

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



**ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAPAINA INMOVILIZADA Y SU
APLICACIÓN EN AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA
ALIMENTICIA.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

Br. VICTOR ALEXANDER GARCIA FLORES

Br. EDWIN DANIEL ROLDAN CERNA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO DE 2005

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA.



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. María Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. Salvador Castillo Arévalo

SECRETARIA

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar.

COMITE DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA FISICOQUÍMICA DE ALIMENTOS

Ing. Rina Lavinia de Medrano

ASESORA DE AREA MICROBIOLOGIA

Lic. Coralía González de Díaz

DOCENTES DIRECTORAS

MSc. Sonia Maricela Lemus

Lic. Carmen Olivia Dimas

DEDICATORIA.

A DIOS TODOPODEROSO por darme vida y salud para terminar mi carrera, así como también por permitirme desarrollarme como persona.

A MI MADRE ANA MARIA por haberme sacado adelante, a pesar de todas las dificultades que se presentaron, esta tesis esta dedicada especialmente a ella, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera.

A MIS TIOS DIÓGENES (Q.D.D.G.) Y GUADALUPE por su apoyo y cariño, además por estar a mi lado cuando los necesité.

A MIS HERMANOS ROBERTO, GUSTAVO Y ALFONSO por estar conmigo siempre, además por su apoyo, amistad y cariño.

Edwin Daniel Roldán Cerna.

DEDICATORIA

A DIOS: por ser mi fortaleza espiritual, por permitirme terminar mi carrera y hacerme la persona que ahora soy.

A MIS PADRES: Victor Rosendo y María Deysi, dedico esta tesis por darme la vida y todo su amor, por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, por haberme educado para ser un hombre de bien.

A MI ESPOSA: Miriam Alcira y mi hija Verenisse Alexandra, por ser la fuente de mi inspiración para no dejarme vencer por nada y haberme apoyado incondicionalmente durante todo el desarrollo de mi estudio, brindándome las dos su comprensión, amor, cariño y darme los momentos más felices de mi vida.

A MIS HERMANAS: Karla y Kenia, por haber estado a mi lado en los momentos más alegres y más difíciles y apoyarme en todo momento.

A MIS ABUELOS: Gerarda Guardado por ser como mi madre y darme su gran amor; a Domingo Flores por darme su cariño y comprensión. Rosendo García (QDDG) por ser la persona que estuvo, esta y estará a mi lado, por cuidarme toda mi vida y guiarme para afrontar todos los problemas (te extraño).

A MIS PRIMOS: Oscar y Ever por brindarme todo su apoyo para el desarrollo de mis estudios; a Oneyda por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles (cuando más la necesite) y brindarme palabras de fortaleza al sentirme vencido.

Victor Alexander García Flores

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a Dios Todopoderoso por habernos abierto los caminos del entendimiento y lograr concluir nuestra Tesis a pesar de todos los obstáculos.

Además agradecemos a todas las personas que hicieron realidad la conclusión de nuestra tesis, ayudándonos tanto moral como físicamente.

Gracias a los Laboratoristas: Mateo Díaz, Coreas, Wilber, Miguel, Jaime Pascual; al Ingeniero Rene Oscar López de Industria La Unica, a la señora Ana Miriam Trejo por su apoyo moral para el desarrollo de la Tesis; al señor Alfredo González y a Rosa Lidia Artiga de Ruiz.

Agradecemos a la Licenciada Odette Rauda, Licenciada Coralia de Díaz e Ingeniero Lavinia de Medrano por su ayuda en la evaluación de nuestro proyecto.

Un agradecimiento muy especial a nuestros docentes directores: MSc. Sonia Maricela Lemus y Licenciada Olivia Dimas por ayudarnos y guiarnos en la realización de este proyecto, nuestro proyecto.

Victor y Daniel

ABREVIATURAS

ATA: ácido tricloroacético

cm: centímetro

g: gramo

L: Litro

mg: miligramo

min: minuto

mL : mililitro

nm: nanómetro

SCOP: siglas en ingles para clasificación estructural de proteínas.

seg : segundo

INDICE

	Página
Resumen	
1. Introducción	xv
2. Objetivos	18
3. Marco teórico	20
3.1 Enzima Papaína	20
3.1.1 Método para aislar Papaína	22
3.1.2 Activación	23
3.1.3 Sitio activo de la Papaína	23
3.1.4 Propiedades Físicas	24
3.1.5 Clasificación de la enzima	24
3.1.6 Composición de la Papaína	24
3.1.7 Usos de la Papaína	26
3.1.8 Industria de la cerveza	27
3.1.9 Posibilidades potenciales de utilización de la Papaína	28
3.1.10 Especificaciones	28
3.1.11 Países productores	28
3.1.12 Países importadores	29
3.1.13 Propiedades enzimáticas	29
3.1.13.1 Métodos de Ensayo	29
3.1.13.2 Principio del método	30

3.2 Inmovilizado de Enzima	30
3.2.1 Ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas	30
3.2.2 Desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas	31
3.2.3 Requerimientos básicos de un sistema inmovilizado	31
3.2.3.1 Soporte	31
3.2.3.2 Agar	32
3.2.3.4 Técnica de inmovilización	32
3.2.4.1 Métodos Químicos	32
3.2.4.2 Métodos Físicos	33
3.2.4.3 Técnica de atrapamiento en gel	34
3.2.5 Reactores	34
3.2.5.1 Reactores Continuos	35
3.2.5.2 Reactores Discontinuos	35
4. Diseño metodológico	38
4.1 Investigación Bibliográfica	38
4.2 Tipo de Estudio	38
4.3 Universo	38
4.4 Población	39
4.5 Número de muestra	39
4.6 Métodos e instrumentos de recolección de datos	39
4.7 Parte experimental	39
4.7.1 Inmovilización de la Enzima	39
4.7.2 Mezcla enzima-soporte	40
4.7.3 Moldeo de la Enzima	40

4.7.4	Ensayo general de actividad por método modificado de Kunitz	40
4.7.4.1	Unidad de Actividad	41
4.7.4.2	Ensayo de actividad enzimática en función del pH	42
4.7.4.3	Ensayo de actividad enzimática en función de la temperatura	43
4.7.5	Determinar reactor a utilizar y las condiciones optimas en la cual la enzima ejerce mayor acción	43
4.7.6	Recolección de muestra	43
4.7.7	Análisis de muestra	44
5.	Resultados	47
6.	Discusión de Resultados	63
7.	Conclusiones	69
8.	Recomendaciones	73
	Bibliografía	
	Anexos	

INDICE DE ANEXOS.

ANEXO 1 : Tabla que se utilizará para recolección de datos de la actividad de la enzima inmovilizada.

ANEXO 2 : Preparación de reactivos para el ensayo de actividad.

ANEXO 3 : Preparación de buffer fosfato a pH 5.5, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0

ANEXO 4 : Determinación de la cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 1 mL de solución de Papaína.

ANEXO 5 : Determinación de la cantidad de Agar que contiene los 300 mg de la enzima inmovilizada.

ANEXO 6 : Definición de procesos continuo, discontinuo y semicontinuo.

ANEXO 7 : Fórmulas para determinar las unidades de actividad.

ANEXO 8 : Equipo utilizado para el tratamiento de aguas residuales.

ANEXO 9 : Etiqueta del recipiente en que se recolectó la muestra.

ANEXO 10 : Diagrama del método modificado de Kunitz.

RESUMEN.

La Papaína es una enzima proteolítica que se encuentra en el látex de la papaya, la cual tiene el poder de digerir los elementos proteicos y es por ello que posee una gran cantidad de aplicaciones en la industria.

La papaína esta clasificada como una enzima hidrolasa y proteasa tiólica y existe como un monómero consistente de 212 aminoácidos, en donde están presentes todos los aminoácidos comunes excepto la metionina.

La Papaína tiene aplicación en diferentes industrias tales como: cervecera, cárnica, farmacéutica, láctea, panificación, laboratorios bacteriológicos, industria del papel, etc.

Para medir la actividad de la enzima Papaína se usará el método modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de enzima, este método pertenece al 2º grupo de métodos de medición de actividad proteolítica, los cuales se basan en el grado de hidrólisis de sustratos proteicos. El método de Kunitz se realizó tanto con la enzima libre como con la enzima inmovilizada ya que se ha demostrado que el inmovilizado es una técnica que permite: aumentar la estabilidad de la enzima, fácil recuperación de la enzima permitiendo ser

reutilizada, disminución del costo del proceso y distribución uniforme de la enzima por todo el reactor.

Se requieren cuatro elementos básicos para un sistema inmovilizado, los cuales son: la enzima, el soporte, la técnica de inmovilización y el reactor. Para este trabajo de graduación se utilizó como soporte el agar, el cual es un coloide de algas extraído de especies del género *Gelidium*, la técnica de inmovilización que se utilizó es el atrapamiento de la enzima dentro de una matriz gelatinosa insoluble en agua (atrapamiento en gel), la cual esta clasificada dentro de los métodos físicos que son todos aquellos procedimientos que involucran la fijación de una enzima en un soporte, sin la formación de un enlace covalente.

El reactor enzimático es básicamente, el recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control. Para este trabajo de graduación se utilizó una columna de vidrio, la cual funcionó como un reactor semicontinuo.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

La papaína es una enzima proteolítica (hidrolasa) de origen vegetal que se encuentra en el látex de la papaya (El látex se encuentra en mayor proporción en el fruto y en menor proporción en las hojas y el tallo); esta enzima tiene el poder de digerir proteínas o los elementos proteicos como la carne, clara de huevo, leche, etc. Su acción es semejante a la de las dos enzimas del jugo gástrico del hombre: pepsina y tripsina. ⁽⁶⁾

Debido a esto tiene muchas aplicaciones en una gran variedad de industrias tales como la panadera, láctea y de embutidos. La papaína encuentra aplicación en esta industria porque hidroliza la fracción proteica de dichas sustancias. ⁽¹⁴⁾

En el presente trabajo se ensayaron estas propiedades de la enzima, tanto libre como inmovilizada para determinar la temperatura y pH óptimo de actividad. Se ha demostrado que el inmovilizado de enzimas es una técnica que permite ayudar, a la desnaturalización de proteínas empleando la enzima en forma continua, fácil de recuperar y reutilizar en nuevos procesos. ⁽⁵⁾

Los ensayos se realizaron tanto con la enzima libre como la inmovilizada a diferentes valores de pH y temperaturas, para determinar las condiciones óptimas de actividad de la enzima. ⁽⁵⁾

Luego de determinar las condiciones óptimas, se procedió a tratar con la enzima las aguas residuales de las industrias panadera, láctea y de embutidos para aprovechar el poder hidrolítico de la papaína, así como también medir el grado de hidrólisis que la papaína tiene sobre las proteínas que se encuentran presentes en estas aguas residuales de las industrias alimenticias.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Ensayar la actividad de la enzima papaína inmovilizada y su aplicación en aguas residuales de la industria alimenticia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1 Inmovilizar la enzima papaína por la técnica de atrapamiento en gel de Agar.
- 2.2.2 Determinar la temperatura y pH óptimo de actividad de la enzima inmovilizada y sin inmovilizar.
- 2.2.3 Comprobar el poder proteolítico de la enzima papaína sobre sustratos proteicos.
- 2.2.4 Determinar el tiempo máximo de actividad de la enzima inmovilizada sobre dichos sustratos.
- 2.2.5 Aplicar la enzima inmovilizada en el tratamiento de aguas residuales de las industrias alimenticias.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Enzima Papaína

La papaina es una enzima proteolítica (hidrolasa) que se encuentra en el látex de la papaya, el cual está contenido principalmente en unos vasos pequeños que están debajo de la cáscara del fruto y se extrae por medio del estriado del fruto verde pero plenamente desarrollado, sin cortarlo de la planta. ⁽⁶⁾

La papaína es activada por agentes reductores y desactivada por agentes oxidantes, presenta una amplia especificidad de sustratos. Entre sus usos más comunes están: la clarificación de la cerveza contra el frío, ablandamiento de carnes, removedor de manchas, asistente digestivo. ⁽⁹⁾

Los tipos de papaína que se venden en el mercado son cruda, semirrefinada y refinada. La limitante principal del mercado de la papaína nunca ha sido la demanda de ésta, si no la falta de una oferta continua de un producto de buena calidad y uniforme. ⁽⁶⁾

La papaína cruda se obtiene del secado de látex fresco, la semirefinada se obtiene por medio del secado en hornos y la refinada por medio de un procesamiento industrial. Se ha sabido que desde hace muchos años los pueblos de la India occidental prensaban piezas de carne entre hojas de papaya con el objeto de suavizarla, en Barbados se añadían masas de frutas verdes a la carne que de otra manera no se podía cocer.

Los nativos también usaban el jugo de la papaya como cosmético, así frotaban ya sea el jugo solo o el jugo mezclado con agua o pigmentos en sus pieles, para obtener así un tono de piel más saludable y suave. El jugo de la papaya también fue usado por los indígenas contra el eczema, las verrugas, los parásitos intestinales, las úlceras y otras llagas, la difteria y múltiples afecciones de la piel. ⁽⁶⁾

Estas extraordinarias propiedades son debidas a la presencia de una proteasa (enzima) digestiva en las hojas y el fruto verde del árbol de la papaya, llamada papaína, la cual tiene el poder de digerir proteínas, así digiere los elementos proteicos como la carne, la clara del huevo, la cuajada, etc. Su acción es semejante a la de las dos enzimas del jugo gástrico del hombre pepsina y tripsina. ⁽⁶⁾

El procedimiento de secado del látex reviste una gran importancia, de cuya calidad depende el color y actividad proteolítica de la papaína. ⁽⁶⁾

Schack demostró la existencia de 4 componentes principales con actividad proteolítica: papaína, quimopapaína, lisozima y material no caracterizado, en las proteínas solubles del látex ⁽⁹⁾

La papaína puede separarse del resto de enzimas y prepararse rápida y económicamente, en una forma cristalina, en un estado de pureza bueno y en cantidades razonables, a partir del látex seco comercial. ⁽⁶⁾

Se han desarrollado muchos métodos para aislar la papaína del resto de enzimas, entre ellos cabe mencionar el de Kimmel y Smith que es uno de los métodos más usados de extracción de papaína. ⁽⁶⁾

Cuadro 1: Características de las enzimas del látex de papaya. ⁽⁶⁾

Enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Concentración en el látex
Papaína	21,000	8.75	10%
Quimopapaína	36,000	10.10	45%
Lisozima	25,000	10.50	20%

3.1.1 Método para aislar papaína.

El método de Kimmel y Smith comprende una extracción del látex, eliminación del material insoluble en el extracto a un pH = 9.0, precipitaciones con sulfato de amonio, seguidas de tres recristalizaciones, la papaína pura obtenida por este método contiene 3 componentes: papaína activa, papaína activable y papaína no activable. Por este método se obtienen aproximadamente 6 a 7 mg. de papaína pura por gramo de látex seco. ⁽⁹⁾

Con la purificación del látex se busca.

1. Reducir el contenido de componentes no proteolíticos, para obtener una fracción con mayor actividad proteolítica.
2. Separar la papaína u otro componente del resto de enzimas o compuestos con actividad proteolítica.
3. Producir un producto más estable para incrementar su vida de almacenamiento.
4. Producir un producto estéril para una aplicación específica. ⁽⁶⁾

3.1.2 Activación.

Los agentes activantes más comunes son Cisteína, Cianuro y Sulfuros. Es importante enfatizar que aunque la papaína requiere activación, no es requerida la presencia continua del activador ⁽¹⁴⁾

Varios agentes como el yodo, bromo, peróxido de hidrógeno no diluido y oxígeno atmosférico inactivan la papaína bajo ciertas condiciones. Estos efectos han sido explicados por la naturaleza del grupo Tiol de la enzima, el cual es activo en estado reducido e inactivo en estado oxidado. ⁽⁶⁾

Se ha establecido que la papaína tiene acción hidrolítica en proteínas, péptidos sintéticos y derivados, además posee actividad Estearasa. ⁽¹⁴⁾

La estructura cristalina determinada a través de la difracción de rayos X de la papaína indica que las dimensiones de su estructura celular son 65.7 x 50.7 x 31.5 Angstroms (A^0), desarrolladas en dos estructuras cristalinas una ortorómbica y otra monoclinica. ⁽¹⁴⁾

3.1.3 Sitio Activo de la Papaína.

La interacción entre enzima y substrato ocurre en la superficie de la molécula de papaína en un surco el cual está situado entre las dos partes de la molécula. La cadena lateral de Cisteína 25 se encuentra en la ranura, si el grupo SH de la Cisteína no se encuentra libre ya sea por bloqueo por metales pesados, por agentes alquilantes o por formación disulfídica, la actividad de la enzima desaparece completamente ⁽²⁾

Cercano al grupo sulfhídrico se encuentra el anillo imidazólico de la Histidina 159, el cual se encuentra unido a su vez, a través de puentes de hidrógeno, con la cadena lateral de Asparagina 175; dándole forma a la tríada catalítica que forma el sitio activo de la papaína. ⁽¹⁾

3.1.4 Propiedades Físicas.

Cuadro 2. Propiedades Físicas de la Papaína. ⁽¹²⁾

Propiedad	Valor
Punto Isoeléctrico	pH = 8.75
Cte. de sedimentación	2.42+0.04 seg.
Cte. de difusión	10.27+0.13x10 ⁷ cm ² seg ⁻¹
Peso molecular	23,350 Daltons
Coefficiente de Extinción	25.0
Rotación óptica (pH= 5.7, 25 °C)	-66.7

3.1.5 Clasificación de la enzima.

La papaína es funcionalmente clasificada como una enzima, hidrolasa y proteasa tiolica. Fue la primera enzima reconocida como miembro de una clase de enzimas proteolíticas que necesitan un grupo sulfidril libre para desarrollar su actividad. La base de datos SCOP (siglas en inglés para clasificación estructural de proteínas) coloca a esta enzima en la clase de las proteasas cisteínicas (Superfamilia proteasas Cisteínicas). ⁽¹⁾

3.1.6 Composición de la papaína.

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

carbohidratos. Todos los aminoácidos usuales están presentes en excepción de la metionina. ⁽²⁾

Cuadro 3: Composición en aminoácidos de la papaína. ⁽²⁾

Nombre Aminoácido	Numero de aminoácidos presentes en la papaína
Lisina	10
Histidina	2
Arginina	12
Ácido Aspártico	6
Asparagina	13
Acido Glutámico	8
Glutamina	12
Treonina	8
Serina	13
Prolina	10
Glicina	28
Alanina	14
Valina	18
Isoleucina	12
Leucina	11
Tirosina	19

Cuadro 3 continuación.

Fenilalanina	4
Triptofano	5
Cisteina	1
Cistina	6

3.1.7 Usos de la papaína.

Cuadro 4: Aplicaciones Industriales de la papaína.⁽⁵⁾

Industria	Aplicaciones
Cervecera	Clarificación de la cerveza fría
Hidrólisis de la levadura	Hidrolizados de levadura
Alimenticia	Ablandador de carne, en especias, Hidrolizados, en lechería, ayuda digestiva.
Farmacéutica	Asistente digestivo, limpieza de lentes de contacto, cosméticos.
Detergentes	Removedor de manchas
Veterinario	Agente antitusivo
Fotográfica	Recuperación de la Plata de la película fotográfica
Otros	Preservación de las especias (Actividad antimicrobiana)

El porcentaje de uso de la papaína en las diferentes industrias es el siguiente: cervecería 75%, carne 10%, pescado 5%, otros alimentos 5%, productos farmacéuticos 2%, usos diversos 3%.⁽⁶⁾

3.1.8 Industria de la cerveza.

La papaína se usa en la industria de la cerveza para clarificarla o estabilizarla contra el frío, o sea para prevenir la formación de niebla o enturbiamiento debido al frío de ésta. ⁽⁶⁾ Hay dos tipos de enturbiamiento que ocurren durante el almacenamiento de la cerveza: la niebla biológica y la niebla no biológica. ⁽⁶⁾

La niebla biológica es aquella que es producida por microorganismos tales como hongos y levaduras. ⁽⁶⁾

La niebla no biológica ocurre cuando la cerveza se ha almacenado por períodos largos. Su formación y presencia es acelerada por la acción de la luz, calor, oxígeno, trazas de Fe y Cu. ⁽⁶⁾

La niebla no biológica puede ser dividida en dos categorías: niebla oxidativa y niebla debido al frío. La niebla oxidativa es la que el Oxígeno es el factor importante a controlar, puede evitarse usando glucosa oxidasa la cual remueve el Oxígeno de la lata o botella. ⁽⁶⁾

La niebla o enturbiamiento debido al frío es en la cual la papaína encuentra su aplicación, esta consiste en partículas muy pequeñas de proteínas, las cuales resultan de exponer la cerveza a una temperatura menor de 10 °C.

Generalmente consiste de Taninos, Carbohidratos y Proteínas. La porción de Taninos generalmente consiste en polifenoles.

La porción de Carbohidratos consiste de compuestos de bajo Peso Molecular como glucosa, xilosa y arabinosa. El uso de enzima proteolítica tiende a hidrolizar la fracción proteínica de la niebla debido al frío, la cual es causante esencial de esta turbidez, en pocas palabras las proteínas se pueden disolver gracias a la papaína y en consecuencia la niebla u opacidad desaparece. ⁽⁶⁾

3.1.9 Posibilidades potenciales de utilización de la papaína.

Otras posibles aplicaciones que tiene la papaína son: fabricación de quesos, coagulación de la leche, fabricación de margarina exenta de efecto cuajante, panificación, en laboratorios bacteriológicos, investigación de proteínas, industria del papel. ⁽⁶⁾

3.1.10 Especificaciones

Humedad máxima: 10.5% por unidad de peso, Cenizas no más de 10.5% por unidad de peso, arena sílice máximo 1% por unidad de peso, actividad proteolítica según el tipo deseado ⁽⁶⁾

3.1.11 Países productores.

Zaire, Tanzania, Uganda, Sri Lanka, menores Taiwán, India, Kenia, Israel y Filipinas. ⁽⁶⁾

3.1.12 Países Importadores.

Bélgica, Estados Unidos, Japón, Alemania, Inglaterra, Holanda. ⁽⁶⁾

3.1.13 Propiedades Enzimáticas.

3.1.13.1 Métodos de ensayo.

Es más útil expresar la efectividad o potencia de una enzima en términos de actividad. Cuando es posible ésta se expresa en unidades de actividad, las cuales se definen en términos del peso de sustrato transformado en producto, en un tiempo determinado. En el caso de la papaína, que es una enzima hidrolítica, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un mol de sustrato en un segundo.

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

El 1º grupo de estos métodos se basa en la hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos, estos métodos son los más exactos, más caros y menos pertinentes para aplicaciones prácticas.⁽⁶⁾

El 2º. Grupo de estos métodos se basa en el grado de hidrólisis de sustratos proteicos, existen una gran variedad de estos métodos debido a tanta combinación de proteínas y metodología a escoger, son los métodos más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y fuente de proteína usada así como las condiciones en que se lleva a cabo el ensayo.⁽⁶⁾

El 3º. Grupo de estos métodos están basados en la habilidad de la enzima de coagular la leche, estos métodos son más baratos en términos de

materiales, pero no en el tiempo que se toman, se expresan los resultados en unidades de coagulación de leche ⁽⁶⁾,

Para medir la actividad de la enzima papaína se usará el método modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de enzima, este método pertenece al 2º. Grupo de métodos de medición de actividad proteolítica. ⁽⁶⁾

3.1.13.2 Principio del Método

Una solución de la enzima es incubada bajo condiciones estándar con caseína desnaturalizada. La reacción es detenida por la adición de ácido tricloroacético (ATA). La proteína no hidrolizada es precipitada por el ATA añadido. El precipitado es removido por filtración y la absorbancia de la capa sobrenadante es medida espectrofotométricamente a 280 nm. El incremento de la absorbancia a 280 nm. después de la incubación es una medida de la actividad enzimática. ⁽⁶⁾

3.2. INMOVILIZADO DE ENZIMA.

Concepto: Es el confinamiento físico o localización de moléculas enzimáticas dentro de una matriz inerte que no participa en la reacción catalítica.

3.2.1 Ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas:

- a) Aumenta estabilidad de la enzima inmovilizada.
- b) Fácil recuperación de la enzima por filtración o decantación por estar unida a un soporte insoluble, permitiendo ser reutilizada.

- c) Disminución de costo del proceso por reutilización de enzimas
- d) Distribución uniforme de la enzima por todo el reactor.

3.2.2 Desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas:

- a) Pérdida parcial de la actividad de la enzima durante el proceso de inmovilización debido a la desnaturalización por el calor.
- b) Cambios de peso molecular y radicales libres generados durante el proceso.
- c) Heterogeneidad del sistema enzima-soporte ya que pueden existir distintas fracciones del inmovilizado con diferente número unión soporte.

3.2.3 Requerimientos básicos de un sistema inmovilizado.⁽⁵⁾

Se requieren 4 elementos básicos:

1. La Enzima
2. El soporte
3. Técnica de inmovilización
4. Reactor.

3.2.3.1 Soporte.

Los materiales utilizados como soporte incluyen tanto materiales orgánicos como inorgánicos. Los soportes orgánicos tienen más sitios de enlace por gramo, pero a menudo no tienen las propiedades más deseables de fluidez y

son afectados por factores ambientales como pH o deterioro por microorganismos. Ejemplos de soportes orgánicos son el almidón, el dextran, la agarosa, nylon, polímeros basados en la acrilamida. ⁽¹⁰⁾

Los soportes inorgánicos incluyen vidrios sólidos y porosos, tierra diatomeas, aluminio, silicón, pantalla de níquel, bolas de acero inoxidable, arena, roca. Estos soportes tienen menos sitios activos que los soportes orgánicos, pero son más estables. ⁽¹⁰⁾

3.2.3.2 Agar.

El Agar es un coloide de algas extraído de especies del género *Gelidium* y otras agarofitas, todas ellas pertenecientes a las algas rojas (rodófitas), es una sustancia amorfa y se halla en el comercio en forma de polvo, escamas, tiras delgadas, es poroso, translúcido, membranoso, de color amarillo, quebradizo cuando está seco y flexible cuando está húmedo. ⁽¹¹⁾

3.2.3.3 Técnica de inmovilización.

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

3.2.4.1. Métodos Químicos.

Los métodos químicos de inmovilización incluyen cualquiera de aquellos procedimientos que involucren la formación de al menos un enlace covalente o parcialmente covalente entre una o varias moléculas enzimáticas y un

polímero insoluble en agua. En realidad, normalmente se forma más de un enlace covalente entre los reactantes. ⁽¹⁴⁾

Ejemplo de métodos químicos.

- a) Acoplamiento de la enzima a polímeros funcionalmente insolubles en agua.
- b) Incorporación de la enzima dentro de cadenas crecientes de polímeros.
- c) Enlazamiento intermolecular de la enzima con un reactivo multifuncional de bajo peso molecular. ⁽¹⁴⁾

3.2.4.2. Métodos Físicos.

En los métodos físicos se incluyen a todos aquellos procedimientos que involucren la fijación de una enzima en un soporte, sin la formación de un enlace covalente. En estos procedimientos, la inmovilización de las enzimas es dependiente de la operación de ciertas fuerzas físicas tales como interacciones electrostáticas, formación de enlaces iónicos, interacciones proteína-proteína, etc., el atrapamiento en microcompartimientos o la contención en membranas semipermeables. ⁽¹⁴⁾

Ejemplos de métodos físicos.

- a) Adsorción de la enzima sobre una matriz insoluble en agua.
- b) Atrapamiento de la enzima dentro de una matriz gelatinosa insoluble en agua (atrapamiento en gel).

- c) Atrapamiento de la enzima dentro de una microcápsula permanente o no permanente semipermeable.
- d) Retención de la enzima dentro de dispositivos especiales dependientes de membranas semipermeables. ⁽¹⁴⁾

3.2.4.3. Técnica de Atrapamiento en Gel.

Esta técnica de inmovilización consiste en dar lugar a la formación de un gel en presencia de la enzima. Las condiciones deben ser idóneas para producir un gel con poros más pequeños que la enzima, de manera que ésta quede atrapada dentro de la matriz del gel; además estos poros deben ser suficientemente grandes para permitir la difusión y transformación del sustrato, y finalmente la liberación del producto. ⁽¹⁰⁾

3.2.5 Reactores.

Un reactor enzimático es básicamente, el recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control. El reactor provee la unión central entre el lote de alimentación inicial y el producto. ⁽⁵⁾

De acuerdo a las características de manejo del sustrato en el sistema los reactores se pueden clasificar en reactores de flujo continuo y flujo discontinuo o reactores en lotes. ⁽¹⁴⁾

3.2.5.1 Reactores Continuos.

Con la introducción de las enzimas inmovilizadas, las operaciones continuas se han hecho realidad en las reacciones catalizadas por enzimas, con las ventajas del control automático, facilidad de operación y control de calidad de los productos. Los reactores continuos se pueden dividir en dos grupos básicos, dependiendo del tipo de flujo: Reactores tipo tanque con agitación y alimentación continua y Reactores de flujo pistón. ⁽⁵⁾

Los reactores tipo tanque con agitación alimentados continuamente consisten en un tanque con una entrada de sustrato y una salida de producto separadas, cuyo grado de conversión puede controlarse regulando el volumen del reactor, la velocidad de flujo y la cantidad y actividad de la enzima inmovilizada. ⁽⁵⁾

Los reactores de flujo pistón son un resultado directo de las propiedades de las enzimas inmovilizadas que se prestan a ser empaquetadas en columnas. El sustrato pasa a través del lecho de la enzima inmovilizada y el producto se obtiene a la salida. ⁽⁵⁾

3.2.5.2 Reactores Discontinuos.

Los reactores discontinuos son el tipo más común de reactores utilizados en los procesos que emplean enzimas solubles. Una vez completada la reacción, la enzima soluble generalmente no se recupera de la mezcla de reacción y en consecuencia no se reutiliza. Puesto que uno de los principales objetivos de la inmovilización de una enzima es el poder

recuperarla para reutilizarla, el uso de enzimas inmovilizadas en un reactor discontinuo necesita con frecuencia un proceso adicional de separación de la enzima, en el cual se pueden producir pérdidas apreciables de la enzima inmovilizada así como pérdidas de la actividad enzimática debido por ejemplo al secado del material. ⁽⁵⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Investigación Bibliográfica

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

4.2 Tipo de estudio.

El estudio es retrospectivo, prospectivo y experimental.

Es retrospectivo, porque nos basamos en estudios anteriores.

Es prospectivo ya que se explora posibilidades futuras basándonos en indicios presentes.

Es experimental, ya que se comprobará el poder proteolítico de la papaína.

4.3 Universo

Aguas de vertido de panaderías, Industrias Lácteas y Fábricas de Embutidos del área metropolitana de San Salvador.

4.4 Población

Descargas de aguas residuales de Panadería, Industria Láctea (Cremería) y Fábrica de Embutidos.

4.5 Número de Muestra.

Se recolectaron las aguas de vertido de los lugares seleccionados con un volumen de 3 Litros por cada empresa, lo que implica una toma de muestra de 3 Litros en cada una de las empresas y se subdividieron en 50 alícuotas para su posterior análisis, las cuales serán mantenidas a una temperatura de 4°C para su conservación.

4.6 Métodos e instrumentos de recolección de datos.

- a) Llevar la prueba por triplicado para asegurar confiabilidad de los resultados.
- b) Utilización de una tabla de recolección de datos (ver anexo 1)
- c) Espectrofotómetro UV-Visible
- d) Espectrofotómetro Spectronic 20

4.7 Parte Experimental.

4.7.1 Inmovilización de la enzima.⁽⁶⁾

- a) En una balanza Granataria pesar 10 g. de agar-agar.
- b) En un Erlenmeyer de 250 mL colocar Agar y adicionar 100 mL de agua destilada.
- c) Calentar en baño de agua hasta completar disolución.

- d) Esterilizar solución homogénea en autoclave a 121⁰C, 15 Libras de presión por 15 minutos.
- e) Enfriar hasta 60⁰C y mantener en baño maría.

4.7.2 Mezcla Enzima-soporte⁽⁶⁾

- a) En balanza analítica pesar 400 mg de enzima papaína.
- b) Mezclar la enzima con la solución de Agar a 47⁰C
- c) Agitar vigorosamente por 3 minutos.
- d) Mantener en baño de agua a 45⁰C

4.7.3 Moldeo de la Enzima⁽⁶⁾

- a) Agregar la mezcla enzima-soporte sobre agua destilada estéril a 5⁰C utilizando jeringa de 30 cc.
- b) Dejar caer las gotas de la mezcla, formando esferas.
- c) Retirar las esferas del agua, lavar y obtener peso.
- d) Almacenar las esferas en una solución de agua estéril a 10⁰C

4.7.4 Ensayo general de Actividad por Método Modificado de Kunitz.⁽⁶⁾ (ver anexo10)

- a) En 4 tubos de ensayo, Pipetear 1 mL de sustrato de caseína (Anexo 2).
- b) Etiquetar los tubos así: E¹⁵, E⁰, I¹⁵ e I⁰
- c) Colocar los tubos en baño de agua a 40⁰C y dejar reposar por 10 minutos.

- d) En el tubo E¹⁵ Pipetear 1 mL de solución de papaína, agitar y colocar en el baño (Anexo 2).
- e) En el tubo I¹⁵ colocar una cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 1 mL.(anexo 4)
- f) Repetir procedimiento anterior para tubo vacío E^{0'} al cual se le añade 1 mL de solución de papaína y para el tubo I^{0'} se añade el equivalente de enzima inmovilizada (anexo 4).
- g) Incubar por 15 minutos.
- h) Detener reacción adicionando 3 mL de solución de ácido tricloroacético a los tubos E¹⁵, I¹⁵, E^{0'} e I^{0'}
- i) Añadir contenido del tubo E⁰ en el tubo E^{0'} y el tubo I⁰ en el tubo I^{0'}
- j) Colocar los tubos por una hora a 40°C
- k) Filtrar en papel whatman # 42
- l) Leer absorbancias de filtrados a 280 nm contra blanco (ácido tricloroacético).

4.7.4.1 Unidad de actividad⁽⁶⁾

La actividad del material enzimático en unidades por gramo se obtiene de la ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 \quad (\text{enzima en solución})$$

C

De donde:

C : concentración solución enzimática original en mg/mL

E^{15} : absorbancia después de 15 min.

$E^{0'}$: absorbancia inicial

10^4 : constante del método

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

Donde:

C : peso enzima soluble presente en el peso de enzima inmovilizada.

I^{15} : absorbancia después de 15 min.

$I^{0'}$: absorbancia inicial

10^4 : constante del método

4.7.4.2 Ensayo Actividad Enzimática en función del pH⁽⁶⁾

- a) Preparar soluciones buffer fosfato a pH: 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0
(ver anexo 3)
- b) Preparar sustrato de caseína y solución de papaína ajustados a pH 5.0 (anexo 2)
- c) Desarrollar ensayo de actividad
- d) Repetir utilizando sustrato de caseína y solución de papaína ajustados a pH de 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0

4.7.4.3 Ensayo de Actividad Enzimática en función de la Temperatura.

Se determinará la influencia ejercida por la temperatura en la actividad enzimática a 20°, 30°, 40°, 50° y 60° grados Celsius.

4.7.5 Determinar Reactor a utilizar y las condiciones óptimas en la cuales la enzima ejercerá una mayor acción.⁽⁶⁾

- a) Colocar la papaina inmovilizada exactamente pesada dentro de una columna de vidrio.(anexo 8)
- b) Colocar una ampolla de separación, lo que nos permitirá regular el flujo que pasará dentro de la columna.
- c) Colocar un beaker al final, de la columna que contiene la Papaína inmovilizada, para coleccionar el agua que ha sido tratada.
- d) Realizar por el método, semicontinuo (anexo 6), para medir el tiempo que dé la mayor actividad, la enzima inmovilizada.
- e) Se deberá de regular la muestra al pH y la temperatura a la cual presenta una mayor actividad la papaina inmovilizada

Nota: Esto determinará las mejores condiciones en las cuales la enzima ejercerá una mayor actividad.

4.7.6 Recolección de la muestra

- a) Lavar los envases de plástico dos o tres veces con el agua a recoger.
- b) Tomar la muestra en forma manual.
- c) Llenar el envase por completo sin dejar espacios de aire.

- d) Identificar todas las muestras tomadas poniendo una etiqueta con la siguiente información: fecha y hora de recolección, lugar de recolección, nombre de la persona que toma la muestra, hora y análisis a realizar.(anexo 9)
- e) Almacenar en refrigeración a 4⁰ C para conservar sus propiedades originales para su posterior análisis. ⁽⁷⁾ El período transcurrido entre la toma de muestra y su almacenamiento no debe sobrepasar las 6 horas.

4.7.7 Análisis de Muestra

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

- a) Poner en la columna de vidrio una cantidad de enzima inmovilizada pesada equivalente a 300 mg de la enzima (anexo 5).
- b) Tomar 50 mL de la muestra recolectada
- c) Leer a una longitud de onda de 610 nm
- d) Modificar el pH de la muestra, es decir a pH 6.0 en el cual presentó mayor actividad.
- e) Colocar dentro de la ampolla de separación el volumen de muestra a analizar y regular el flujo para que sean gotas constantes sobre la enzima inmovilizada.

- f) Concluidos los 45 minutos girar el regulador de flujo para extraer la muestra tratada, y se colectara en un beaker.
- g) Poner dentro de la celda y leer a una longitud de onda de 610 nm.
- h) Seguir este procedimiento hasta que la enzima inmovilizada ya no actúe sobre las proteínas presentes en las aguas de vertido.
- i) Cuando la actividad de la enzima inmovilizada se vea disminuida se puede hacer un lavado con solución buffer fosfato pH 6.0
- j) Se realizará hasta que la actividad de la enzima se vea disminuida al mínimo o ya no presente actividad.

CAPITULO V
RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

TABLA N°1: RESULTADOS DE LAS LECTURAS DE LA ABSORBANCIA DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A 280 nm a 40°C

pH	E ⁰	E ¹⁵	I ⁰	I ¹⁵
5.0	0.227	0.7530	0.1050	0.489
6.0	0.717	1.5525	0.9385	1.424
7.0	0.283	0.2980	0.2500	0.553
7.5	0.156	0.3360	0.2095	0.330
8.0	0.808	0.6875	0.9800	1.020
9.0	0.187	0.2370	0.1780	0.204

E⁰, E¹⁵ = Enzima en solución.

I⁰, I¹⁵ = Enzima Inmovilizada.

Cálculos: ver anexo 7.

TABLA N° 2: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES pH Y A UNA TEMPERATURA CONSTANTE DE 40°C.

pH Sustrato	Actividad enzima libre Unidad Kunitz	Actividad enzima inmovilizada Unidad Kunitz
5.0	1.753 x 10 ⁴	1.280 x 10 ⁴
6.0	2.785 x 10 ⁴	1.610 x 10 ⁴
7.0	1.660 x 10 ⁴	1.010 x 10 ⁴
7.5	0.600 x 10 ⁴	0.401 x 10 ⁴
8.0	0.400 x 10 ⁴	0.130 x 10 ⁴
9.0	0.167 x 10 ⁴	0.086 x 10 ⁴

Cálculos: ver anexo 7.

TABLA N°3: PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES pH Y A UNA TEMPERATURA CONSTANTE DE 40⁰ C

pH Sustrato	Porcentaje de actividad Enzima libre	Porcentaje de actividad Enzima inmovilizada
5.0	62.95	79.11
6.0	100.00	100.00
7.0	59.60	62.73
7.5	21.54	24.70
8.0	14.36	8.05
9.0	5.90	5.34

Cálculos: ver anexo 7.

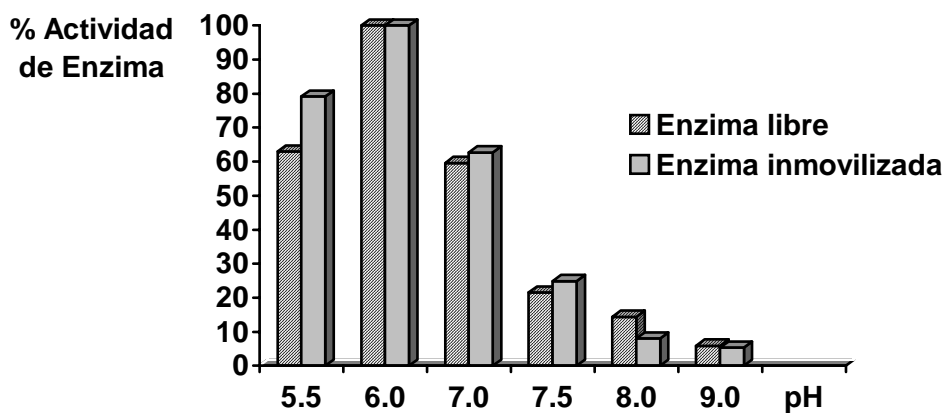


FIGURA N° 1: PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES pH Y UNA TEMPERATURA CONSTANTE DE 40⁰ C

“ A 40°C, el pH al cual presentó una mejor actividad, fue a pH 6 ” por lo cual se trabajará a este pH y a diferentes temperaturas para determinar temperatura óptima. (cálculos anexo 7)

TABLA N°4: ABSORBANCIAS DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A 280 nm. a pH =6.0 Y A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temperatura (°C) en grados centígrado	E ⁰	E ¹⁵	I ⁰	I ¹⁵
20	1.1070	1.2740	1.4420	1.6635
30	1.0295	1.3315	1.2515	1.5445
40	0.7170	1.5525	0.9385	1.5240
50	1.0350	1.8920	1.8000	2.2840
60	1.0310	1.9190	1.1050	1.6460

Cálculos: ver anexo 7.

TABLA N°5: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADO A UN pH=6.0 A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temperatura (°C) en grados centígrados	Actividad enzima libre unidad Kunitz	Actividad enzima inmovilizada unidad Kunitz
20	0.680 x 10 ⁴	0.738 x 10 ⁴
30	1.006 x 10 ⁴	0.976 x 10 ⁴
40	2.785 x 10 ⁴	1.618 x 10 ⁴
50	2.856 x 10 ⁴	1.613 x 10 ⁴
60	2.963 x 10 ⁴	1.803 x 10 ⁴

Cálculos: ver anexo 7.

TABLA N° 6: PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y A pH CONSTANTE DE 6.

Temperatura (°C)	Porcentaje de actividad Enzima libre	Porcentaje de actividad Enzima inmovilizada
20	22.94	40.90
30	33.95	54.16
40	93.99	89.74
50	96.39	89.46
60	100.00	100.00

Cálculos: ver anexo 7.

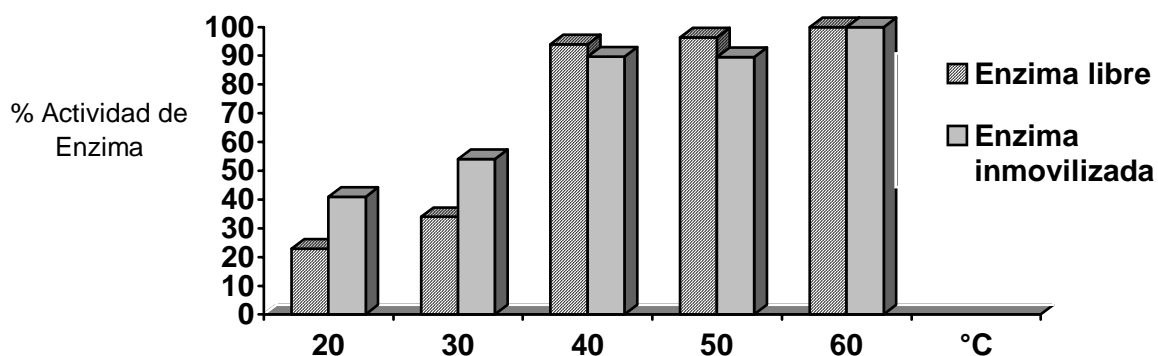


FIGURA N° 2: PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y A pH CONSTANTE DE 6.

“El gráfico nos muestra que cuando el pH se mantiene en 6 la temperatura a la cual presenta una mayor actividad la enzima es a 60°C”.(cálculos anexo 7)

TABLA N^o 7: ABSORBANCIAS DE MUESTRAS PREVIO Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE, CON SUSTRATO DE CASEINA.

Número de muestra	Tiempo (minutos)	Volumen Tratado en mL	Absorbancias previo al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1	45	50.0	0.040	0.016
2	90	50.0	0.040	0.016
3	135	50.0	0.040	0.015
4	180	50.0	0.040	0.016
5	225	50.0	0.040	0.017
6	270	50.0	0.040	0.016
7	315	50.0	0.040	0.016
8	360	50.0	0.039	0.016
9	405	50.0	0.039	0.016
10	450	50.0	0.040	0.019
11	495	50.0	0.040	0.019
12	540	50.0	0.040	0.020
13	585	50.0	0.039	0.022
14	630	50.0	0.039	0.027
15	675	50.0	0.039	0.035
16	720	50.0	0.039	0.039
17	765	50.0	0.039	0.039
18	810	50.0	0.039	0.039
19	855	50.0	0.039	0.039

“Terminadas las lecturas se determinó que la enzima Papaína inmovilizada, funcionó con la muestra de sustrato de caseína por un período de 675 minutos, en el cual se sometieron al tratamiento 15 muestras, mostrando gran actividad, la cual fue disminuyendo paulatinamente hasta que en la muestra número 16 presentó una absorbancia inicial, igual a la absorbancia final, e igualmente se observó con la muestra 17,18,19; indicando que la enzima inmovilizada había disminuido su actividad proteolítica”.

Aquí utilizamos un sustrato de conocida absorbancia como lo es la caseína que sirve para poder determinar el tiempo en el cual la enzima inmovilizada ejerció su actividad y así tener un tiempo control.

MUESTRA 1 RECOLECTADA EN LA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS

DESCRIPCIÓN: Líquido color rosado, con pequeños fragmentos de carne aspecto claro y con olor a carne descompuesta con un pH igual a 6.0

TABLA No. 8: ABSORBANCIAS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LA ENZIMA INMOVILIZADA.

Número de muestra	Tiempo (minutos)	Volumen tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1	45	50.0	0.084	0.040
2	90	50.0	0.084	0.041
3	135	50.0	0.084	0.041
4	180	50.0	0.084	0.041
5	225	50.0	0.084	0.041
6	270	50.0	0.083	0.040
7	315	50.0	0.083	0.048
8	360	50.0	0.083	0.047
9	405	50.0	0.083	0.049
10	450	50.0	0.083	0.050
11	495	50.0	0.083	0.055
12	540	50.0	0.083	0.060
13	585	50.0	0.084	0.057
14	630	50.0	0.083	0.052
15	675	50.0	0.093	0.057
16	720	50.0	0.090	0.055
17	765	50.0	0.103	0.056
18	810	50.0	0.100	0.059
19	855	50.0	0.100	0.065
20	900	50.0	0.100	0.065
21	945	50.0	0.103	0.065
22	990	50.0	0.103	0.065
23	1035	50.0	0.102	0.073
* 24	1080	50.0	0.102	0.094
25	1125	50.0	0.100	0.099
26	1170	50.0	0.100	0.100
27	1215	50.0	0.102	0.102
28	1260	50.0	0.100	0.100

“Al tratar la muestra número 24 se dio una disminución en el margen de las absorbancias, por eso se realizó el lavado con la solución buffer (*) pero no mostró mejoría, así que se determinó que la enzima inmovilizada funcionó por un período de tratamiento de 1080 minutos en la cual se trataron 24 muestras de agua, este es el tiempo en el cual la enzima papaína inmovilizada ejerció su actividad sobre la muestra de agua residual de la industria de Embutidos.

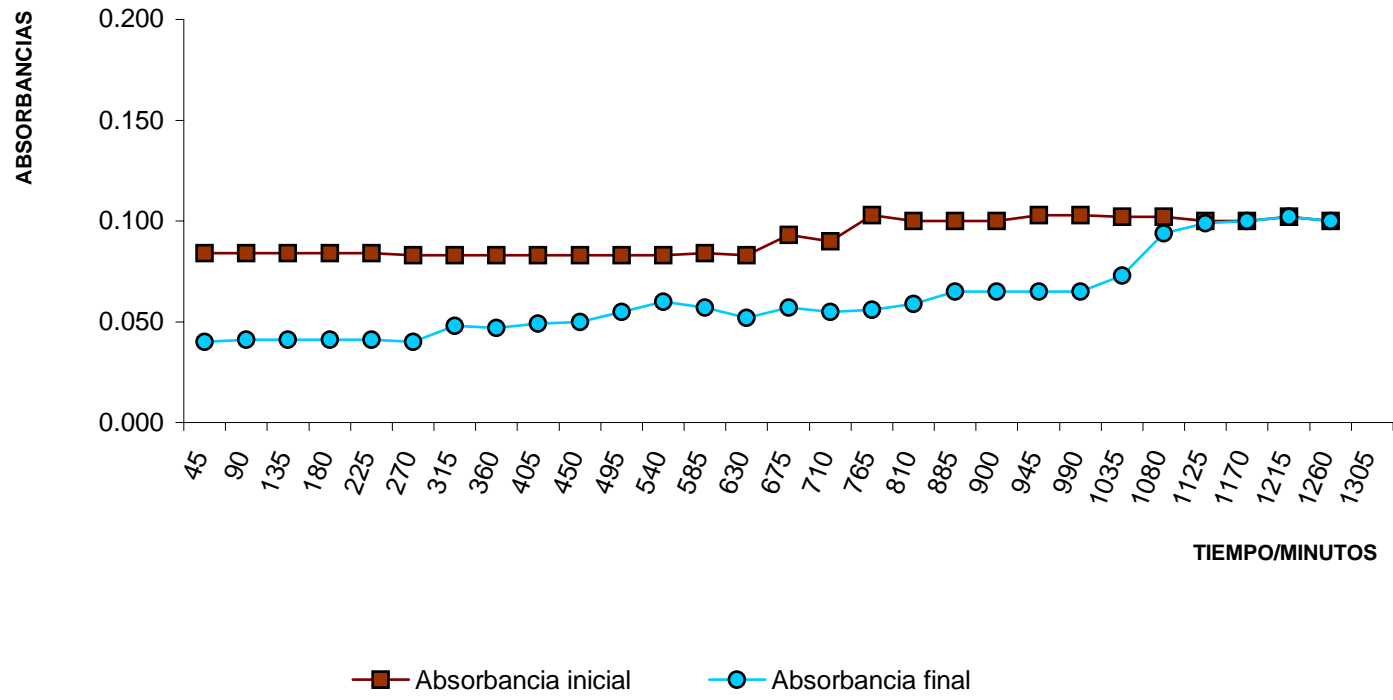


FIGURA N° 3: ABSORBANCIA INICIAL VRS. ABSORBANCIA FINAL CON RESPECTO AL TIEMPO EN LA MUESTRA DE INDUSTRIA DE EMBUTIDOS .

MUESTRA 2 RECOLECTADA EN INDUSTRIA LACTEA.

DESCRIPCIÓN: Líquido color blanco, olor a queso, aspecto opaco, limpio sin trazas de ningún sólido, con un pH igual a 6.0

TABLA No. 9: ABSORBANCIAS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON ENZIMA INMOVILIZADA

Número de muestra	Tiempo (minutos)	Volumen tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1	45	50.0	0.109	0.048
2	90	50.0	0.100	0.028
3	135	50.0	0.100	0.033
4	180	50.0	0.100	0.030
5	225	50.0	0.100	0.031
6	270	50.0	0.100	0.034
7	315	50.0	0.100	0.037
8	360	50.0	0.109	0.040
9	405	50.0	0.109	0.039
10	450	50.0	0.100	0.039
11	495	50.0	0.100	0.039
12	540	50.0	0.101	0.040
13	585	50.0	0.090	0.033
14	630	50.0	0.093	0.035
15	675	50.0	0.093	0.035
16	720	50.0	0.093	0.032
17	765	50.0	0.093	0.032
18	810	50.0	0.093	0.035
19	855	50.0	0.093	0.036
20	900	50.0	0.093	0.045
21	945	50.0	0.093	0.050
22	990	50.0	0.093	0.060
23	1035	50.0	0.093	0.060
* 24	1080	50.0	0.093	0.069
25	1125	50.0	0.093	0.047
26	1170	50.0	0.093	0.060
27	1215	50.0	0.090	0.061
28	1260	50.0	0.090	0.061
29	1305	50.0	0.090	0.069
30	1350	50.0	0.090	0.070
31	1395	50.0	0.090	0.073

Tabla No. 9 continuación

Número de muestra	Tiempo (minutos)	Volumen tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
32	1440	50.0	0.090	0.080
33	1495	50.0	0.090	0.081
34	1530	50.0	0.090	0.081
35	1575	50.0	0.093	0.080
36	1620	50.0	0.093	0.085
37	1665	50.0	0.093	0.085
38	1710	50.0	0.093	0.085
39	1755	50.0	0.093	0.084
* 40	1800	50.0	0.093	0.064
41	1845	50.0	0.093	0.068
42	1890	50.0	0.093	0.074
43	1935	50.0	0.093	0.080
44	1980	50.0	0.093	0.080
* 45	2025	50.0	0.093	0.085
46	2070	50.0	0.093	0.085
47	2115	50.0	0.093	0.085
48	2160	50.0	0.093	0.085
49	2205	50.0	0.093	0.085

“Cuando se llegó al tratamiento de la muestra No. 44, se mostró una absorbancia constante, ya no aumentó ni disminuyó la absorbancia después del tratamiento, lo que indica que la acción de la enzima se encontraba al mínimo.

Con las lavadas realizadas con solución buffer (*) presentó una leve mejoría alargando así el tiempo de actividad de la enzima.

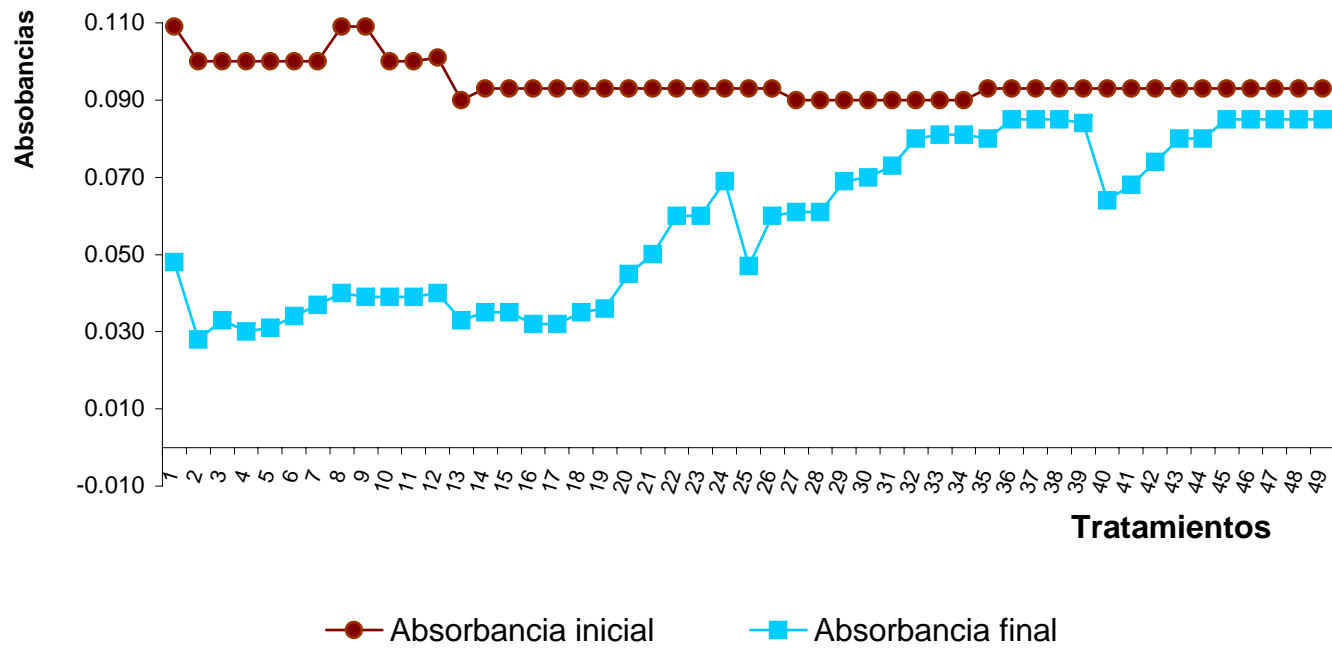


FIGURA Nº 4 ABSORBANCIA INICIAL VRS. ABSORBANCIA FINAL CON RESPECTO AL TIEMPO DE LA MUESTRA DE INDUSTRIA LACTEA.

MUESTRA 3 RECOLECTADA EN PANADERIA

DESCRIPCIÓN: Líquido incoloro, olor característico a pan, aspecto opaco, con trazas de pan y un pH igual a 6.0

TABLA No. 10: ABSORBANCIAS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON ENZIMA INMOVILIZADA.

Numero de muestra	Tiempo (Minutos)	Volumen tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1	45	50	0.060	0.039
2	90	50	0.060	0.038
3	135	50	0.059	0.036
4	180	50	0.057	0.036
5	225	50	0.054	0.034
6	270	50	0.053	0.034
* 7	315	50	0.053	0.034
8	360	50	0.044	0.034
9	405	50	0.034	0.029
10	450	50	0.034	0.027
11	495	50	0.034	0.026
12	540	50	0.028	0.025
13	585	50	0.026	0.023
14	630	50	0.023	0.022
15	675	50	0.023	0.022
16	720	50	0.022	0.021
17	765	50	0.022	0.020
18	810	50	0.021	0.020
19	855	50	0.020	0.020

Con la muestra de panadería, la enzima papaína trabajó de manera óptima, solamente con siete muestras, ya que a partir de la muestra ocho se observó una disminución de las absorbancias de las muestras sin tratarlas, esto pudo ser ocasionado debido a la presencia de bacterias, las cuales posiblemente degradaron a las proteínas presentes en la muestra de agua. También pudo deberse a la presencia de grasa en la muestra de agua que no se observaban a simple vista porque estaban emulsionadas, esta grasa ocasionó una disminución del contacto entre la enzima y la muestra de agua, debido a que la grasa puede formar una película sobre las esferas de agar.

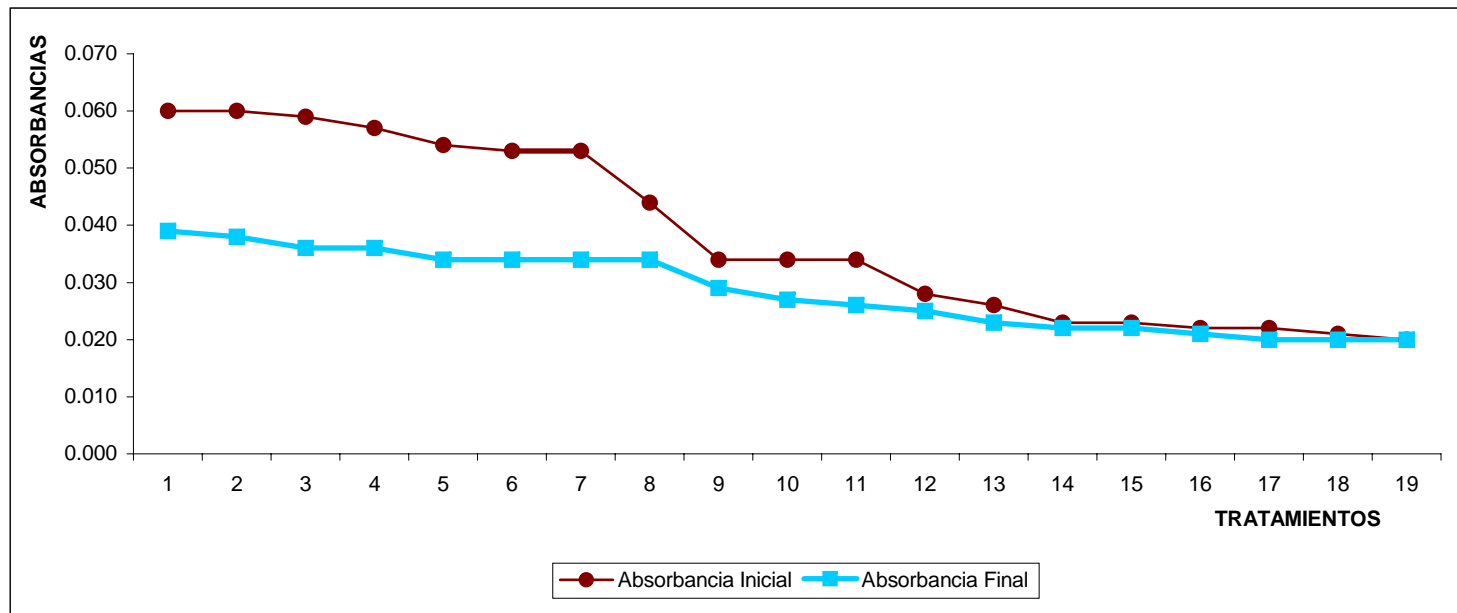


FIGURA Nº 5: ABSORBANCIA INICIAL VRS. ABSORBANCIA FINAL CON RESPECTO AL TIEMPO DE LA MUESTRA DE "PANADERÍA" .

CAPITULO VI
ANÁLISIS DE RESULTADOS

6. ANALISIS DE RESULTADOS

Resultados de la determinación de Actividad de la enzima libre e inmovilizada.

La utilización de la enzima papaína libre e inmovilizada, se hace con el objeto de determinar si hay disminución de la actividad proteolítica en el proceso de inmovilizado, frente a la enzima libre. Así determinamos si el proceso de inmovilización presenta algún efecto sobre la enzima, como la disminución de su actividad.

El inmovilizado se realizó en agar-agar, soporte que garantiza la facilidad en el moldeo, además de no participar en la reacción, con la condición de que se debe obtener una forma que garantice un mayor contacto de la enzima con el sustrato proteico, la forma de esferas da una mayor superficie de contacto.

En el proceso de inmovilización se debe esterilizar: agua, agar, jeringas, espátulas, agitadores, tijeras, etc. Lo cual garantiza que la mezcla enzima-soporte permanezca mucho más tiempo sin ser atacada por microorganismos y así ser utilizada por un mayor periodo de tiempo.

La enzima libre e inmovilizada se sometieron a pruebas de actividad a una temperatura constante de 40°C y a diferentes valores de pH (6.0,7.0,7.5,8.0,9.0), por el método modificado de Kunitz, que dió como resultado que a una temperatura constante de 40°C la enzima libre e inmovilizada presentan casi las mismas características de actividad

proteolítica, indicando que el inmovilizado no afectó en gran medida su actividad.

Según tablas No. 2 y 3 y figura No. 1, el pH al cual la enzima presentó una mayor actividad fue de 6.0, a este pH la enzima libre e inmovilizada presentaron un 100% de actividad proteolítica sobre el sustrato.

Luego de determinar el pH óptimo, se trabajó modificando la temperatura (20,30,40,50 y 60 °C) para determinar a que temperatura se dá una mayor actividad proteolítica.

Luego de realizar el método modificado de Kunitz y según el resultado de tabla No. 6 y figura No. 2, se determinó que a la temperatura de 60°C ambas enzimas presentan un 100% de actividad proteolítica.

En el tratamiento de aguas residuales, sólo se modificó el pH y no la temperatura, debido a que no se cuenta con un equipo adecuado que nos garantice la temperatura constante de 60°C cuando el sustrato esté en contacto con la enzima. Dependiendo del pH se modificará con Acido cítrico o con Hidróxido de Sodio.

La recolección de las aguas debe ser idónea para garantizar que cuando se analice posea todas sus características, debe tenerse especial cuidado en la forma de recolectarla, en la forma de transportarla y la forma de almacenarla. El almacenaje es lo más importante, ya que al almacenarla a 4°C, se garantiza la no-degradación de las proteínas antes del tratamiento.

Para determinar las mejores condiciones de reacción, se realizó el proceso en reactores continuo, discontinuo y semicontinuo, se realizaron pruebas

que garantizaban que durante el proceso se obtenga un 100% de degradación de las proteínas presentes en las aguas, para lo que se utilizó una columna de vidrio con un regulador de flujo, la cual facilitaba la extracción del sustrato tratado para su posterior lectura a 610 nm en el espectrofotómetro UV-VIS.

En el proceso continuo se pone la enzima inmovilizada en la columna de vidrio y se le adiciona un volumen determinado de sustrato proteico, inmediatamente se recibe al final de la columna de vidrio para su lectura a 610 nm. No mostró ninguna disminución significativa entre la absorbancia inicial que fue de 0.040 y la absorbancia final que fue de 0.039.

En el proceso discontinuo, se deja en contacto un volumen determinado de muestra con la enzima inmovilizada durante 24 horas y luego se realiza la lectura de absorbancia a 610 nm. dando como resultado una disminución significativa de 0.040 a 0.016.

Finalmente en el proceso semicontinuo, se le coloca un volumen del sustrato proteico y se realizan lecturas a diferentes tiempos, dando como resultado que a los 45 minutos se dió una disminución del contenido de proteínas igual al que se dió a las 24 horas (inicial de 0.040 y la final de 0.016).

Se determinó realizar este proceso (semicontinuo), debido a que se invierte un menor tiempo para la hidrólisis de las proteínas y así se pueden realizar un número mayor de procesos de hidrólisis en las muestras con el mismo resultado que si estuviera en contacto por 24 horas, así se ahorra tiempo y dinero.

Las muestras recolectadas en Panadería, Industria Láctea e Industria de embutidos fueron pasadas por el reactor de flujo semicontinuo, se utilizó un volumen determinado de diferentes muestras en repetidas ocasiones para determinar el tiempo en el cual la actividad de la enzima inmovilizada se veía disminuida.

Para determinar la cantidad de proteínas presentes en las muestras de aguas residuales recolectadas, se utiliza el método de turbidez por proteína, el cual consiste en colocar la muestra en una celda del Espectronic 20 y leer su absorbancia a 610 nm, luego cada muestra se pasa en el reactor semicontinuo y transcurrido el tiempo se lee a la misma longitud de onda, dando como resultado una lectura menor a la inicial, lo cual indica la disminución de la cantidad de proteínas en esa muestra tratada.

En la Industria de Embutidos, la muestra se pasó por una trampa de grasa, para evitar así la interferencia que la grasa causa en las lecturas, el pH de la muestra era de 6.0 por lo cual no se necesitó modificarla. Esta muestra se debió filtrar con gasa, para quitar los residuos de carne que presentaba, luego se pasó por el reactor con un total de 28 tratamientos (ver tabla 8, figura 3). En la muestra # 24 se realizó el tratamiento con solución buffer pH 6.0 pero no mostró ningún cambio en la absorbancia lo que nos indica que la enzima dejó de ser activa después de trabajar 18 horas.

En la Industria Láctea se recolectó la muestra después de la trampa de grasa, el pH fue de 6.0 por lo que no se le modificó, se realizaron 49 tratamientos, reflejados en la tabla 9, figura 4. Hasta el tratamiento 21

presenta una fuerte actividad enzimática, en los siguientes hay actividad pero no con la misma intensidad y en el tratamiento 25 y 40 se observan unas flexiones de mayor actividad que se deben a que en estos puntos se realizaron lavados con solución buffer pH 6.0 En estos tratamientos se observa disminución de las absorbancias debido a que la actividad proteolítica de la enzima se vio regulada, pero esto dura poco tiempo; cuando se llegó a la muestra # 45 la absorbancia final se mantuvo constante a pesar que se realizó el tratamiento con solución buffer, por lo cual ya no se realizaron más pruebas porque las absorbancias obtenidas indicaban clara disminución de su actividad proteolítica.

La muestra de agua recolectada en Panadería se sometió a una trampa de grasa, presentaba un pH de 6.0 por lo cual no se modificó, a esta muestra se le realizaron 19 tratamientos según tabla 10, figura 5, en los cuales la enzima degradó a las proteínas de manera óptima solamente a 7 muestras, ya que puede observarse que a partir del tratamiento 8, las absorbancias iniciales comienzan a disminuir sin ser tratadas, esto posiblemente fue debido a la presencia de bacterias en la muestra que degradaron a las proteínas presentes.

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

7.0 CONCLUSIONES

- 7.1 El ensayo se realizó con la enzima libre e inmovilizada, con el objeto de determinar la disminución de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada frente a la enzima libre.
- 7.2 Al realizar el método modificado de Kunitz, se determinó que a una temperatura constante de 40⁰C, la enzima libre e inmovilizada presentaban casi las mismas características de actividad proteolítica, indicando así que el inmovilizado en gel no afecta en gran medida su actividad.
- 7.3 La enzima Papaína presentó una mayor actividad a un pH =6.0, por lo tanto se trabajó a este pH ya que presenta un 100% de actividad proteolítica.
- 7.4 A un pH constante de 6.0, la temperatura a la que la enzima Papaína presenta un 100% de actividad proteolítica es de 60⁰C.
- 7.5 Debido a que la enzima Papaína presenta una mayor actividad a una temperatura de 60⁰C, podemos decir que la enzima muestra gran estabilidad al exponerla a altas temperaturas, aunque también es estable a temperatura ambiente.
- 7.6 El ensayo de actividad proteolítica de la enzima Papaína se realizó a temperatura ambiente y no a la temperatura óptima de 60⁰C debido a que no contábamos con un equipo adecuado que nos garantizara tener esa temperatura durante el ensayo.

- 7.7 Se determinó realizar el ensayo de actividad de la enzima con el proceso semicontinuo, debido a que se invierte un menor tiempo para la hidrólisis de las proteínas y se obtiene el mismo resultado que si estuviera en contacto durante 24 horas.
- 7.8 Para determinar la cantidad de proteínas presentes en una muestra, se utilizó el método de turbidez por proteína, en el cual se lee la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 610 nm.
- 7.9 El tiempo de actividad de la enzima Papaína inmovilizada con la muestra de la Industria de Embutidos fue menor, debido a que se realizó lavados con agua estéril después de cada tratamiento porque quedaban trazas en la columna que podían alterar al tratamiento siguiente, y debido a que la enzima es soluble en agua, con cada lavado se perdía una cantidad de enzima inmovilizada.
- 7.10 Con las muestras de Cremería se logró trabajar con un mayor número de muestras debido a que se realizó un tratamiento con buffer $\text{pH} = 6.0$, lo que produce una reactivación de la enzima que da como resultado una disminución de las lecturas de absorbancia de las muestras.
- 7.11 Es necesario que la muestra a analizar no posea grasa en su composición, ya que éstas interfieren en las lecturas de absorbancia.
- 7.12 En base a los resultados obtenidos podemos decir que la enzima Papaína inmovilizada puede ser utilizada y reutilizada en procesos semicontinuos.

- 7.13 En base a los resultados obtenidos se confirmó que la enzima Papaína inmovilizada en gel de agar, puede ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales de la Industria alimenticia de el país.
- 7.14 En base a los resultados obtenidos concluimos que la enzima Papaína posee diferentes tiempo de acción proteolítica, dependiendo de la industria con la que se trabaje.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

8.0 RECOMENDACIONES.

- 8.1 Realizar el estudio a nivel de laboratorio y luego a nivel industrial acerca de la extracción y purificación de la enzima Papaína a partir del látex de Papaya para promover así un mayor cultivo y producción de este fruto y así convertirlo en una fuente de ingreso para el país.
- 8.2 Separar cualquier traza o residuo que contenga la muestra para evitar inconvenientes como el que se dió con la muestra de la Industria de Embutidos la cual tuvo un menor tiempo de actividad.
- 8.3 Separar la grasa que contenga una muestra que va a ser sometida a este tratamiento, utilizando una trampa de grasa, ya que esta interfiere en las lecturas de absorbancia.
- 8.4 Para investigaciones futuras que trabajen con la enzima Papaína inmovilizada es recomendable la utilización de un equipo que provea la temperatura optima de actividad de la enzima (60⁰C) y que sea capaz de mantener esta temperatura durante todo el proceso, para obtener así mejores resultados.
- 8.5 El almacenaje de la enzima inmovilizada se recomienda que se realice sin agua y a 4°C para evitar el desarrollo de microorganismos, pero la temperatura no se debe variar porque el Agar con la enzima pierde la humedad y por consiguiente pierde su forma.

8.6 Para realizar el moldeado de la enzima inmovilizada debe controlarse de una forma adecuada la temperatura del baño María por que si no se controla tiende a la formación de grumos en vez de esferas disminuyendo el contacto de la enzima con el sustrato a tratar.

CAPITULO IX
BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

- 9.1 Albrecht, K., 1996. Papain. Department of Chemistry. UWEC. Wisconsin. United States.
Url: www.chem.uwec.edu/chem406/webpages/KAREN/facts.html
- 9.2 Boyer, Paul D., 1970. The Enzymes, 3rd. Edition, New York, United States of America, Academic Press Inc. Vol.III.
- 9.3 Burke D. , Lewis S. , Shafer J.A., 1974. Two Steps Procedure for Purification of Papain from Extract of Papaya Latex. Archives of Biochemistry and Biophysics.
- 9.4 Cabello Velasco A., 1994. Manual de Microbiología Industrial, Universidad Autónoma de México.
- 9.5 Cuadra Zelaya, T. E., 2000. Normalización de la Enzima Papaína Inmovilizada por la Técnica de Atrapamiento en Gel, Trabajo de Graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- 9.6 Chávez Crisonino, P., 1981. Estudio de Prefactibilidad para una planta de Papaína Refinada, El Salvador, Trabajo de Graduación, Facultad de Ingeniería, Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- 9.7 Díaz de Santos, 1992. Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales, Madrid, España.
- 9.8 Flynn G., 1975. The Market Potential for Papain, Tropical Products Institute, England.
- 9.9 Gutiérrez J. R., 1974. Papain: Isolation, Properties and Applications, Universidad de Kansas, Estados Unidos.
- 9.10 Hultin, H.O. , 1983. Current and Potential uses of Inmovilized Enzymes, Food Technology Magazine, vol. 37 No. 10.
- 9.11 Kirk, R.E., 1961. Enciclopedia de Tecnología Química [Tr. Oscar G. Carrera, et. Al.] México, Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana, Tomo I.
- 9.12 Perlman, G.E., Lazlo L., 1970. Methods in Enzimology 1a. Edition, New York, USA, Academic Press, vol XIV.

- 9.13 Tainter M.L., et. al. 1951. Papain, *Annals of The New York Academy of Science*, vol 54.
- 9.14 Zaborsky, O., 1973. *Inmovilized enzymes*, 1a Edition, Cleveland, Ohio, USA, CRC Press Inc.

ANEXOS

ANEXO 1

CUADRO # 1: TABLA QUE SE UTILIZO PARA RECOLECCIÓN DE
DATOS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.

Número de Muestra	Tiempo (días)	Volumen Tratado (mL)	Absorbancia previa al tratamiento	Absorbancia después del tratamiento
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				

ANEXO 2.

CUADRO # 2: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD.

Reactivo	Materiales	Procedimiento
Sustrato de Caseína	a) 1 g de Caseína b) Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L c) Agua Endurada a 30 ^o DH	-Disolver la Caseína en 50 mL de Solución de Fosfato Trisodico -Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N -Calentar por 15 min. en agua hirviendo, enfriar a temperatura ambiente -Colocar la solución en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con agua endureda a 30 ^o DH Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N.

Cuadro # 2 continuación.

Reactivo	Materiales	Procedimiento
Agua endurecida artificialmente a 30 ^o DH	a) 0.630 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ b) 0.466 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ c) 1 Litro de agua destilada o buffer a pH requerido.	Disolver el Cloruro de Calcio dihidratado y el Cloruro de Magnesio hexahidratado en 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L	a) 4.63 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ b) 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido.	Disolver el Fosfato de Sodio dodecahidratado en 1 Litro de agua destilada o buffer al pH requerido.
Solución de Papaína	a) 0.015 g de papaína b) Solución de Fosfato trisódico 2 g/L en agua endurecida artificialmente a 15 ^o DH	-Disolver la Papaína en solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en agua endurecida a 15 ^o DH. -Colocar en balón volumétrico de 50 mL -Aforar con la solución mencionada.

Cuadro # 2 continuación.

Reactivo	Materiales	Procedimiento
Agua endurecida artificialmente a 15 ^o DH	a) 0.315 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ b) 0.233 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ c) 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido	Disolver el Cloruro de Calcio y el Cloruro de Magnesio en 1 Litro de agua destilada o buffer fosfato a pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en agua endurecida a 15 ^o DH	a) 9.26 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ b) 1 Litro de agua endurecida a 15 ^o DH	Disolver el Fosfato de Sodio en 1 Litro de agua endurecida a 15 ^o DH y ajustar a pH requerido con ácido cítrico 0.05 M
Solución Acido Tricloroacético	a) 5 g de ácido tricloroacético b) 100 mL de agua destilada	Disolver el ácido tricloroacético en agua y diluir a 100 mL.

DH = grados de Dureza.

ANEXO 3.

CUADRO # 3: PREPARACION DE BUFFER FOSFATO A pH 5.5, 6.0,
7.0, 7.5 Y 8.0

Reactivo	Material	Procedimiento
Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M	a) 23.22 g de KH_2PO_4 b) Agua libre de CO_2	Disolver el KH_2PO_4 en agua libre de CO_2 y aforar a 1000 mL.
Buffer Fosfato pH 5.5	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M b) 3.3 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2
Buffer Fosfato pH 6.0	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M b) 5.6 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO_2	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2

Cuadro # 3 continuación.

Reactivo	Material	Procedimiento
Buffer Fosfato pH 7.0	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M b) 29.1 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO ₂	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO ₂
Buffer Fosfato pH 7.5	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M b) 40.7 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO ₂	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO ₂
Buffer Fosfato pH 8.0	a) 50 mL de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2M b) 46.1 mL de NaOH 0.2N c) Agua libre de CO ₂	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL, agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO ₂

ANEXO 4**DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD ENZIMA INMOVILIZADA EQUIVALENTE A 1 mL DE SOLUCION DE PAPAÍNA.**

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

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

PROCEDIMIENTO:

1- Peso mezcla enzima – soporte = 241.4 g.

2- 0.015 g. papaína ----- 50.0 mL. de agua

X ----- 1.0 mL. de agua $x = 0.0003$ g enzima en 1 mL.

3- 1.2 g. Enzima a inmovilizar ----- 241.4 g. peso mezcla enzima – soporte

0.0003 g enzima ----- X
en mL. $X = 0.06$ g de enzima inmovilizada

NOTA: Se pesa 0.06 g de la mezcla enzima – soporte, en la cual se encuentra un equivalente de 0.0003 g de papaína.

ANEXO 5

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AGAR QUE CONTIENE LOS 300 mg. DE ENZIMA INMOVILIZADA.

A-----B

X-----C

A: peso de la mezcla enzima-soporte que se obtuvo después del inmovilizado el cual fue de 241.4 g.

B: peso de la enzima papaina que se utilizó en el proceso de inmovilizado el cual fue de 400 mg.

C: la cantidad de la enzima que se utilizó en el tratamiento de las aguas residuales de la industria alimenticia el cual fue de 300 mg.

X: cuanta cantidad de la enzima inmovilizada se pesó y que contiene el equivalente a 300 mg.

241.4 g-----400 mg

X-----300 mg

X = 181.05 g de la enzima inmovilizada se pesaran para poner dentro de la columna de vidrio el cual contendrá el equivalente a 300 mg de Papaína.

ANEXO 6

DEFINICIÓN DE PROCESOS CONTINUO, DISCONTINUO Y SEMICONTINUO.

PROCESOS CONTINUOS: Se realiza haciendo pasar la muestra de agua de las industrias, a través de la columna de vidrio sobre la enzima inmovilizada y tomar la muestra inmediatamente y leerla en el Spectronic 20. El análisis de las aguas se hace inmediatamente después de que pasa por la columna evitando el contacto prolongado de la muestra con la enzima.

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

PROCESOS SEMICONTINUOS: Consiste en colocar dentro de la columna de vidrio la enzima inmovilizada y con un regulador de flujo (ampolla) se deje caer sobre la enzima inmovilizada gota a gota la muestra de agua a tratar y se deja en contacto con la enzima por un periodo determinado de tiempo que sea menor a las dos horas y transcurrido ese tiempo se recolecta el agua y es leída en el Spectronic 20 a 610 nm, el tratamiento de las aguas se hace repetidamente en un periodo determinado de tiempo.

ANEXO 7

FÓRMULAS PARA DETERMINAR LAS UNIDADES DE ACTIVIDAD.

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

E^{15} = absorbancia después de 15 minutos

$E^{0'}$ = absorbancia inicial

C = concentración solución enzimática original en mg/mL

10^4 = constante del método

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

I^{15} = absorbancia después de 15 minutos

$I^{0'}$ = absorbancia inicial

C = peso de enzima soluble presente en el peso de enzima inmovilizada

10^4 = constante del método

CÁLCULOS REALIZADOS

pH 5.0

solución $\frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.753 - 0.227}{0.3 \text{ mg/ml}} \times 10^4 = 1.753 \times 10^4$

inmovilizada $\frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.489 - 0.105}{0.3 \text{ mg/ml}} \times 10^4 = 1.28 \times 10^4$

pH 6.0

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.5525 - 0.717}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 2.785 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.424 - 0.9385}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.61 \times 10^4$$

pH 7.0

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{2.298 - 2.283}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.66 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.553 - 0.250}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.01 \times 10^4$$

pH 7.5

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.336 - 0.156}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.600 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.330 - 0.2095}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.401 \times 10^4$$

pH 8.0

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.808 - 0.687}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.40 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.020 - 0.98}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.13 \times 10^4$$

pH 9.0

$$\begin{array}{l} \text{solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.237 - 0.187}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.167 \times 10^4 \\ \text{inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{0.204 - 0.178}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.086 \times 10^4 \end{array}$$

CALCULOS PARA DETERMINAR PORCENTAJE DE ACTIVIDAD.

1-SE TOMA EL MAYOR VALOR DE LA ACTIVIDAD COMO 100 %

- Para enzima libre es 2.785×10^4
Para enzima inmovilizada es 1.610×10^4

2-por regla de tres se determinara el porcentaje a cada pH

Ej.

$$\begin{array}{l} 2.785 \times 10^4 \text{-----} 100\% \\ 1.753 \times 10^4 \text{-----} x \end{array} \quad x = 62.95\% \text{ enzima libre.}$$

$$\begin{array}{l} 1.610 \times 10^4 \text{-----} 100\% \\ 1.280 \times 10^4 \text{-----} x \end{array} \quad x = 79.50\% \text{ enzima inmovilizada}$$

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y pH CONSTANTE

TEMPERATURA DE 20°C

$$\text{solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.274 - 1.07}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.680 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.6635 - 1.442}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.738 \times 10^4$$

TEMPERATURA DE 30°C

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.3315 - 1.0295}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.006 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.5445 - 1.2515}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 0.9766 \times 10^4$$

TEMPERATURA DE 40°C

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.5525 - 1.0717}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 2.785 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.4240 - 0.9385}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.618 \times 10^4$$

TEMPERATURA DE 50°C

$$\text{solución } \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.892 - 1.035}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 2.856 \times 10^4$$

$$\text{inmovilizada } \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{2.284 - 1.800}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.613 \times 10^4$$

TEMPERATURA DE 60°C

$$\begin{array}{l} \text{solución} \quad \frac{E^{15} - E^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.919 - 1.031}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 2.963 \times 10^4 \\ \text{inmovilizada} \quad \frac{I^{15} - I^{0'}}{C} \times 10^4 = \frac{1.646 - 1.105}{0.3 \text{mg/ml}} \times 10^4 = 1.803 \times 10^4 \end{array}$$

CALCULOS PARA DETERMINAR PORCENTAJE DE ACTIVIDAD.

1-SE TOMA EL MAYOR VALOR DE LA ACTIVIDAD COMO 100 %

- Para enzima libre es 2.963×10^4
- Para enzima inmovilizada es 1.803×10^4

2-por regla de tres se determinara el porcentaje a cada pH

Ej.

$$\begin{array}{l} 2.963 \times 10^4 \text{-----} 100\% \\ 0.680 \times 10^4 \text{-----} x \end{array} \quad x = 22.94\% \text{ enzima libre.}$$

$$\begin{array}{l} 1.803 \times 10^4 \text{-----} 100\% \\ 0.738 \times 10^4 \text{-----} x \end{array} \quad x = 40.93\% \text{ enzima inmovilizada}$$

ANEXO 8.

FIGURA Nº 6 Equipo utilizado para el tratamiento de aguas residuales.

ANEXO 9

ETIQUETA DEL RECIPIENTE EN QUE SE RECOLECTO LA MUESTRA.

NUMERO DE MUESTRA:_____ FECHA DE RECOLECCIÓN_____

LUGAR DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA _____

(Nombre y Dirección)

PERSONA QUE RECOLECTA LA MUESTRA:_____

VOLUMEN RECOLECTADO:_____

CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LA MUESTRA RECOLECTADA_____

NOMBRE DE LA PERSONA QUE PROPORCIONA LA MUESTRA:__________
FORMA DE ALMACENAJE:_____

ANEXO 10

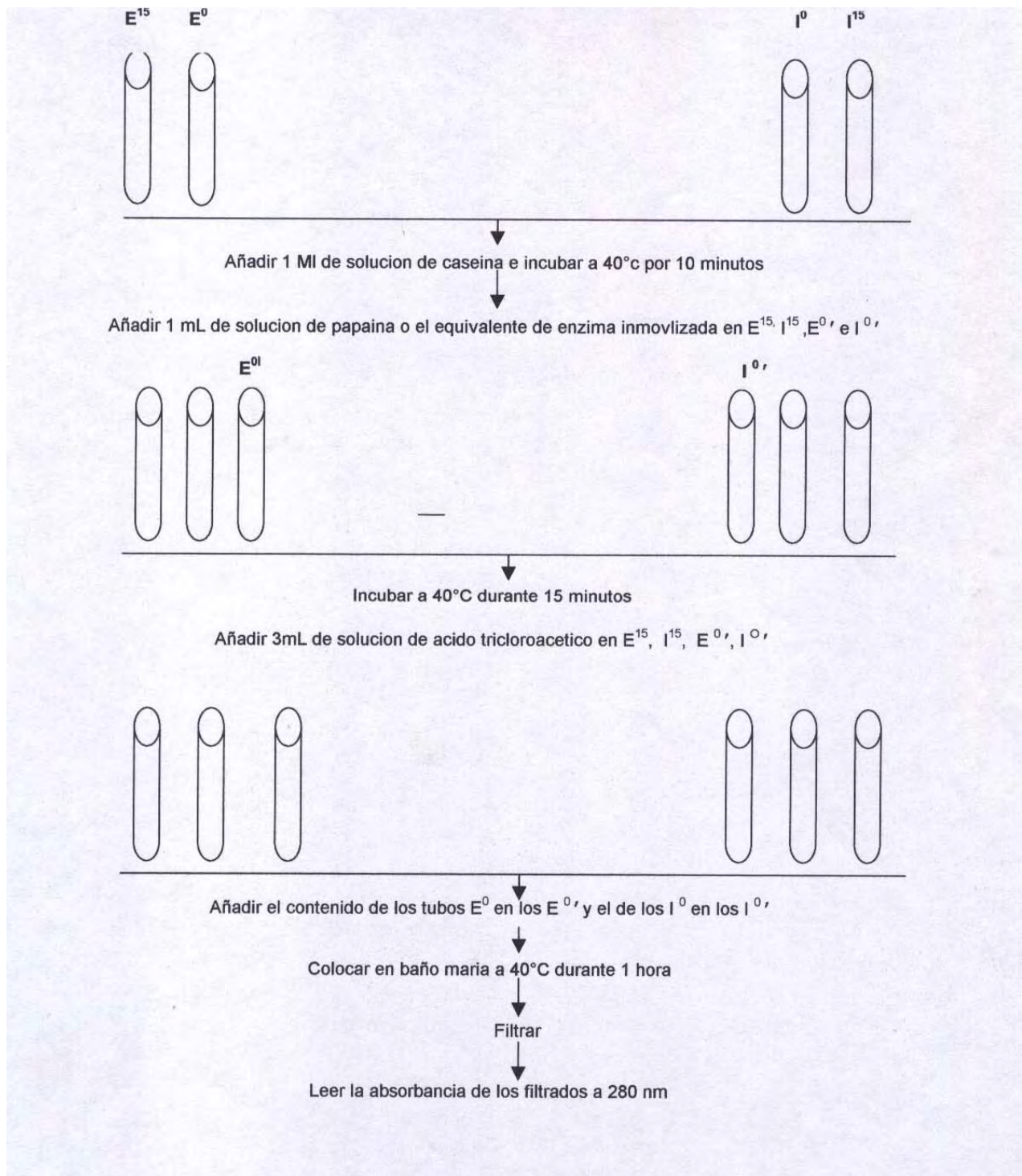


Figura N° 7 Diagrama del Método modificado de Kunitz