Para U2 y U2b añada 2.5ml de solución buffer. Coloque todos los frascos en un baño de agua a 40°C y deje unos 10 minutos, hasta que alcance la temperatura del baño.

- En cada uno de los frascos duplicado S1, pipetee 5ml de la solución estándar de papaína, tomando como 0 el tiempo en cuanto se deja caer el contenido de la pipeta, moviendo simultáneamente el frasco para mezclar.

- Tape y coloque en el baño. Los 2 frascos etiquetados con S2, pipetee 7.5ml de solución estándar de papaína. Repetir por 2 frascos con 10ml de solución estándar de papaína y a los 2 frascos U2 a los cuales se les añade 7.5ml de la solución muestra.

- Luego de exactamente 60 minutos, añada 15ml de TCA al 30% a los 12 frascos y agite vigorosamente. Con los 4 frascos que no están con la solución estándar o desconoce las soluciones que fueron agregados, prepare los blancos pipeteando respectivamente 5ml (S1b), 7.5ml (S2b) y 10ml (S3b) de solución estándar de papaína y, 7.5ml (U2b) de solución muestra, coloque nuevamente todos los frascos en el baño a 40°C por 30 a 40 minutos y luego deje que la papaína precipitada se coagule completamente. Filtre a través del papel filtro, refiltrando aproximadamente la primera mitad del filtrado a través del mismo filtro (los filtrados deben salir completamente claros).

- Se lee la absorbancia de los filtrados a 280nm contra los respectivos blancos, se grafica las lecturas para S1, S2 y S3, contra la concentración de enzima para cada nivel correspondiente en unidades de mg/ml de 50ml de la solución

de test. Por interpolación de esta curva, tomando en consideración los factores de dilución, calcule la potencia de la muestra en unidades de actividad de la papaína USP/mg.

$$\text{USP/mg} = C \times (100/W) \times (100/4) \times (50/7.5) \times U$$

Donde:

C: mg/ml obtenidos de la curva estándar

W: mg de la muestra

U: Actividad de referencia estándar en unidades/mg.

ANEXO 2

Datos de la recta del Estándar de Papaina	
Concentración (mg/ml)	Absorbancia
0,004	0,750
0,006	1,240
0,008	1,742

