UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

ESCUELA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TEMA:

"EXTRACCIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLITICAS DE TRES TIPOS DE FRUTAS MEDIANTE DOS MÉTODOS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR."

Tesis de Grado previo a la obtención del Título de Ingeniera Agroindustrial otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente Escuela de Ingeniería Agroindustrial.

AUTORA
MARÍA EUGENIA GARCÍA PAZMIÑO

DIRECTOR DE TESIS
ING. EDWIN SOLÓRZANO SALTOS

GUARANDA - ECUADOR
2013

"EXTRACCIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLITICAS DE TRES TIPOS DE FRUTAS MEDIANTE DOS MÉTODOS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR."

REVISADO POR:

_____

ING. EDWIN SOLÓRZANO SALTOS

DIRECTOR DE TESIS

_____

ING. Msc. MILTON BARRAGÁN CAMACHO

BIOMETRISTA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN DE TESIS

_____

DRA. Msc. HERMINIA SANAGUANO SALGUERO

ÁREA TÉCNICA

_____

ING. Msc. MARCELO GARCÍA MUÑOZ

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DECLARACIÓN

Yo: MARÍA EUGENIA GARCÍA PAZMIÑO, autora de la tesis declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; este documento no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas.

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

_____

MARÍA EUGENIA GARCÍA PAZMIÑO

C.I. 2100248505

DEDICATORIA

A Dios, ser supremo, que me bendice día a día.

A mi madre, que ha sido para mí un ejemplo, que siempre tuvo palabras de aliento aún en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi padre que fue quien me impulsó y motivó, y siempre está a mi lado a pesar de su ausencia física.

Juan, mi querido hermano, por tu infinito apoyo, y por preocuparte incansablemente por mi bienestar….

A la persona que ocupa un lugar muy importante en mi vida, gracias por los consejos, la confianza y el apoyo total e incondicional que me brinda día a día.

María Eugenia

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme y guiarme día a día hasta alcanzar mi meta.

A la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de ingeniería Agroindustrial por brindarme la oportunidad cumplir mi sueño.

A mi director de tesis, Ing. Edwin Solórzano Saltos por su experiencia, motivación, y paciencia, para guiarme en este trabajo de investigación.

A mi madre que siempre ha sido mi apoyo incondicional y que ha inculcado en mí los mejores valores sobre todo la humildad, fe y perseverancia….

A mis hermanos: Miguel, Juan, José, mis tíos (as), primos (as), por el apoyo incondicional que siempre me brindaron.

María Eugenia

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Nº	CONTENIDO	PÁGINA
I.	**INTRODUCCIÓN**	1
II.	**MARCO TEÓRICO**	3
2.1	Generalidades sobre las enzimas	3
2.1.1	Enzimas	3
2.1.2	Perspectiva histórica	3
2.1.3	Función de las enzimas	4
2.1.4	Nomenclatura de las enzimas	4
2.1.5	Sustratos de las Enzimas	5
2.1.5.1	Formación de un complejo enzima-sustrato	5
2.1.6	Propiedades de las enzimas	6
2.1.6.1	Catalizadores orgánicos	6
2.1.6.2	Energía de activación	7
2.1.6.3	Especificidad	7
2.1.6.4	Actividad enzimática	7
2.1.6.5	Factores que afectan la actividad enzimática	8
2.2	Clasificación de las enzimas	9
2.2.1	Clasificación de las enzimas de acuerdo a su complejidad	9
2.2.2	Clasificación de las enzimas según su actividad	10
2.2.2.1	Las oxido-reductasas	10
2.2.2.2	Las Transferasas	10
2.2.2.3	Las Hidrolasas	10
2.2.2.4	Las isomerasas	11
2.2.2.5	Las Liasas	12
2.2.2.6	Las Ligasas	12
2.3	Métodos generales para la obtención de enzimas	13
2.4	La inmovilización de enzimas	14
2.4.1	Métodos de inmovilización de enzimas por retención	14

	física	
2.4.1.1	Atrapamiento	15
2.4.1.2	Inclusión en membranas	15
2.4.2	Métodos de inmovilización de enzimas por unión química	16
2.4.2.1	Unión a soportes	16
2.5	Principales fuentes de enzimas para la inmovilización	17
2.5.1	Inmovilización de enzimas de origen vegetal	18
2.6	Ventajas del uso de enzimas inmovilizadas	18
2.7	Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas	19
2.7.1	Las enzimas en la cadena agroalimentaria	19
2.7.2	Procesos agroindustriales que aplican Enzimas	20
2.7.2.1	Industria del almidón y del azúcar	20
2.7.2.2	Productos Lácteos	20
2.7.2.3	Molineros y Panadería	20
2.7.2.4	Productoras de Jugos de Frutas	21
2.7.2.5	Procesamiento de Carne	21
2.7.2.6	Industria Cervecera	21
2.7.2.7	Industrias de Grasas y Aceites	22
2.7.2.8	Industrias de Pulpa y Papel	23
2.7.3	Aplicación de las Enzimas en el Tratamiento de Desechos	23
2.8	La papaya	23
2.8.1	La papaína	24
2.8.2	Aplicaciones industriales de la papaína	25
2.9	Higo	25
2.9.1	Ficina	26
2.9.2	Aplicaciones industriales de la ficina	26
2.10	Piña	26
2.10.1	Bromelina	27
2.10.2	Aplicaciones industriales de la bromelina	27

III.	**MATERIALES Y MÉTODOS**	28
3.1	Localización del experimento	28
3.2	Ubicación del experimento	28
3.3	Situación geográfica y climática	28
3.4	Zona de vida	29
3.5	Materiales	29
3.5.1	Material experimental	29
3.5.2	Materiales de oficina	29
3.5.3	Materiales de campo	30
3.5.4	Equipos de laboratorio	30
3.5.4.5	Materiales de laboratorio	30
3.5.5	Reactivos	31
3.6	Factores en estudio	31
3.6.1	Características del experimento	32
3.6.2	Descripción del diseño	32
3.6.3	Tipo de diseño experimental	33
3.6.4	Análisis estadístico	33
3.7	Mediciones experimentales	34
3.7.1	En la materia prima	34
3.7.1.1	Potencial de hidrógeno	34
3.7.1.2	Grados Brix	34
3.7.1.3	Estado de madurez	34
3.7.2	En el producto terminado	34
3.7.2.1	Porcentaje de la enzima inmovilizada	34
3.7.2.2	Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada	35
3.7.2.3	Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada	35
3.7.2.4	Porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento	35
3.7.2.5	Determinación de la relación costo beneficio	36

3.8	Descripción general del proceso de la inmovilización de enzimas proteolíticas	36
3.8.1	Recepción	36
3.8.2	Inspección	36
3.8.3	Lavado	36
3.8.4	Selección	36
3.8.5	Análisis	36
3.8.6	Extracción de la enzima presente en las frutas	37
3.8.6.1	Papaya	37
3.8.6.2	Higo	37
3.8.6.3	Piña	37
3.8.7	Secado de la enzima presente en las frutas	37
3.8.8	Preparación	37
3.8.8.1	Suspensión de enzimas	37
3.8.8.2	Soportes para la inmovilización de las enzimas	38
3.8.8.2.1	Agar-agar	38
3.8.8.2.2	Alginato	38
3.8.9	Aplicación de los métodos de inmovilización de enzimas	38
3.8.9.1	Atrapamiento en gel	38
3.8.9.2	Unión a un soporte	38
3.8.10	Aplicación de las enzimas inmovilizadas en alimentos	39
3.9	Diagrama de flujo para el proceso de inmovilización de enzimas proteolíticas	40
IV.	**RESULTADOS Y DISCUSIONES**	41
4.1	Mediciones experimentales en la materia prima	41
4.1.1	Potencial de hidrógeno	41
4.1.2	Grados Brix	42
4.1.3	Estado de madurez	43
4.2	Análisis en el producto terminado	44

4.2.1	Porcentaje de la enzima inmovilizada	44
4.2.2	Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima Inmovilizada (APEI)	47
4.2.3	Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (REI)	58
4.2.4	Porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento	68
4.2.5	Determinación de la relación costo beneficio	87
V.	**VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS**	89
5.1	Verificación de hipótesis para la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en los sustratos: Leche, Cerveza y Carne	89
VI.	**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**	91
6.1	Conclusiones	91
6.2	Recomendaciones	93
VII.	**RESUMEN Y SUMARY**	95
7.1	Resumen	95
7.2	Sumary	97
VIII.	**BIBLIOGRAFÍA**	99
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	DETALLE	PÁGINA
1	Potencial de hidrógeno de la materia prima	41
2	Grados Brix de la materia prima	42
3	Estado de madurez de la materia prima	43
4	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI)	44
5	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI)	45
6	Análisis de varianza para la variable Porcentajede la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	49
7	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	50
8	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	52
9	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	53
10	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne	55
11	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el	56

sustrato Carne

12 Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche 59

13 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche 60

14 Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza 62

15 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza. 63

16 Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne 65

17 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne 66

18 Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche 68

19 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche 69

20	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza	72
21	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza	73
22	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne	75
23	Prueba de Tukey para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne	76
24	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche	78
25	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche	79
26	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza	81
27	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza	82
28	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne	84

29	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne	85
30	Análisis de relación costo / beneficio en el mejor tratamiento	87
31	Valores de Fisher comparativos del análisis de varianza para el Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en los sustratos: Leche, Cerveza y Carne	89

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Nº	DETALLE	PÁGINA
1	Potencial de hidrógeno de la materia prima	41
2	Grados Brix de la materia prima	42
3	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI)	46
4	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI)	47
5	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	50
6	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	51
7	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	53
8	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad	54

	proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	
9	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne	56
10	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne	57
11	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	60
12	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche	61
13	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	63
14	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza	64
15	Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne	66
16	Interacción AxB para la variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne	67
17	Prueba l de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida	70

al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche

18 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche 71

19 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza 73

20 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza 74

21 Prueba de Tukey al 5% para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne 76

22 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne 77

23 Prueba de Tukey para el variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche 79

24 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche 80

25 Prueba de Tukey al 5 % para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza 82

26 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad 83

proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza

27 Prueba de Tukey al 5% para el la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne 85

28 Interacción AxB para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne 86

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	DETALLE	PÁGINA
1	Formación del complejo enzima-sustrato	6
2	Activación de la actividad de una enzima frente a un sustrato	8
3	Métodos de inmovilización mediante retención física	14
4	Método de inmovilización mediante unión química	16
5	Matrices para determinar el estado de madurez de las frutas por inspección visual	44

ÍNDICE DE CUADROS

Nº	DETALLE	PÁGINA
1	Clasificación de las enzimas según su actividad	12
2	Composición nutricional por cada 100 g de papaya	24
3	Composición nutricional por cada 100 g de higo	26
4	Composición nutricional por cada 100 g de piña	27
5	Ubicación del experimento	28
6	Situación Geográfica y Climatológica	28
7	Factores en estudio	31
8	Combinaciones de los respectivos tratamientos	32
9	Análisis estadístico	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Nº	DETALLE
1	Ubicación del experimento
2	Datos experimentales
2.1	Variable Porcentaje de enzima inmovilizada
2.2	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato leche)
2.3	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato cerveza)
2.4	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato carne)
2.5	Variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato leche)
2.6	Variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato cerveza)
2.7	Variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato carne)
2.8	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato leche)
2.9	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato cerveza)
2.10	Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima

inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato carne)

2.11 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato leche)

2.12 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato cerveza)

2.13 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato carne)

3 Método Bradford

4 Fotografías del desarrollo de la investigación

5 Glosario

I. INTRODUCCIÓN.

Hoy en día la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología y específicamente dentro del sector alimentario. Alrededor de un 40% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria agroalimentaria.

Las enzimas son proteínas con actividad biológica que catalizan reacciones bioquímicas, no reaccionan químicamente con las sustancias sobre las que actúan ni alteran el equilibrio de la reacción. Su función consiste sólo en aumentar la velocidad de las reacciones interviniendo como biocatalizadores y actuando donde se precisa su acción y no en más puntos, lo que facilita que no se altere el sustrato. (Roland J, 2005)

En el caso de la elaboración de alimentos intervienen en el desarrollo de una reacción, de forma que sin su existencia ésta es muy complicada o imposible. Estas proteínas se mantienen además inalterables durante mucho tiempo, lo que las hace especialmente interesantes desde el punto de vista industrial, biotecnológico, y la seguridad de los alimentos. (Wiseman A, 2006)

Tradicionalmente se han obtenido pocas enzimas, las cuales han sido de origen animal (lipasa pancreática y tripsina, por ejemplo) las cuales pueden ser remplazadas por otras especies similares derivadas de microorganismos. Sin embargo, los sustitutos microbianos, aunque catalíticamente eficaces, presentan sutiles diferencias en sus propiedades que pueden ser cruciales en el proceso de su aplicación.

Ciertas enzimas están presentes en las frutas, como la papaína extraída de la papaya, la bromelina extraída de la piña, o la ficina extraída del higo; estas enzimas proteolíticas son una alternativa para la utilización en la industria de alimentos, ya sea en la clarificación de bebidas, ablandamiento de carne o en la coagulación de la caseína de la leche.

La inmovilización de enzimas es el proceso en el cual se restringen, parcial o totalmente, los grados de libertad de movimiento de las mismas, mediante la unión o adhesión a un soporte. El uso de enzimas inmovilizadas tiene importantes ventajas para los procesos enzimáticos, como el aumento de la estabilidad de la enzima, la disminución de costos, ya que en muchas ocasiones se pueden reutilizar los derivados enzimáticos, la capacidad de modificar de manera muy específica el alimento, es decir, actúan donde se precisa su acción y no en más puntos y lo hacen a bajas concentraciones, necesitan valores de temperatura y pH muy suaves, lo que permite que no se altere el alimento. Además mejoran la textura, el aroma y el gusto del producto y pueden usarse para la elaboración de nuevos productos. (Taylor R, 2007).

Las técnicas de inmovilización de enzimas han seguido una puesta a punto paralela a la de las células y, de hecho, las enzimas inmovilizadas tienen un papel importante en la aplicación biotecnológica de los procesos agroindustriales.

Para esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Extraer e inmovilizar enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas mediante dos métodos y su aplicación en la industria alimentaria, en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal de Bolívar.
- Determinar el mejor método para la inmovilización de enzimas proteolíticas.
- Establecer los efectos físicos y químicos que producen las enzimas: papaína, ficina y bromelina en alimentos y bebidas.
- Determinar la relación costo-beneficio del mejor tratamiento.

II. MARCO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES SOBRE LAS ENZIMAS.

2.1.1 Enzimas.

Las enzimas son unas sustancias (la mayoría proteicas) que actúan como catalizadores o sea facilitan y aceleran muchísimas reacciones químicas que se producen en nuestro organismo sin que ellas mismas sean cambiadas o destruidas durante esa acción. Se encuentran en todos los tejidos de nuestro organismo.

Las reacciones químicas se realizan en los seres vivos a gran velocidad, en condiciones muy moderadas de temperatura, pH, presión, etc., gracias a la existencia de catalizadores denominados enzimas. Las enzimas se caracterizan por su notable eficiencia y su extraordinaria especificidad. (Wiseman A, 2006)

2.1.2 Perspectiva histórica.

Los orígenes históricos de la tecnología enzimática se remontan al período de 1800-1900, en 1878 se introduce por primera vez el término <<enzima>> y posteriormente se registran los primeros intentos para establecer una nomenclatura sistemática, las cuales condujeron a utilizar el sufijo <<asa>> añadido al nombre del sustrato. Durante esta etapa de investigación se introdujeron también conceptos de especificidad, requerimiento de coenzimas y existencia de enzimas en sistemas libres de células.

Estos hallazgos prepararon el camino tanto para la descripción cinética, realizada por Michaelis y Menten en 1913, como para la preparación, por primera vez, de una enzima pura de forma cristalizada (ureasa), obtenida por Summer en 1926. El significado de estos catalizadores muy específicos y altamente purificados tuvo su manifestación más evidente en el campo de los análisis clínicos y, así, en los años 1930-1940, se asiste a la descripción de una serie de técnicas basadas en ensayos enzimáticos. (Whithaker J, 2009).

2.1.3 Función de las enzimas.

Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas. Además de su importancia como catalizadores biológicos, tienen muchos usos médicos, comerciales e industriales.

La mayoría de las reacciones de los sistemas vivos son reversibles, es decir, que en ellas se establece el equilibrio químico. Por lo tanto, las enzimas aceleran la formación de equilibrio químico, pero no afectan las concentraciones finales del equilibrio. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011).

2.1.4 Nomenclatura de las enzimas.

Cien años atrás solo se conocían enzimas, muchas de estas, catalizaban la hidrólisis de enlaces covalentes. Algunas enzimas, de manera especial las que fueron descubiertas en un principio, recibieron nombres ligados mas bien a su sitio de procedencia anatómica que no siguen ninguna regla ni sistema; tal es el caso de la ptialina de la saliva, que ataca al almidón de la pepsina del estómago y de la tripsina del páncreas, que atacan proteínas; de la renina, que coagula la leche; de la papaína, enzima proteolítica que se encuentra en la papaya y de las catepsinas, también proteasas, que se encuentran en las células. Las enzimas relacionadas con la coagulación de la sangre, como son la trombina, la plasmina, el plasminógeno, etc. reciben también nombres sistematizados.

Al descubrir nuevas enzimas y proceder a su caracterización estricta se aplicaron reglas de nomenclatura basadas en el nombre del sustrato atacado, o en el tipo general de sustrato, o en la reacción catalizada y se ha añadido convencionalmente, la terminación -asa. Por ejemplo: las lipasas (hidrolizan lípidos o grasas), las amilasas (hidrolizan almidón), las proteasas (hidrolizan proteínas), las esterasas (basado en la unión general de tipo éster presentes en muchas sustancias).(Herrera C, Bolaños N, 2010)

2.1.5 Sustratos de las Enzimas.

Constituyen las sustancias que son transformadas específicamente por las enzimas. Se usan para medir la actividad catalítica de las enzimas y, secundariamente, también para determinar el carácter especifico de una acción enzimática. Para que una sustancia sea apropiada como substrato de una enzima debe reunir los siguientes requisitos:

- Que experimente una transformación bien definida por la acción catalítica de la enzima;
- Que sea específica para la enzima respectiva o el grupo muy restringido de enzimas. Ej.: el almidón para las alfa- y beta- amilasas;
- Que según las condiciones del ensayo, previamente fijadas, no sufra una descomposición espontánea o produzca otras reacciones no catalizadas por la enzima;
- Que la transformación del substrato que es catalizada por la enzima. Sea fácilmente medible. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

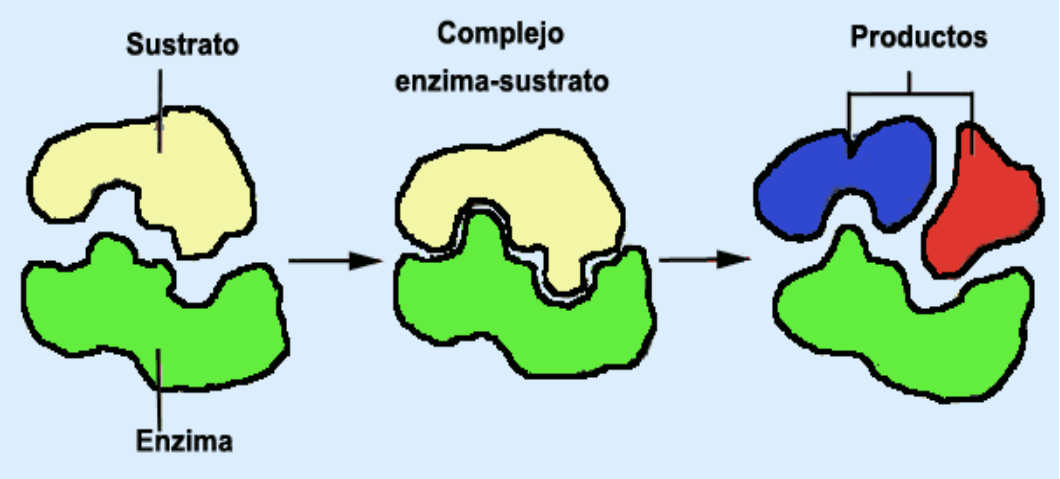
2.1.5.1 Formación de un complejo enzima-sustrato.

Las enzimas controlan las reacciones bioquímicas ofreciendo un entorno tridimensional a los reactivos sobre los que actúan. Toda molécula de enzima posee un sitio, denominado sitio activo, donde tiene lugar su acción catalítica.

El concepto de sitio activo de una enzima corresponde a una depresión o hendidura relativamente pequeña que posee la geometría y distribución de cargas (positivas y negativas) para unirse específicamente y en forma complementaria a un determinado sustrato, (este sitio activo es el lugar donde a través del reconocimiento molecular ocurren las reacciones de ruptura y formación de enlaces) formándose así un complejo enzima-sustrato en el que las moléculas de las sustancias reactantes (sustratos) quedan muy próximas entre sí, condición indispensable para que se lleve a cabo la reacción química de ellas. Por último cabe señalar que, al separarse los productos de la enzima, esta ultima queda libre e

intacta para catalizar la biosíntesis de nuevos productos iguales a los anteriores.(Honda Y., Kako, M., Abiko K. y Sogo Y, 2008)

Figura Nº 1: Formación del complejo enzima-sustrato



Fuente: (García J, 2012)

2.1.6 Propiedades de las enzimas.

Los distintos grupos de enzimas muestran variaciones considerables en su grado de especificidad. Algunas de ellas muestran requerimientos estrictos tanto para el sustrato (o los sustratos si se trata de reacciones bimoleculares) como para el tipo de unión química sobre el que van a actuar; pequeños cambios en cualquiera de ellos bastan para inactivar la reacción; tal es el caso de la mayoría de las enzimas. (Goldstein L, 2006)

2.1.6.1 Catalizadores orgánicos.

Aceleran la velocidad de las reacciones bioquímicas, sin ser alteradas químicamente por la reacción que catalizan. Debido a esto último, las enzimas pueden actuar varias veces y, por lo tanto, resultan efectivas aún en cantidades muy pequeñas. (Goldstein L, 2006)

2.1.6.2 Energía de activación.

Las energías de activación son barreras energéticas para las reacciones químicas, estas barreras son cruciales para la propia vida. Sin tales barreras energéticas, las macromoléculas complejas revertirían espontáneamente a formas moleculares mucho más sencillas. No podrían existir ni las estructuras complejas y altamente ordenadas ni los procesos metabólicos que tienen lugar en cada célula. Las enzimas son moléculas que están para disminuir la energía de activación de las reacciones necesarias para la supervivencia celular. En los laboratorios químicos, también es frecuente que la energía de activación sea proporcionada por el calor.

Cuando se aplica la llama de un mechero al matraz que contiene las sustancias reactantes, las moléculas de estas aceleran sus movimientos, lo que se traduce en un aumento de colisiones moleculares que favorecen las reacciones químicas. En las células vivas, un incremento del calor aceleraría igualmente todas las reacciones metabólicas, pero, muy pronto las proteínas se desnaturalizarían, perderían su funcionalidad y aparecerían otros efectos destructivos. (Goldstein L, 2006)

2.1.6.3 Especificidad.

Cada una de las enzimas cataliza una sola reacción química o en ciertos casos unas pocas reacciones íntimamente relacionadas, por la similitud molecular de los sustratos. (Goldstein L, 2006)

2.1.6.4 Actividad enzimática.

La sustancia sobre la cual actúa una enzima se llama sustrato, los sustratos son específicos para cada enzima. El grado de especificidad de las enzimas es muy alto, pueden distinguir incluso entre diferentes tipos de isómeros. Se cree que la especificidad de la enzima es debido a la forma particular de una pequeña parte conocida como sitio activo, la cual se fija a la contraparte complementaria en el sustrato.

El grado de especificidad de las enzimas es muy alto, pueden distinguir incluso entre diferentes tipos de isómeros. Se cree que la especificidad de la enzima es debido a la forma particular de una pequeña parte conocida como sitio activo, la cual se fija a la contraparte complementaria en el sustrato. (Goldstein L, 2006)

Figura Nº 2: Activación de la actividad de una enzima frente a un sustrato.



Fuente: (http://www2.udec.cl/~lilherna/enzimas.html, 2012)

2.1.6.5 Factores que afectan la actividad enzimática.

- **Concentración del sustrato**.- A mayor concentración del sustrato, a una concentración fija de la enzima se obtiene la velocidad máxima. Después de que se alcanza esta velocidad, un aumento en la concentración del sustrato no tiene efecto en la velocidad de la reacción.
- **Concentración de la enzima**.- Siempre y cuando haya sustrato disponible, un aumento en la concentración de la enzima aumenta la velocidad enzimática hacia cierto límite.
- **Temperatura**.- Un incremento de 10 °C duplica la velocidad de reacción, hasta ciertos límites. El calor es un factor que desnaturaliza las proteínas por lo tanto si la temperatura se eleva demasiado, la enzima pierde su actividad.

- **pH.**- El pH óptimo de la actividad enzimática es 7, excepto las enzimas del estómago cuyo pH óptimo es ácido.
- **Presencia de cofactores**.- Muchas enzimas dependen de los cofactores, sean activadores o coenzimas para funcionar adecuadamente. Para las enzimas que tienen cofactores, la concentración del cofactor debe ser igual o mayor que la concentración de la enzima para obtener una actividad catalítica máxima.
- **Metales pesados**.- Los iones de algunos metales pesados, tales como el plomo (Pb) y el mercurio (Hg), precipitan a las proteínas y, por lo tanto inactivan las enzimas. Normalmente, las enzimas están en suspensión dentro del citoplasma o unidas a una bio membrana. Si los iones de un metal pesado se combinan con una enzima en suspensión, la molécula proteica precipita, perdiendo su eficacia como enzima.(Scouten W, Luong J, Brown, 2005)

2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.

2.2.1 Clasificación de las enzimas de acuerdo a su complejidad.

De acuerdo a su complejidad las enzimas se clasifican como:

- ***Enzimas simples:*** formada por una o más cadenas polipeptídicas.
- ***Enzimas conjugadas:*** contienen por lo menos un grupo no proteico enlazado a la cadena polipeptídica.

En las proteínas conjugadas podemos distinguir dos partes:

- **Cofactor:** cuando se trata de iones o moléculas inorgánicas. (Cofactores). Algunos cofactores entran a formar parte del sitio activo y son integrantes de la proteína enzima (metaloproteínas); otros al parecer, establecen un enlace entre la enzima y el sustrato.
- **Coenzima**: cuando es una molécula orgánica. Aquí se puede señalar, que muchas vitaminas funcionan como coenzimas; y realmente las deficiencias producidas por la falta de vitaminas responde más bien a que no se puede

sintetizar una determinada enzima en el que la vitamina es la coenzima. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2 Clasificación de las enzimas según su actividad.

2.2.2.1 Las oxido-reductasas.

Son las enzimas relacionadas con las oxidaciones y las reducciones biológicas que intervienen de modo fundamental en los procesos de respiración y fermentación. Las oxidoreductasas son importantes a nivel de algunas cadenas metabólicas, como la escisión enzimática de la glucosa, fabricando también el ATP, verdadero almacén de energía. Extrayendo dos átomos de hidrógeno, catalizan las oxidaciones de muchas moléculas orgánicas presentes en el protoplasma; los átomos de hidrógeno tomados del sustrato son cedidos a algún captor. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2.2 Las Transferasas.

Estas enzimas catalizan la transferencia de una parte de la molécula (dadora) a otra (aceptora). Su clasificación se basa en la naturaleza química del sustrato atacado y en la del aceptor. También este grupo de enzimas actúan sobre los sustratos más diversos, transfiriendo grupos metilo, aldehído, glucosilo, amina, sulfató, sulfúrico, etc. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2.3 Las Hidrolasas.

Esta clase de enzimas actúan normalmente sobre las grandes moléculas del protoplasma, como son las de glucógeno, las grasas y las proteínas. La acción catalítica se expresa en la escisión de los enlaces entre átomos de carbono y nitrógeno (C-N) o carbono oxigeno (C-O); Simultáneamente se obtiene la hidrólisis (reacción de un compuesto con el agua) de una molécula de agua.

El hidrógeno y el oxidrilo resultantes de la hidrólisis se unen respectivamente a las dos moléculas obtenidas por la ruptura de los mencionados enlaces. La

clasificación de estas enzimas se realiza en función del tipo de enlace químico sobre el que actúan.

A este grupo pertenecen proteínas muy conocidas: la pepsina, presente en el jugo gástrico, y la tripsina y la quimiotripsina, segregada por el páncreas. Desempeñan un papel esencial en los procesos digestivos, puesto que hidrolizan enlaces pépticos, estéricos y glucosídicos. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2.4 Las isomerasas.

Transforman ciertas sustancias en otras isómeras, es decir, de idéntica formula empírica pero con distinto desarrollo. Son las enzimas que catalizan diversos tipos de isomerización, sea óptica, geométrica, funcional, de posición, etc. Se dividen en varias subclases.

Las racemasas y las epimerasas actúan en la racemización de los aminoácidos y en la epimerización de los azúcares. Las primeras son en realidad pares de enzimas específicas para los dos isómeros y que producen un solo producto común. Las isomerasas cis – trans modifican la configuración geométrica a nivel de un doble ligadura. Las óxido – reductasas intramoleculares catalizan la interconversión de aldosas y cetosas, oxidando un grupo CHOH y reduciendo al mismo tiempo al C = O vecino, como en el caso de la triosa fosfato isomerasa, presente en el proceso de la glucólisis; en otros casos cambian de lugar dobles ligaduras, como en la (tabla) isopentenil fosfato isomerasa, indispensable en el cambio biosinético del escualeno y el colesterol.

Por fin las transferasas intramoleculares (o mutasas) pueden facilitar el traspaso de grupos acilo, o fosforilo de una parte a otra de la molécula, como la lisolecitina acil mutasa que transforma la 2 – lisolecitina en 3 – lisolecitina, etc. Algunas isomerasa actúan realizando inversiones muy complejas, como transformar compuestos aldehídos en compuestos cetona, o viceversa. Estas últimas desarrollan una oxidorreducción dentro de la propia molécula (oxido rreductasa intramoleculares) sobre la que actúan, quitando hidrógeno, a algunos grupos y

reduciendo otros; actúan ampliamente sobre los aminoácidos, los hidroxácidos, hidratos de carbono y sus derivados. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2.5 Las Liasas.

Estas enzimas escinden (raramente construyen) enlaces entre átomos de carbono, o bien entre carbono y oxígeno, carbono y nitrógeno, y carbono y azufre. Los grupos separados de las moléculas que de sustrato son casi el agua, el anhídrido carbónico, y el amoniaco. Algunas liasas actúan sobre compuestos orgánicos fosforados muy tóxicos, escindiéndolos; otros separan el carbono de numerosos sustratos. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.2.2.6 Las Ligasas.

Es un grupo de enzimas que permite la unión de dos moléculas, lo cual sucede simultáneamente a la degradación del ATP, que, en rigor, libera la energía necesaria para llevar a cabo la unión de las primeras. Se trata de un grupo de enzimas muy importantes y recién conocidas, pues antes se pensaba que este efecto se llevaba a cabo por la acción conjunta de dos enzimas, una fosfocinasa y una transferasa.(Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011).

Cuadro Nº 1: Clasificación de las enzimas según su actividad

Grupo	**Acción**	**Ejemplos**
1. Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidorreducción. Tras la acción catálica quedan modificados en su grado de oxidación por lo que debe ser transformados antes de volver a actuar de nuevo.	Dehidrogenasas Aminooxidasa Deaminasas Catalasas
2. Transferasas	Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversiones de azucares, de aminoácidos, etc	Transaldolasas Transcetolasas Transaminasas

3. Hidrolasas	Verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Suele ser de tipo digestivo, por lo que normalmente actúan en primer lugar.	Glucosidasas Lipasas Peptidasas Esterasas Fosfatasas Proteinasas
4. Isomerasas	Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversion	Isomerasas de azúcar Epimerasas Mutasas
5. Liasas	Realizan la degradación o síntesis (entonces se llaman sintetasas) de los enlaces denominados fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.	Aldolasas Decarboxilasas
6. Ligasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes mediante el acoplamiento a sustancias ricas en energía como los nucleosidos del ATP	Carboxilasas Peptidosintetasas

Fuente: (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.3 MÉTODOS GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE ENZIMAS.

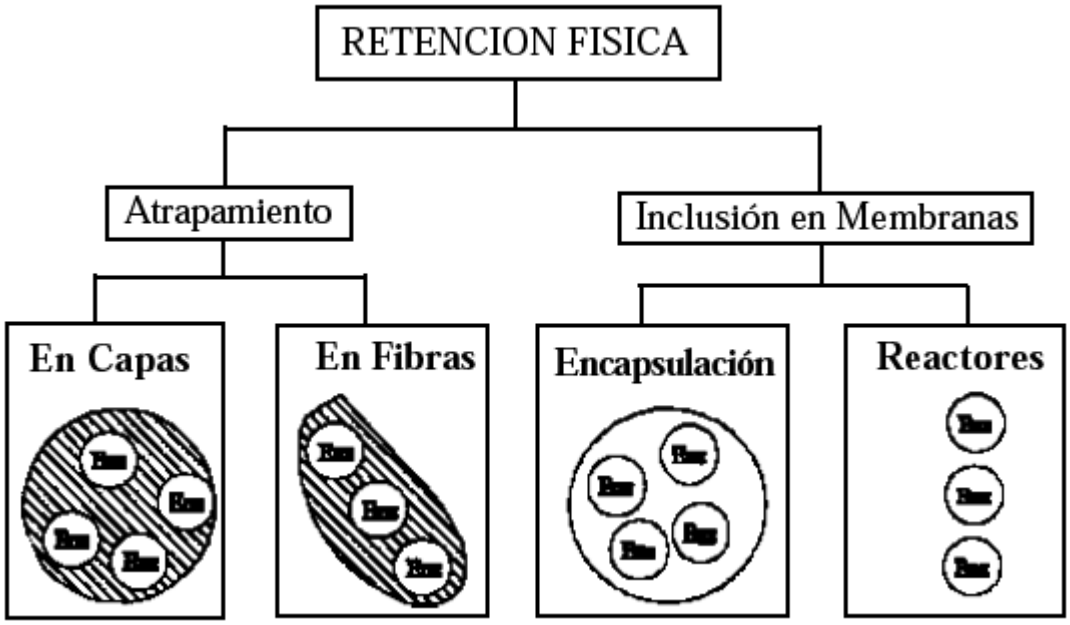
El desarrollo de fuentes para producir enzimas de uso en la industria agro alimentaria, de métodos de aislamiento y purificación y el diseño de reactores enzimáticos, que permiten su aplicación en diversos procesos, ha evolucionado en forma considerable en los últimos años y ha dado origen a un área interdisciplinaria conocida hoy día como "ingeniería enzimática", como nuevo enfoque de la biotecnología. (Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Butterfield D, 2008)

2.4 LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas, células, organelas u y otras especies se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma insoluble en el medio de reacción, en donde se presenta una mayor estabilidad como resultado de este acoplamiento. La inmovilización de enzimas se refiere a enzimas unidas, insolubilizadas, soportadas o ligadas a una matriz, que se caracterizan por varios aspectos positivos. (Arroyo M, 2008)

2.4.1 Métodos de inmovilización de enzimas por retención física.

Figura Nº 3: Métodos de inmovilización mediante retención física.



Fuente: (Arroyo M, 2008)

2.4.1.1 Atrapamiento.

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros foto entrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato

o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico.

El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína. (Arroyo M, 2008).

2.4.1.2 Inclusión en membranas: Dividida en dos tipos:

- **Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. (Klei, H, Sundstrom, D, Shim, D, 2005)

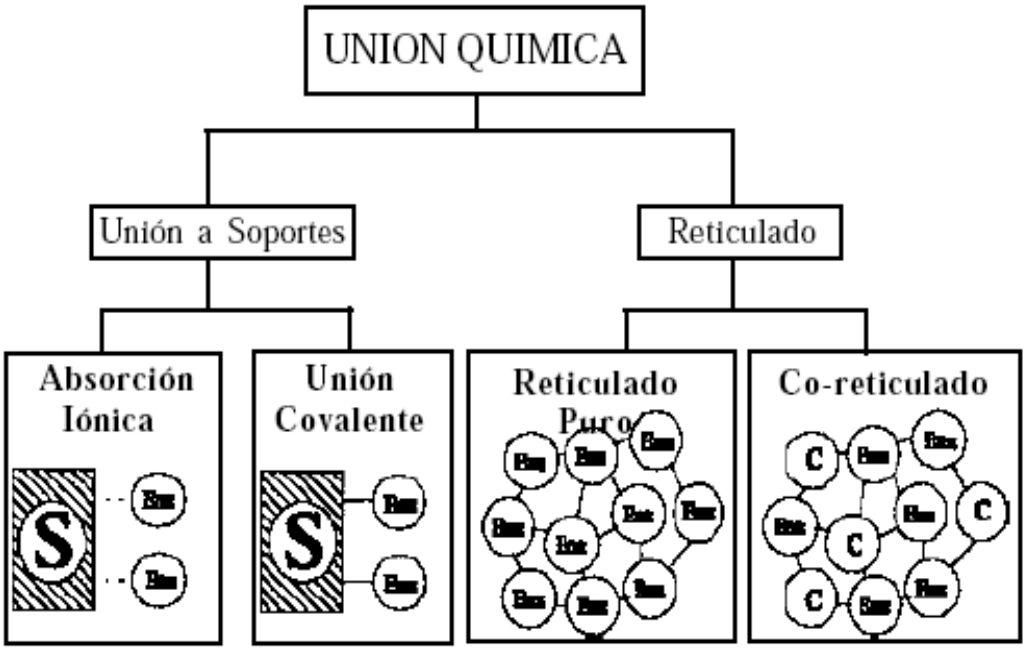
- **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

a. Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana;

b. Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.(Klei, H, Sundstrom, D, Shim, D, 2005)

2.4.2 Métodos de inmovilización de enzimas por unión química.

Figura Nº 4: Método de inmovilización mediante unión química.



Fuente: (**Arroyo M, 2008)**

2.4.2.1 Unión a soportes.

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica

adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado.

Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Lo soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

a. **Soportes inorgánicos:** Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

b. Soportes orgánicos: Se pueden clasificar en:

- Polímeros naturales: a su vez divididos en: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc). proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
- Polímeros sintéticos: divididos en: Poliolefinas (como el poliestireno)
- Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
- Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc). (Arroyo M, 2008).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente.

2.5 PRINCIPALES FUENTES DE ENZIMAS PARA LA INMOVILIZACIÓN.

Las principales fuentes de enzimas usadas en la industria de alimentos son de diferente origen:

- **Vegetal:** Lipasas y pectinoesterasa se elaboran a partir de soya, ricino y frutas cítricas; del germen de trigo se extrae la alfa-amilasa. Las proteasas se obtienen de la papaya, del higo, de la piña y la peroxidasa, del rábano picante.
- **Animal:** La renina, pepsina, tripsina, quimotripsina, catalasa y lipasa pancreática.
- **Microbiano:** Las enzimas de los hongos: Aspergillus flavus, orycae y niger y del Bacillus subtilis han demostrado ser de gran uso en la industria alimentaría. (Lin H, Wang H, Xue C, Ye M, 2008)

2.5.1 Inmovilización de enzimas de origen vegetal.

Si se trata de enzimas de origen vegetal los tejidos deben ser sometidos a trituración o disrupción (rotura). También puede partirse de los jugos de expresión de los respectivos tejidos, cuya estructura celular se destruye por autolisis, plasmolisis o por congelación, la cual revienta las paredes celulares. (Gacesa P, y Hubble J, 2006)

2.6 VENTAJAS DEL USO DE ENZIMAS INMOVILIZADAS.

El uso de enzimas inmovilizadas tiene importantes ventajas para los procesos enzimáticos como son:

- Son térmicamente más estables que las enzimas nativas y más resistentes a la autolisis;
- Al final de una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima enlazada puede separarse por simple centrifugación o filtración, sin necesidad de agregar un reactivo de inactivación o precipitación;
- Una vez recuperada, la enzima enlazada puede volver a usarse las veces que se desea, sin pérdida sustancial de actividad después de un simple lavado con soluciones tampones acuosas y permitiendo realizar así

procesos enzimáticos continuos, disminuyendo los costos. (Gacesa P, y Hubble J, 2006)

2.7 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS.

Las enzimas inmovilizadas tienen aplicación en diversas áreas como el diseño de biosensores, utilizados principalmente en la medicina; control del medio ambiente y de la calidad de los alimentos; asimismo, en la industria médica para la remoción de tejido necrótico en heridas dérmicas, inmovilizadas en forma de apósitos o vendas y en la industria farmacéutica para la fabricación de antibióticos; dentro de la industria alimentaria para la obtención de edulcorantes y aditivos, clarificación de bebidas, ablandamiento de carnes.(Gacesa P, y Hubble J, 2006)

2.7.1 Las enzimas en la cadena agroalimentaria.

Las enzimas se utilizan en la producción de muchos alimentos como el queso o yogur. Su función es transformar sustancias para dar productos atractivos desde el punto de vista gustativo o visual, o para aumentar su conservación.Bien sea en calidad de aditivo para modificar alguna propiedad funcional de un producto o bien como catalizador de un proceso para fabricar un producto derivado de la acción enzimática sobre una cierta materia prima. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.7.2 Procesos agroindustriales que aplican Enzimas.

El incremento del empleo de enzimas en las industrias alimentarias ha tenido, lugar en dos áreas:

- El mejoramiento de los procesos tradicionales
- El desarrollo de caminos totalmente nuevos basados en el estudio de las propiedades de las enzimas. (Schmidt H y Pennacchiotti I, 2011)

2.7.2.1 Industria del almidón y del azúcar.

Dependiendo de las enzimas utilizadas, a partir del almidón se pueden obtener jarabes de diferente composición y propiedades físicas. Los jarabes se utilizan en una variedad de alimentos tales como gaseosas, dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas, etc.(Carrera J, 2006)

2.7.2.2 Productos Lácteos.

La aplicación de enzimas en el procesamiento de leche está bien establecida, por el uso del cuajo (quimosina) en la producción de queso, que tal vez representa el empleo más antiguo de enzimas en alimentos. Otras enzimas que participan en la producción de quesos son las lipasas presentes en la leche, las cuales hidrolizan el componente graso, proporcionando cambios característicos en el sabor. Para algunos quesos se pueden aumentar las lipasas naturales, añadiendo enzima extra.

Por otra parte, también se recomienda agregar enzimas exógenas de tipo proteolítico para acelerar el proceso de maduración de algunos quesos. (Carrera J, 2006).

2.7.2.3 Molineros y Panadería.

El uso de enzimas en estas industrias se debe principalmente a la deficiencia en el trigo y en la harina, de las enzimas naturalmente presentes. El contenido de a amilasa de la harina depende de las condiciones de crecimiento y de cosecha. En climas húmedos la tendencia será a tener alta actividad de a amilasa debido a germinación de los granos, en tanto que en climas secos el nivel de a amilasa será bajo debido a escasa germinación. Esto conlleva a grandes diferencias en el contenido de amilasa de diferentes lotes de harina. (Carrera J, 2006).

2.7.2.4 Productoras de Jugos de Frutas.

Las primeras enzimas empleadas en las industrias de jugos de frutas fueron las enzimas pécticas para la clarificación del jugo de manzana. Actualmente las enzimas pécticas se usan en el procesamiento de muchas otras frutas, junto con amilasas y celulasas. (Carrera J, 2006).

Durante el procesamiento de los jugos cuando se desintegran los tejidos vegetales, parte de la pectina, que es un componente estructural de las frutas, pasa a la solución, parte se satura con el jugo y parte permanece en las paredes celulares. Las enzimas pécticas se usan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación ayudando a la separación del precipitado floculento. (Illanes A, 2009).

2.7.2.5 Procesamiento de Carne.

Las enzimas importantes para ablandar carne son proteasas de origen vegetal o de microorganismos (Bacillus subtilis y Aspergillus oryzae). Las enzimas se inyectan antes del sacrificio al animal o se trata la carne con las enzimas antes de cocerla, con lo que se logra un franco ablandamiento sin provocar una proteólisis importante. (Cabra J y Sánchez M, 2007).

2.7.2.6 Industria Cervecera.

La cebada se utiliza tradicionalmente para la fabricación de bebidas alcohólicas como la cerveza. En su producción se deben considerar dos operaciones distintas: la maltería y la cervecería.

La preparación de la malta se logra por germinación de la cebada, durante la cual se incrementa el contenido de amilasa. Las α–enzimas y β amilasas naturalmente presentes en el grano actúan sobre el almidón produciendo dextrinas y maltosa, que sirven como sustratos para la fermentación posterior. Las proteasas degradan

proteínas formando aminoácidos y péptidos. Hay muchas enzimas disponibles comercialmente para el proceso cervecero, pero todas ellas caen en tres categorías: proteasas, amilasas y glucanasas. La acción de estas enzimas durante las primeras etapas consiste en mejorar la licuefacción del almidón, regular el contenido de azúcar y nitrógeno, mejorar la extracción, facilitar la filtración y controlar la turbidez.

En la filtración del mosto reducción de las gomas y de la viscosidad. En la ebullición, control de la turbidez, eliminación final del almidón. En esta etapa se inactivan las enzimas. Durante la fermentación y maduración la adición de enzimas sirve para controlar la turbidez adicionando una proporción entre 1-1,5g de enzima por cada hecto litro de cerveza. (Carrera J, 2006)

2.7.2.7 Industrias de Grasas y Aceites.

El uso de enzimas en las industrias de aceites y grasas es muy bajo, aunque se encuentran disponibles enzimas que pueden resolver algunos problemas, por ejemplo minimizar los subproductos indeseables. Las enzimas también se pueden usar para producir aceites y grasas novedosas.

Lipasas específicas, pueden seleccionar los ácidos grasos de algunas posiciones del triglicérido, para incorporar determinados ácidos grasos, sin cambiar los de otras posiciones. De tal manera que es posible modificar por interesterificación el contenido de ácidos grasos, o por transesterificación lograr el re arreglo de algunos de ellos. (Illanes A, 2009).

Por ejemplo la mantequilla de cacao se requiere en la producción de chocolate y con frecuencia la disponibilidad y el costo fluctúan ampliamente. Sin embargo, aceites como el de palma son baratos y se encuentra buen abastecimiento. Lo que se plantea es modificar el aceite de palma por reacción con ácido esteárico mediante interesterificación enzimática. La grasa resultante tiene propiedades similares a la mantequilla de cacao. (Tucker G. y Woods L, 2010)

2.7.2.8 Industrias de Pulpa y Papel.

La mayoría de las fabricas de pulpa y papel cierran pos periodos prolongados, una o dos veces al año. Durante estos periodos se llevan a cabo los programas de mantenimiento de la planta. Uno de los sistemas que se ve severamente impactado debido a estos cierres temporales es la planta de tratamiento de aguas residuales. Durante estos cierres el alimento llega en cantidad insuficiente para mantener la biomasa requerida en condiciones normales, La población bacteriana se encuentra generalmente disminuida a una fracción de lo que es necesario para la producción de un efluente de alta calidad. (Izquierdo y G. De la Riva, 2009)

2.7.3 Aplicación de las Enzimas en el Tratamiento de Desechos.

Mezcla pulverizada de organismos selectivamente adaptados, con enzimas crudas y emulsionantes específicamente ideados para licuar, digerir y desodorizar desechos procedentes de la actividad en las empresas agroindustriales. (Cabra J y Sánchez M, 2007).

Sustancia creada con la más avanzada tecnología, que consiste en una mezcla sinérgica concentrada de determinadas enzimas, dependiendo la procedencia de los desechos las cuales descomponen la materia orgánica con presencia de almidón, grasas, proteínas y celulosa. (Godfrey T y Reichelt J, 2011).

2.8 LA PAPAYA.

La papaya cuyo nombre científico es Carica papaya, pertenece a la familia de las Caricáceas, es originaría de las zonas tropicales de México y Centro América. Este fruto por su alto valor nutritivo y propiedades medicinales posee características que han contribuido a incrementar su cultivo. La papaya se consume principalmente como fruta, además se usa para preparar refrescos, jugos, encurtidos, mermelada, fruta en almíbar o cristalizada. También produce látex que

se extrae de los frutos verdes y tallo, el cual contiene una enzima que favorece la digestión de las proteínas. (Pestano B, 2005)

Cuadro Nº 2: Composición nutricional por cada 100 g de papaya.

NUTRIENTE	POR CADA 100g
Agua	88,06
Proteínas	0,47
Lípidos	0,26
Ceniza	0,39
Hidratos de Carbono	10,82

Fuente: (http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/papaya/)

2.8.1 La papaína.

La papaína es una enzima que se extrae del fruto llamado papaya y es este familia de las papaina que según el tipo de tejidos se encuentran relacionadas. Desde poder antiinflamatorio hasta distintas aplicaciones en procesos industriales se cuentan entre las propiedades de la papaína y que permite utilizar el fruto en distintas dolencias como un medicamento natural. Ésta se desnaturaliza con un pH de 8 y su temperatura debe de ser de 37 ºC.

La papaína es una enzima similar a la pepsina humana. El crecimiento del negocio relacionado con ella ha sido tal en los últimos años que el mercado mundial se calcula en unos cien millones de dólares anuales, de los cuales el 70 % pertenece a las industrias relacionadas con la alimentación.(Carrera J, 2006).

La papaína se consigue por la extracción del látex, que es un líquido blanco obtenido mediante cortes en los frutos inmaduros. Luego, en el laboratorio se separa la enzima y se purifica hasta alcanzar un nivel óptimo de calidad para la

comercialización y uso. La enzima se usa en estado líquido y tiene una duración máxima de seis meses estando refrigerada. (Lin H, Wang H, Xue C, Ye M, 2008)

2.8.2 Aplicaciones industriales de la papaína.

Los principales usos de la papaína se encuentran dentro del sector alimentario, como clarificador de bebidas (cervezas y jugos) y como mejorador de las carnes, (ablandamiento y aclaramiento); también es usada en la producción de quesos para obtener productos de mejor calidad y más cremosos, y en los cereales para enriquecer su contenido proteico.

En la industria del cuero es utilizada para refinar este material tanto en apariencia como en textura y en el proceso de remoción de pelo; en la industria textil se usa para desengomar las fibras de seda y mejorar la calidad de los colorantes usados; se utiliza para recuperar la plata de las películas fotográficas gastadas en los laboratorios, en la industria cosmética para la elaboración de cremas desmanchadoras de la piel y exfoliantes que actúan disolviendo las capas más externas de la dermis; también es utilizada por los laboratorios oftalmológicos para producir tabletas enzimáticas para la limpieza de lentes de contacto. (Barbosa C, Morais H, Delvivo F, Mansur H, Oliveira M, Silvestre M, 2005).

2.9 HIGO.

El higo árbol perteneciente a la familia de las Moráceas. Su tronco, que contiene un látex, mide de tres a nueve metros de alto y tiene un diámetro aproximado de 17.5 cm., del cual se extienden numerosas ramas a su alrededor. Sus hojas son palmeadas de color verde oscuro y ásperas al tacto. Es una especie dioica, con flores pequeñas y propias de la época de lluvias. (FAO, 2013).

Cuadro Nº 3: Composición nutricional por cada 100 g de higo.

NUTRIENTE	POR CADA 100g
Agua	80
Proteínas	0,75
Lípidos	0,3
Ceniza	0,6
Hidratos de Carbono	12-16

Fuente: (http://sotelo-ficus.blogspot.com/p/valor-nutricional-del-higo-100gr.html)

2.9.1 Ficina.

Es una cisteín proteasa como la papaína. Se obtiene del latex de las plantas del género Ficus. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango 5-8. La temperatura óptima está alrededor de 60 ^{o}C, inactivándose completamente a 80 ^{o}C. (Barbosa C, Morais H, Delvivo F, Mansur H, Oliveira M, Silvestre M, 2005)

2.9.2 Aplicaciones industriales de la ficina.

Hidroliza péptidos, amidas y ésteres, y ha sido también denominada "pepsina vegetal". A diferencia de la pepsina, actúa tanto en medio ácido como en medio neutro o alcalino. Se ha utilizado en la digestión de proteínas, para el ablandamiento de carnes y en la fabricación de quesos. (Barbosa C, Morais H, Delvivo F, Mansur H, Oliveira M, Silvestre M, 2005)

2.10 PIÑA.

La piña o ananá (Ananas comosus) es una planta de la familia de las bromeliáceas. Es una hierba perenne, de escaso porte y hojas duras y lanceoladas de hasta 1 m de largo, que fructifica una vez cada tres años produciendo un único fruto fragante y dulce, muy apreciado en gastronomía. Se trata de un fruto compuesto (formado por la unión de los frutos de varias flores alrededor de un eje carnoso), de gran

tamaño, con cáscara gruesa y dura, con escamas de color marrón y que tiene en uno de sus extremos un conjunto muy vistoso de hojas verdes. Su pulpa es amarillenta, aromática y dulce contintes ácidos.
(http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/pina.pdf, 2013).

Cuadro Nº 4: Composición nutricional por cada 100 g de piña.

NUTRIENTE	POR CADA 100g
Agua	86
Proteínas	0,54
Lípidos	0,12
Ceniza	0,22
Hidratos de Carbono	13,12

Fuente: (http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional de/pina/)

2.10.1 Bromelina.

Se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña *(Ananas comosus)*. Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. (Carrera J, 2006).

2.10.2 Aplicaciones industriales de la bromelina.

La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento. (Carrera J, 2006).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ubicado en el sector del Laguacoto II de la Universidad Estatal de Bolívar.

3.2 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

Cuadro Nº 5: Ubicación del experimento.

UBICACIÓN	**LOCALIDAD**
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector	Laguacoto 1I

Fuente: (Estación Meteorológica. Universidad Estatal de Bolívar. Laguacoto II, 2012)

3.3 SITUACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMÁTICA.

Cuadro Nº 6: Situación Geográfica y Climatológica.

PARAMETRO	**VALOR**
Altitud	2800msnm
Latitud	01°34'15" sur
Longitud	79°0'02"oeste
Temperatura mínima	8°C
Temperatura media anual	13°C
Temperatura máxima	18°C
Humedad	75%

Fuente: (Estación Meteorológica. Universidad Estatal de Bolívar. Laguacoto II, 2012).

3.4 ZONA DE VIDA.

El sitio corresponde a la formación de bosque húmedo montano bajo (Bhmb), según lo señala Holdrigge.

3.5 MATERIALES.

3.5.1 MATERIAL EXPERIMENTAL.

- Frutas (papaya, higo, piña).
- Alginato de Sodio
- Agar-Agar

3.5.2 MATERIALES DE OFICINA.

- Computadora
- Flash memory
- Impresora
- Papel de impresión
- Esferográficos
- Escritorio
- Sillas

3.5.3 MATERIALES DE CAMPO.

- Libreta de apuntes
- Cámara fotográfica digital
- Marcadores
- Libreta de apuntes
- Cámara fotográfica digital

3.5.4 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Espectrofotómetro Génesis 10 UV
- Turbidímetro
- Estufa
- Destilador de agua
- Termostato
- Planchas térmicas con agitación
- Balanza analítica
- Baño maría

3.5.4.5 MATERIALES DE LABORATORIO.

- Pipetas de 0.1 ml. – 10 ml
- Agujas Hipodérmicas descartables de 20 ml
- Vasos de precipitación
- Picetas
- Varillas de agitación de vidrio
- Papel filtro
- Tubos de ensayo pyrex
- Gradillas
- Espátula
- Crisol con mortero de porcelana
- Cajas petri
- Celdas para el espectofotómetro

3.5.5 REACTIVOS.

- Cloruro de Calcio (Ca_2Cl 0,5 M)
- Agua destilada
- Aceite vegetal

- Azul de cromassie (reactivo para determinación de proteína por el método Bradford)
- Ácido fosfórico (H_2PO_4)
- Etanol

3.6 FACTORES EN ESTUDIO.

Cuadro Nº 7: Factores en estudio

FACTOR	CÓDIGO	NIVELES
Soportes para la inmovilización	A	A_1 = agar 1,5 % A_2 = agar 3,5 % A_3 = alginato 1,5 % A_4 = alginato 3,5 %
Enzimas proteolíticas	B	B_1 = Papaína B_2 = Ficina B_3 = Bromelina

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

3.6.1 CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO.

- Unidad experimental = 1 Kg de alimento
- Factores de estudio = 2
- Tratamientos= 12
- Repeticiones= 3
- Unidades experimentales = 36

3.6.2 DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO.

Cuadro Nº 8: Combinaciones de los respectivos tratamientos.

Nro. Tratamiento	Código	DESCRIPCION O DETALLE
1	A_1B_1	Agar 1,5% + Papaína
2	A_1B_2	Agar 1,5% + Ficina
3	A_1B_3	Agar 1,5% + Bromelina
4	A_2B_1	Agar 3,5% + Papaína
5	A_2B_2	Agar 3,5% + Ficina
6	A_2B_3	Agar 3,5% + Bromelina
7	A_3B_1	Alginato 1,5% + Papaína
8	A_3B_2	Alginato 1,5% + Ficina
9	A_3B_3	Alginato 1,5% + Bromelina
10	A_4B_1	Alginato 3,5% + Papaína
11	A_4B_2	Alginato 3,5% + Ficina
12	A_4B_3	Alginato 3,5% + Bromelina

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

3.6.3 TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.

En la presente investigación se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) de A * B con 3 repeticiones.

Para el cual corresponde el siguiente modelo matemático:

$$Yij = \mu + \tau i + \beta j + \varepsilon ij \qquad i=1,2,...,t \quad j=1,2,...,r$$

Donde:

μ = Parámetro, efecto medio

τ i = Parámetro, efecto del tratamiento I

β j = Parámetro, efecto del bloque j

εij= valor aleatorio, error experimental de la u.e. i,j

Yij = Observación en la unidad experimental

3.6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para establecer las diferencias entre los tratamientos se aplicó el análisis de varianza (ADEVA)

Cuadro Nº 9: Análisis estadístico

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	11
Tratamientos	1
Error	10

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

- Esquema de Análisis de Varianza.
- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos A, B y la interacción AxB.
- Análisis Económico en la relación Costo/ Beneficio.

Los datos obtenidos fueron procesados en los programas informáticos: STATGRAPHICS, STATISTIX9, Microsoft Excel 2010.

3.7 MEDICIONES EXPERIMENTALES.

3.7.1 EN LA MATERIA PRIMA.

3.7.1.1 Potencial de hidrógeno

Se determinó el potencial de hidrógeno (pH) según la NTE INEN 0389:86

3.7.1.2 Grados Brix

Se determinó el contenido de sólidos solubles según la NTE INEN 0389:86

3.7.1.3 Estado de madurez

Se determinó el estado de madurez por inspección visual según las matrices para determinar el estado de madurez de las frutas.

3.7.2 EN EL PRODUCTO TERMINADO

3.7.2.1 Porcentaje de la enzima inmovilizada.

- Se realizó por medio de un análisis de proteína por el método de Bradford tanto de la solución original de enzima y en la solución endurecedora al final del proceso de inmovilización, calculando el porcentaje de la diferencia entre la cantidad de la proteína atrapada en el soporte y la cantidad de la proteína de la solución original.

$$\%\ Enzima\ inmovilizada = \frac{proteína\ atrapada}{proteína\ inicial}\ x\ 100$$

3.7.2.2 Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada.

Se determinó la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada por medio de su actividad en los siguientes sustratos (aplicación en la industria alimentaria):

- En la coagulación de la leche con un posterior análisis de proteínas por el método de Bradford.
- En la clarificación de bebidas, con el respectivo análisis de turbidez.
- En el ablandamiento de la carne, partiendo del principio que las enzimas hidrolasas rompen los enlaces polipeptídicos de las proteínas en este caso (la actina), con el análisis de proteína antes y después de aplicar las enzimas inmovilizadas

3.7.2.3 Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada.

- Se realizaron cinco corridas experimentales, tomando en cuenta a la corrida inicial como el 100%.

3.7.2.4 Porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento.

- Se determinó la estabilidad de la enzima al almacenamiento al medir la actividad proteolítica de las enzimas a los días 0, 15, 30, las mismas que fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4 ºC) en agua destilada.

3.7.2.5 Determinación de la relación costo beneficio.

- Se realizó un análisis para llegar a determinar la relación costo-beneficio del mejor tratamiento determinado en la investigación.

3.8 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

3.8.1 RECEPCIÓN.

La materia prima se receptó procedente de los mercados del cantón Guaranda.

3.8.2 INSPECCIÓN.

Se inspeccionó que la materia prima se encuentre en un nivel de inmadurez apropiado para la investigación (entre el 25-50% antes de alcanzar la madurez fisiológica), limpias, enteras, sin daños físicos ni biológicos.

3.8.3 LAVADO.

Esta operación se realizó con el fin de eliminar impurezas presentes en las frutas y disminuir la carga microbiana.

3.8.4 SELECCIÓN.

Se realizó la selección de la materia prima para trabajar con frutas en estado óptimo para el desarrollo de ésta investigación.

3.8.5 ANÁLISIS.

Se realizó los análisis determinados para la materia prima (índice de madurez, pH, ºBrix) con el fin de trabajar con las frutas que no presenten un estado de madurez fisiológico óptimo.

3.8.6 EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PRESENTE EN LAS FRUTAS.

3.8.6.1 Papaya.

- Con un visturí se realizó varias incisiones repetidamente a intervalos de tiempo, 30 minutos, hasta que la aparición del látex comience a disminuir.
- Todas las incisiones se realizó verticalmente y no más de 4 sangrías a un fruto al mismo tiempo, de 1 a 2 mm de espesor cada incisión.
- El látex se recogió en una caja petri

3.8.6.2 Higo.

- Con un visturí se realizó varias incisiones repetidamente a intervalos de tiempo, 30 minutos, hasta que la aparición del látex comience a disminuir.
- Todas las incisiones se realizó verticalmente y no más de 4 sangrías a un fruto al mismo tiempo, de 1 a 2 mm de espesor cada incisión.
- El látex se recogió en una caja petri.

3.8.6.3 Piña.

- En un motero se trituró la piña (pulpa y cáscara), hasta obtener el jugo el cual se maceró por cinco días, luego filtró en una gasa y el jugo se colocó en una caja petri.

3.8.7 SECADO DE LA ENZIMA PRESENTE EN LAS FRUTAS.

Las cajas petri que contienen las enzimas presentes en las frutas, fueron colocadas en una estufa a 40 ºC, ya que las enzimas son proteínas y una elevada temperatura puede desnaturalizarlas.

- El secado se realizó hasta obtener un peso constante.

3.8.8 PREPARACIÓN.

3.8.8.1 Suspensión de enzimas.

Se preparó la suspensión de enzimas de la siguiente manera:

- Mezclando 1mg de enzima seca por cada 1ml de agua destilada.

3.8.8.2 Soportes para la inmovilización de las enzimas.

3.8.8.2.1 Agar-agar.

- Se preparó una disolución de agar-agar en una concentración de 1,5 y 3,5% (m/v) en agua destilada a una temperatura de 85 ºC y una revolución de 125 rpm, hasta lograr la dilución.
- Se mantuvo la disolución de agar-agar a 40 ºC para mantenerlo licuado.

3.8.8.2.2 Alginato.

- Se preparó la disolución de alginato de sodio en una concentración de 1,5 y 3,5 % (m/v) en agua destilada, a una temperatura de 80 ºC y una revolución de 125 rpm, hasta lograr la dilución del alginato.

3.8.9 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

3.8.9.1 Atrapamiento en gel.

Se aplicó el método de la siguiente manera:

- Se mezcló la suspensión de enzimas con la solución de agar-agar licuado en la misma proporción es decir; 1ml de la suspensión de enzimas con 1ml de la solución de soporte (agar-agar).
- Se pasó la mezcla por una aguja hipodérmica de 20 ml y se dejó caer gota a gota toda la mezcla con agitación constante en un vaso de precipitación con aceite vegetal previamente refrigerado a 4 ºC por media hora.
- De esta manera se consiguió formar gotas de gel quedando la enzima adherida por unión física al soporte, las cuales se lavaron tres veces en agua destilada con movimientos rotatorios suaves para eliminar el aceite de la superficie.

3.8.9.2 Unión a un soporte.

Se aplicó el método de la siguiente manera:

- Se mezcló la suspensión de enzimas con la solución de alginato de sodio en la misma proporción es decir; 1ml de la suspensión enzimática con 1ml de la solución.
- Se pasó la mezcla por una aguja hipodérmica de 20 ml y se dejó caer gota a gota toda la mezcla en un vaso de precipitación con Cloruro de Calcio ($CaCl_2$ 0,5 M) introducido en un recipiente de agua con hielo con agitación constante.

- De esta manera reaccionó el Alginato de Sodio con el Cloruro de Calcio, quedando la enzima atrapada en el soporte por adsorción iónica formando partículas esféricas de gel de Alginato de Calcio.

3.8.10 APLICACIÓN DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS EN ALIMENTOS.

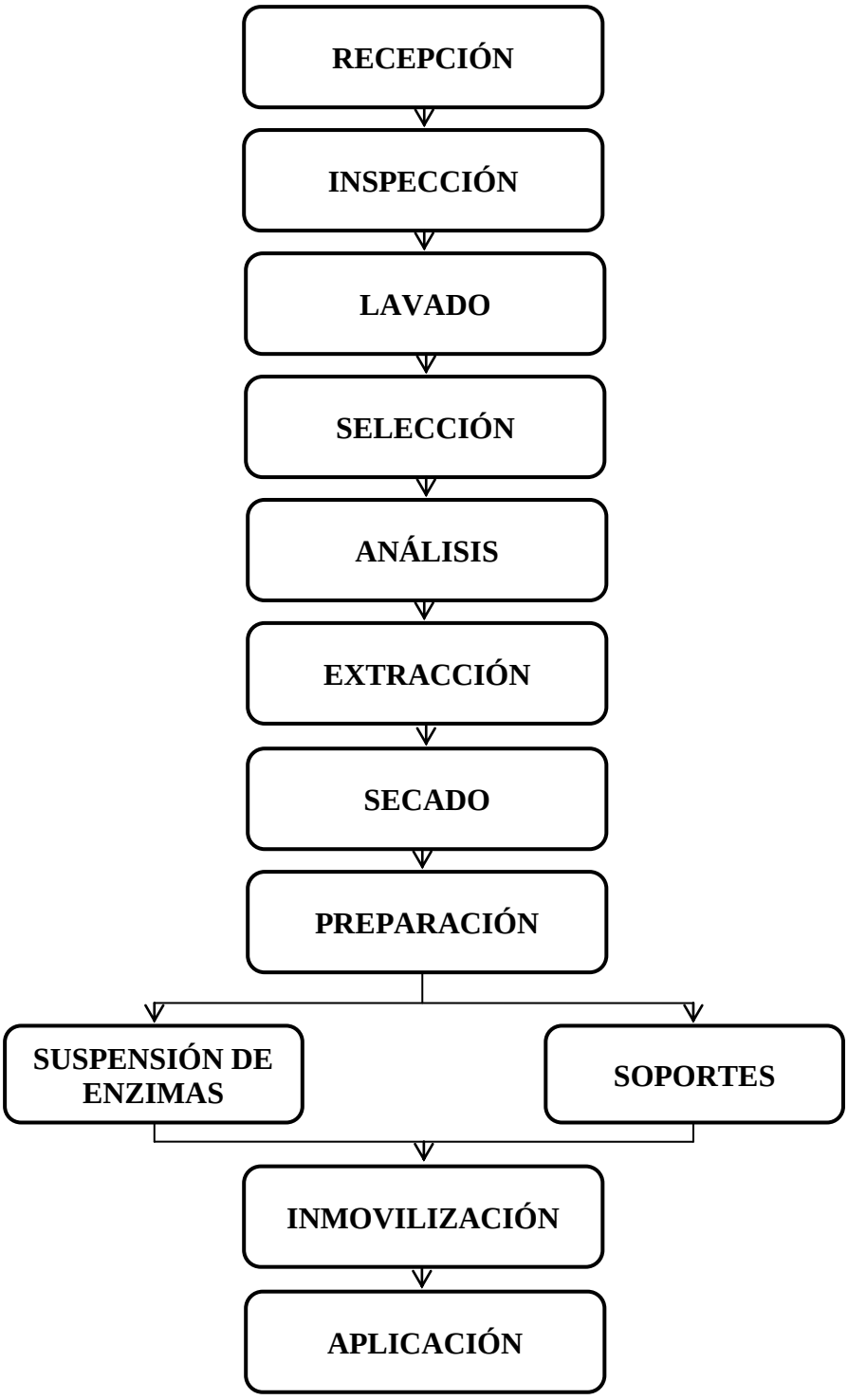
Se aplicó la enzima inmovilizada a los alimentos, evaluando su actividad proteolítica en los siguientes sustratos:

- En la leche, realizando un análisis de proteína por el método de Bradford, tanto antes como después de aplicar las enzimas inmovilizadas al sustrato.

- En bebidas alcohólicas (cerveza), realizando un análisis de turbidez, tanto antes como después de aplicar las enzimas inmovilizadas al sustrato.

- En la carne, realizando un análisis de proteína por el método de Bradford, tanto antes como después de aplicar las enzimas inmovilizadas al sustrato.

3.9 DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 MEDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MATERIA PRIMA

Se realizaron las mediciones en la materia prima con la finalidad de conocer las características de las mismas y su influencia en el producto terminado.

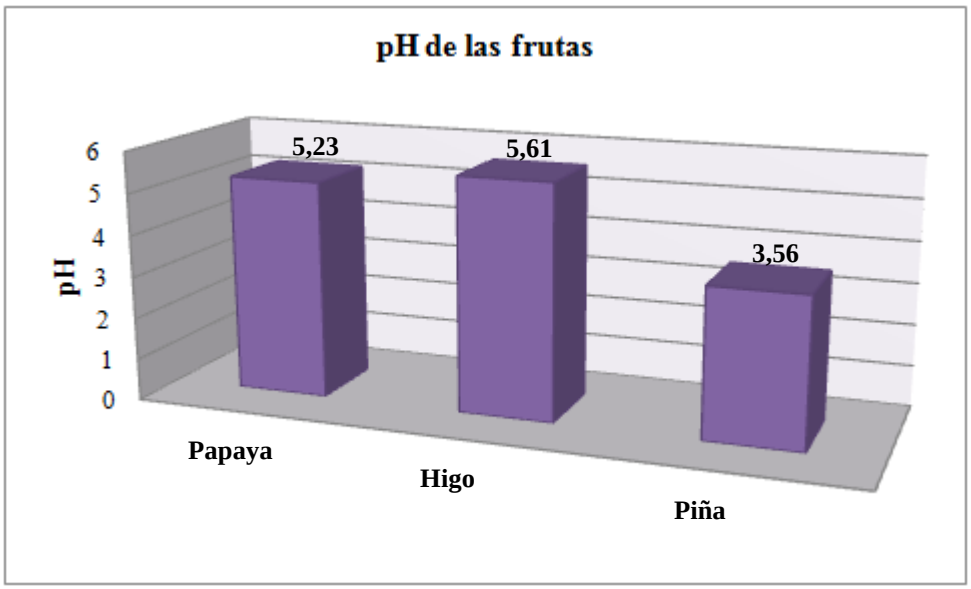
4.1.1 Potencial de hidrógeno

TABLA Nº 1: Potencial de hidrógeno de la materia prima.

Fruta	pH
Papaya	5,23
Higo	5,61
Piña	3,56

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 1: Potencial de hidrógeno de la materia prima.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013

Análisis y discusión

Podemos apreciar el potencial de hidrógeno de la materia prima (frutas) de las cuales se extrajo las enzimas, registrándose a la piña como la fruta más ácida con un pH de 3,56, mientras tanto la paya y el higo con un pH de 5,23 y 5,61 respectivamente, estos datos nos permiten conocer las frutas estaban en un estado de madurez óptimo para la investigación, considerándose inmaduras, ya que conforme avanza la madurez fisiológica de las frutas, la concentración de los ácidos orgánicos se reduce, es decir se acerca más a un pH neutro.

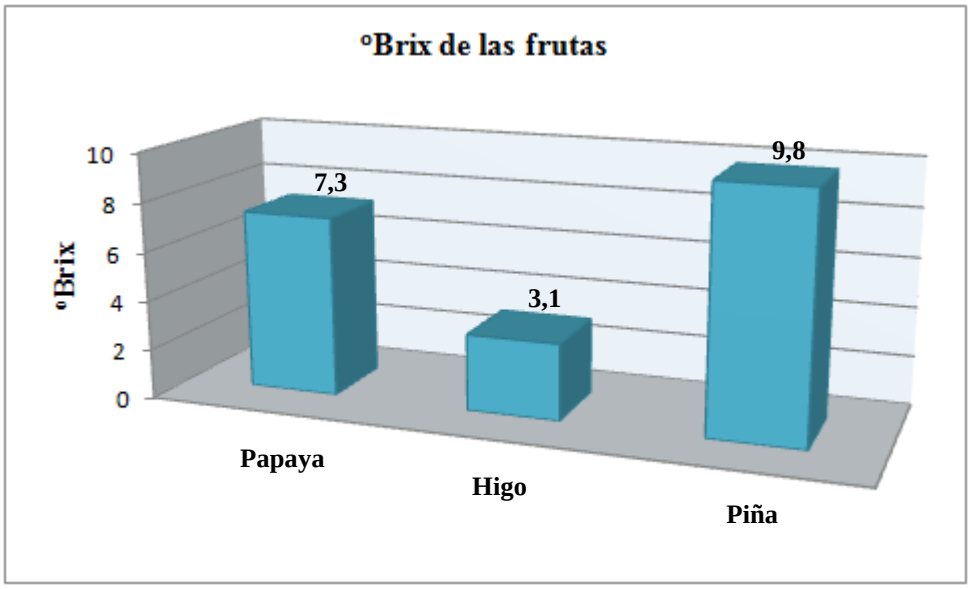
4.1.2 Grados Brix

TABLA Nº 2: Grados Brix de la materia prima.

Fruta	º Brix
Papaya	7,3
Higo	3,1
Piña	9,8

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 2: Grados Brix de la materia prima.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Análisis y discusión

Se determinó la concentración de azúcares de la materia prima (frutas) empleada en la investigación, diferenciándose al higo con menor concentración 3,1 ºBrix, mientras que a la papaya le corresponde 7,3 ºBrix, rangos que indican que estas frutas se encuentran en estado fisiológico tierno (inmadura), y a la piña 9,8 ºBrix acercándose a la madurez fisiológica, ya que conforme avanza el proceso de maduración, el almidón presente en las frutas se convierte en azúcares lo que incrementa la concentración de sólidos solubles alcanzando como mínimo 12 ºBrix y, reduce la concentración de enzimas proteolíticas.

4.1.3. Estado de madurez

TABLA Nº 3: Estado de madurez de la materia prima.

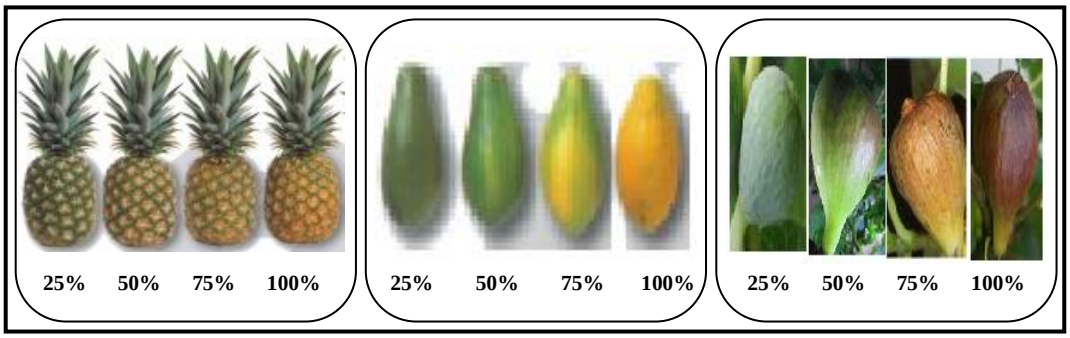
Fruta	Estado de madurez
Papaya	25% (tierna)
Higo	25% (tierna)
Piña	50% (semi madura)

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Análisis y discusión

Después de realizar la inspección visual y comparar en escalas de coloración de la matriz para determinar la madurez de las frutas por inspección visual, se reportó en la tabla Nº 3 el estado de madurez de la materia prima, donde se puede apreciar que la papaya y el higo presentaron un estado de madurez inferior a la piña, lo cual se corroboró con los datos obtenidos de los análisis de pH y ºBrix.

FIGURA Nº 5: Matrices para determinar el estado de madurez de las frutas por inspección visual.



4.2 ANÁLISIS EN EL PRODUCTO TERMINADO (ENZIMAS INMOVILIZADAS)

Las enzimas inmovilizadas (restringidas el movimiento), son consideradas como el producto final de la investigación el cual se aplicó en tres tipos de sustratos (leche, carne, cerveza), para medir las variables de respuesta detalladas a continuación.

4.2.1 Porcentaje de la enzima inmovilizada.

TABLA Nº 4: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	2	4965,08	2482,54	943,76	0,0000 **
Factor B	2	33,51	16,75	6,37	0,0071 **
Interacción A*B	4	158,64	39,66	14,91	0,0000 **
Repeticiones	2	4,32	2,16	0,82	0,4575 NS
Error	16	42,06	2,63		
Total	26	5203,61			
CV%	2,02				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativo

NS = No significativa

Según el análisis de varianza para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada, se demuestra que tanto el factor A, factor B y la interacción AxB tienen un nivel de significancia altamente significativo, lo que nos indica que el tipo de enzima, el soporte y la concentración del mismo tienen gran influencia en el porcentaje de enzima inmovilizada, ya que a una mayor concentración de soporte este formará geles más sólidos en donde se quedará atrapada la enzima y evitándose que esta pase por la membrana a la sustancia endurecedora.

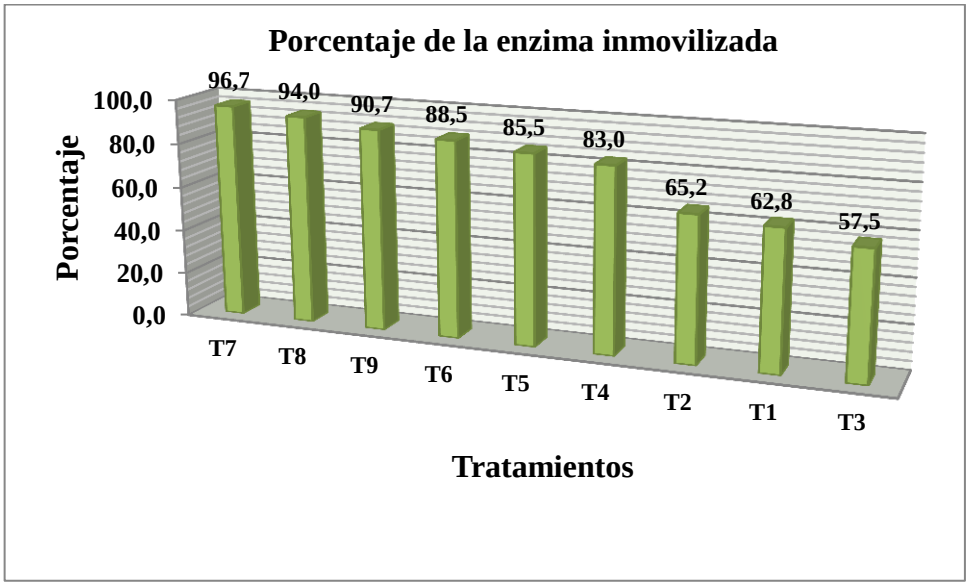
El análisis de varianza para el porcentaje de la enzima inmovilizada tuvo un coeficiente de variación de 2,02%, que nos indica que los elementos o material experimental fueron uniformes y que se tuvo control sobre ellos, lo cual es lógico al ser realizada la investigación en un ambiente controlado a escala de laboratorio donde se pueden controlar: pesos, temperaturas y tiempos.

TABLA Nº 5: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).

TRAT.	CÓDIGO	$\overline{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
7	A_4B_1	96,667	A
8	A_1B_2	94,037	AB
9	A_4B_3	90,743	BC
6	A_3B_3	88,500	CD
5	A_3B_2	85,453	DE
4	A_3B_1	82,960	E
2	A_2B_2	65,220	F
1	A_2B_1	62,800	F
3	A_2B_3	57,517	G

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 3: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).

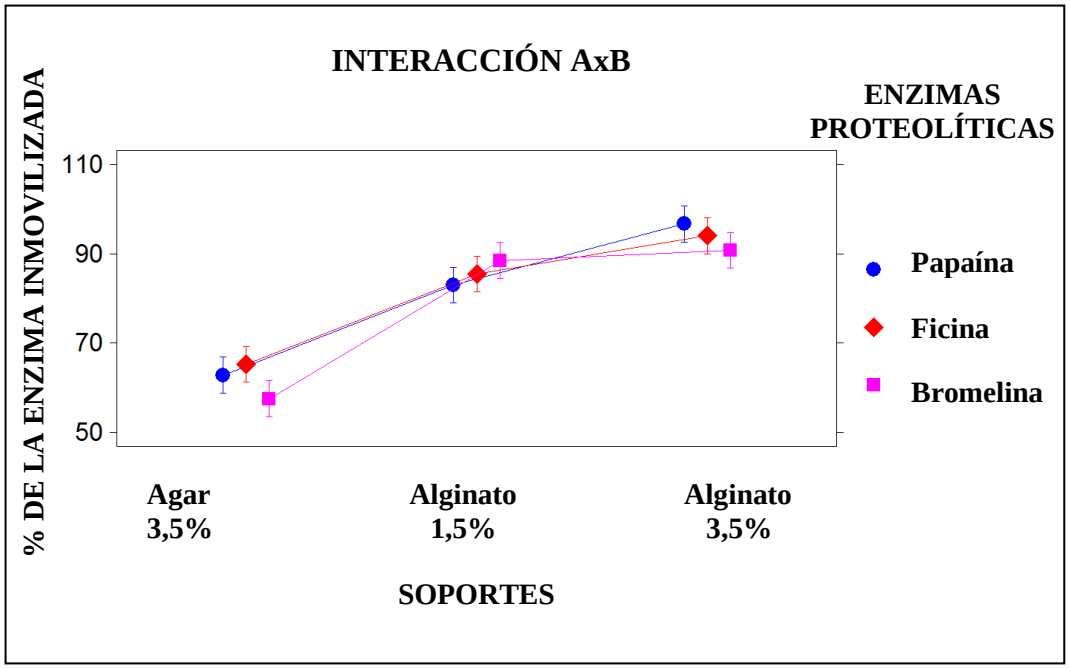


Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Mediante la prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada, en la tabla Nº 5 y gráfico Nº 3, se puede apreciar que estadísticamente existe una diferencia significativa entre los tratamientos, lo cual nos indica que el tipo de soporte (agar-agar y alginato de sodio) y los niveles (1,5% y 3,5%) influyen en el producto final que es la enzima inmovilizada, es por esta razón que los tratamientos T_1, T_2 y T_3 (correspondientes a agar 1,5%), propuestos para la investigación, no dieron resultados, es decir no se inmovilizó al ser una concentración muy baja de agar-agar y reduciéndose los tratamientos a 9.

Podemos identificar que el mejor tratamiento es el T_9, que corresponde a la combinación (alginato 3,5% + papaina), con un porcentaje de inmovilización del 96,67% de enzima inmovilizada en el soporte, ocupando el primer rango o nivel de significancia.

GRÁFICO Nº 4: Interacción AxB para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En el gráfico de la interacción AxB (tipo de soporte y enzimas proteolíticas), se puede apreciar que las líneas de tendencia de la papaína y Ficina se mantienen muy unidas entre agar al 3,5% y alginato al 1,5%, las tres líneas interaccionan en alginato al 1,5% y al 85%, además se aprecia que el porcentaje de enzima inmovilizada es directamente proporcional a la concentración del soporte.

4.2.2 Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (APEI).

Para esta variable los tratamientos se redujo de 12 propuestos en la investigación a 9, ya que los 3 primeros que correspondía al soporte agar al 1,5% no tuvieron resultado, es decir no se dio la inmovilización, debido a que la concentración del biopolímero (agar-agar) fue muy baja y no se logró formas las esferas de gel.

En la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada se observa una superioridad de los tratamientos que en su combinación está presente la enzima papaína, esto debido a que esta enzima al ser extraída y secada directamente del látex que produce al realizar incisiones verticales a la papaya inmadura se encuentra presente mayor concentración de la papaína, lo que no sucede con el higo a pesar que según la bibliografía esta es mayor con 0,28g de proteína por cada 100g de fruta a la papaya, esto debido a que el látex proveniente de la extracción no fue purificado, sino simplemente secado a temperatura controlada.

Lo que se pudo evidenciar durante el desarrollo del trabajo de campo, es que la ficina presentaba un alto contenido celulósico (látex) el cual no se consiguió disolver completamente en el agua destilada al formar la solución de enzima la cual posteriormente se mezcló en una proporción 1:1 ml con el soporte, para posteriormente ser inmovilizada, lo que nos indica que el mg de enzima seca que se pesó, no era completamente ficina como tal sino también el látex resultado del proceso de secado.

Con la enzima bromelina sucedió algo muy similar a pesar que según la bibliografía es mayor con 0,07g de proteína por cada 100g de fruta a la papaya, tampoco fue purificada, ya que para ello se necesitan realizar métodos más complejos y el proceso de extracción consistió en triturar la fruta, cáscara y corona, luego se maceró, filtro y se secó a temperatura controlada, lo que tampoco nos garantiza que el mg de enzima seca que pesamos esté libre de otros componentes de la piña como puede ser la fibra.

Además la piña se encontraba en el 50% de su madurez con lo que se puede considerar que la concentración de bromelina es menor que la de una fruta inmadura, lo que también pudo haber influenciado en la concentración de enzima, lo cual hace que su acción en el sustrato sea menor a las de papaína y ficina. Lo que explica que estas enzimas (ficina y bromelina) hidrolicen una cantidad inferior de sustrato con respecto a la papaína.

TABLA Nº 6: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	2	1788,98	894,99	1040,69	0,0000 **
Factor B	2	4988,58	2494,29	2900,34	0,0000 **
Interacción A*B	4	385,25	96,31	111,99	0,000 **
Repeticiones	2	2,78	1,39	1,61	0,2301 NS
Error	16	13,78	0,86		
Total	26	7179,38			
CV%	1,41				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativo

NS = No significativa

El análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, muestra diferencia altamente significativa para los factores A, B y la interacción AxB, lo que nos indica que tanto el tipo de soporte como el tipo de enzima proteolítica influye en la actividad proteolítica sobre el sustrato leche, mientras que para las repeticiones no existe significancia es decir no hay variación entre los bloques.

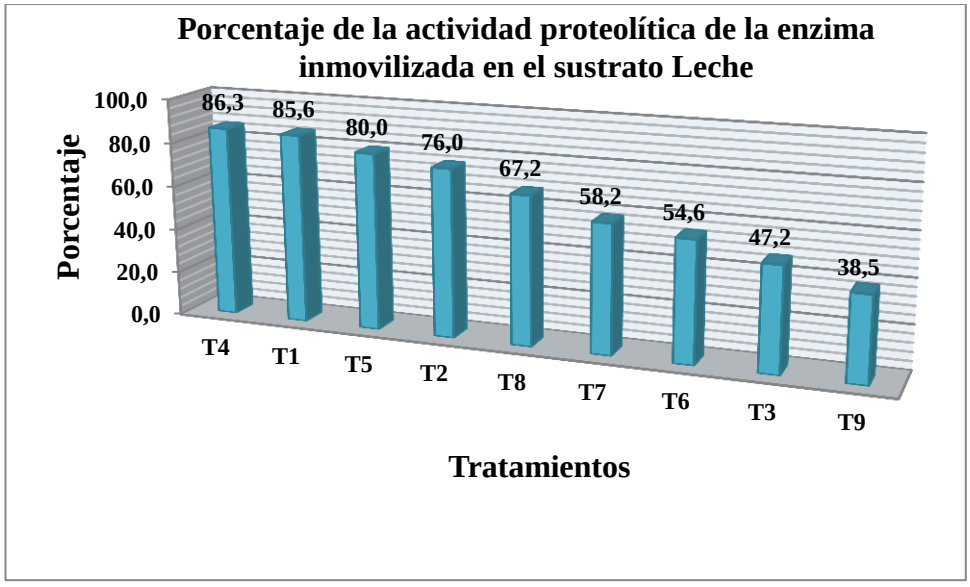
El coeficiente de variación para esta variable nos reporta 1,41%, lo cual indica un correcto manejo de la investigación de campo.

TABLA Nº 7: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

TRAT.	CÓDIGO	$\overline{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
4	A_3B_1	86,303	A
1	A_2B_1	85,610	A
5	A_3B_2	79,980	B
2	A_2B_2	76,040	C
8	A_4B_2	67,243	D
7	A_4B_1	58,220	E
6	A_3B_3	54,627	F
3	A_2B_3	47,237	G
9	A_4B_3	38,543	H

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 5: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

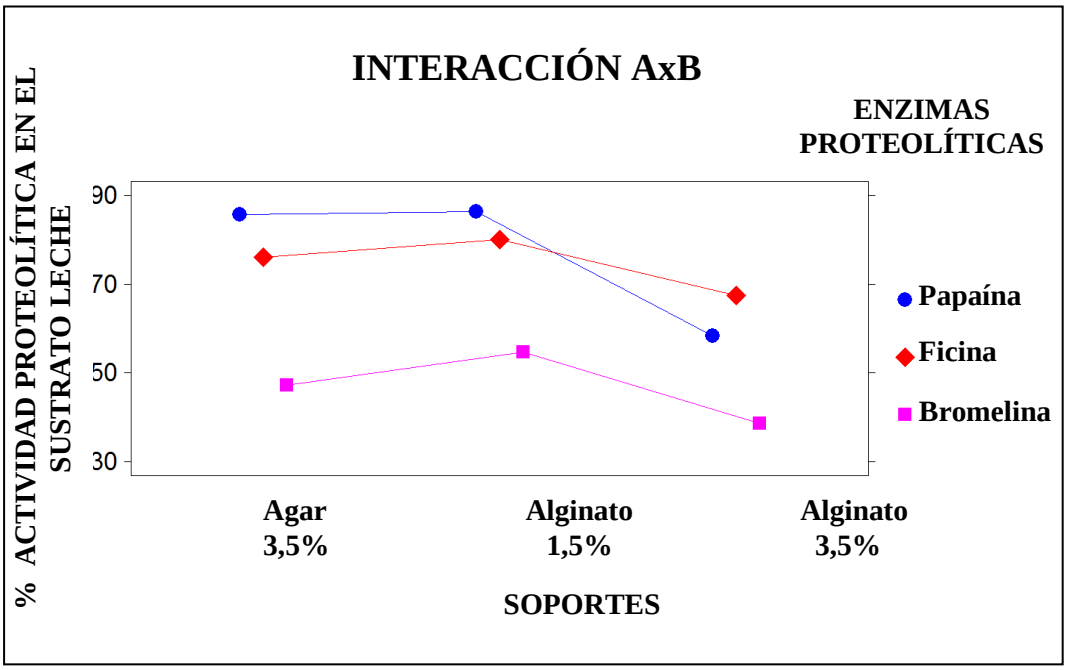


Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Para la prueba de Tukey al 5% correspondiente a la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, se puede

apreciar que el tratamiento T_4 (alginato 1,5%-papaína) sobresale en el primer rango de significancia A, con un 86% de proteína hidrolizada, mientras que los tratamientos T_6, T_3 y T_9 que presentan en sus combinaciones la enzima proteolítica bromelina son en los que se obtienen porcentajes de actividad más bajos y se ubican en los niveles F, G, H de significancia, como se puede apreciar en la tabla Nº 7 y gráfico Nº 5.

GRÁFICO Nº 6: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, se puede apreciar que las líneas correspondientes a las enzimas proteolíticas de papaína y bromelina interactúan a la altura de 75% en el soporte alginato 1,5%, mientras la línea correspondiente a la enzima bromelina mantiene una tendencia paralela y no interactúa en ningún punto con la papaína y Ficina, además se mantiene muy por debajo de ellas lo que nos indica que su actividad proteolítica en el sustrato leche, es muy inferior con respecto a las demás enzimas.

TABLA Nº 8: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	2	629,15	314,573	192,52	0,0000 **
Factor B	2	690,44	345,220	211,27	0,0000 **
Interacción A*B	4	175,69	43,923	26,88	0,0028 **
Repeticiones	2	1,18	0,591	0,36	0,7021 NS
Error	16	26,15	1,634		
Total	26	1522,61			
CV%	12,68				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativo

NS = No significativa

El análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, se puede observar una diferencia altamente significativa para los factores A, B y la interacción AxB, lo cual nos indica que el tipo de soporte y el porcentaje empleado para la inmovilización así como también el tipo de enzima, influye en la actividad proteolítica sobre el sustrato, lo que no sucede con las repeticiones o bloques que no presentan diferencia significativa.

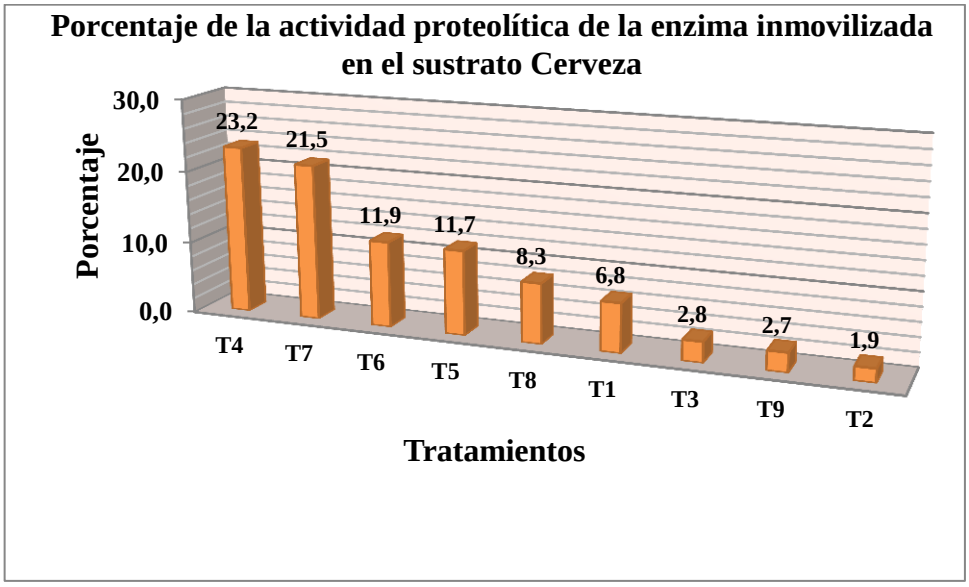
El coeficiente de variación para esta variable nos da 12,68%, lo cual indica un correcto manejo de la investigación de campo.

TABLA Nº 9: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
4	B_1C_1	23,227	A
7	B_2C_1	21,517	A
6	B_1C_3	11,850	B
5	B_1C_2	11,673	B
8	B_2C_2	8,310	BC
1	A_2C_1	6,790	C
3	A_2C_3	2,827	D
9	B_2C_3	2,650	D
2	A_2C_2	1,873	D

Fuente: **(Datos de investigación de campo, 2013)**

GRÁFICO Nº 7: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.

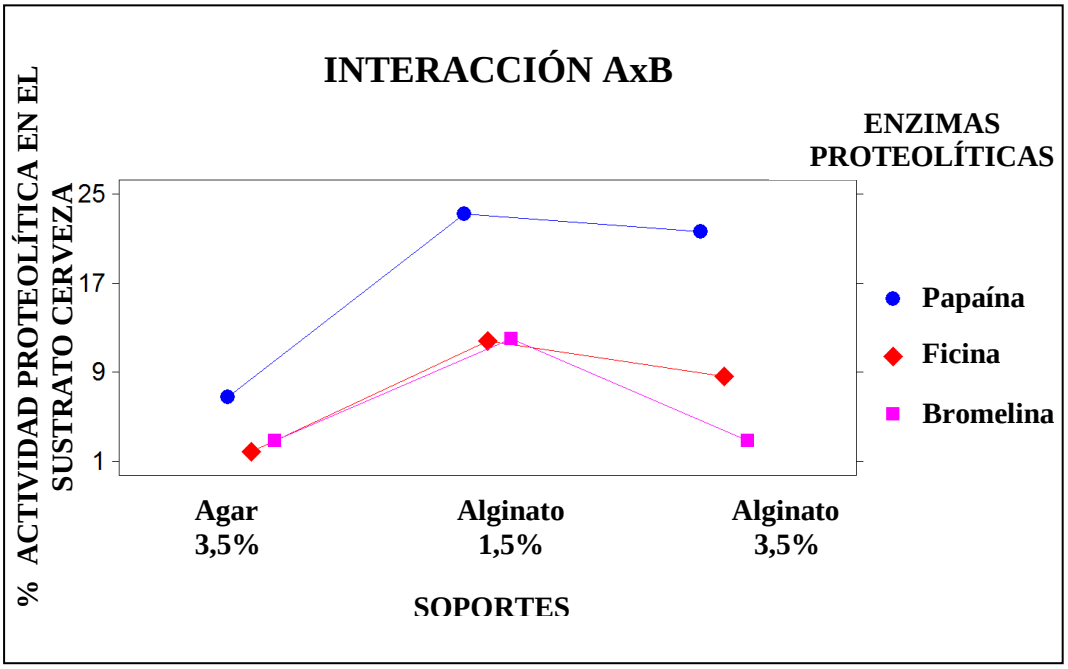


Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, detallado en la tabla Nº 9 y el gráfico Nº 7, correspondiente a la se distingue la superioridad del tratamiento T_4 correspondiente a la combinación (alginato 1,5% + papaína) con un 23,23% seguido del tratamiento T_7 correspondiente a la combinación (alginato 3,5% + papaína) con un 21,6%, ubicados en el nivel de significancia A.

La actividad proteolítica en el sustrato cerveza es inferior con respecto a los sustratos leche y carne, debido a que la aplicación de enzimas para la clarificación se realiza en proceso de fermentación y maduración para controlar la turbidez adicionando una proporción entre 1-1,5g de enzima por cada hectolitro de cerveza, lo que en el trabajo de campo se adicionó la enzima inmovilizada a la cerveza artesanal a temperatura de incubación 40-42ºC por media hora, razón por la cual no hidrolizó más contenido proteico, lo que se ve reflejado en los datos de porcentaje de actividad proteolítica.

GRÁFICO Nº 8: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, las líneas de tendencia de las enzimas proteolíticas presentan un semi paralelismo, llegando a interactuar la enzima papaína y ficina en el 75% para el Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza y el soporte alginato al 1,5%, la línea de tendencia de la enzima bromelina es muy inferior con respecto a las otras enzimas (papaína y ficina) sin llegar a interactuar como se observa en el gráfico Nº 8.

TABLA Nº 10: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	2	742,97	371,483	220,99	0,0000 **
Factor B	2	186,77	93,383	50,64	0,0000 **
Interacción A*B	4	45,36	11,341	6,15	0,0028 **
Repeticiones	2	3,36	1,681	0,91	0,4219 NS
Error	16	29,51	1,844		
Total	26	1007,07			
CV%	1,54				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativo

NS = No significativa

El análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne, los tratamientos A, B y la interacción AxB presentan diferencias altamente significativas, lo cual nos indica que tanto el tipo de soporte empleado para la inmovilización así como también el porcentaje y el tipo de enzima utilizada en la investigación de campo, influye en el porcentaje de actividad proteolítica tomado como variable de respuesta en el producto terminado. Los bloques presentan diferencia no significativa, lo que nos revela que no existe variabilidad entre repeticiones de los tratamientos.

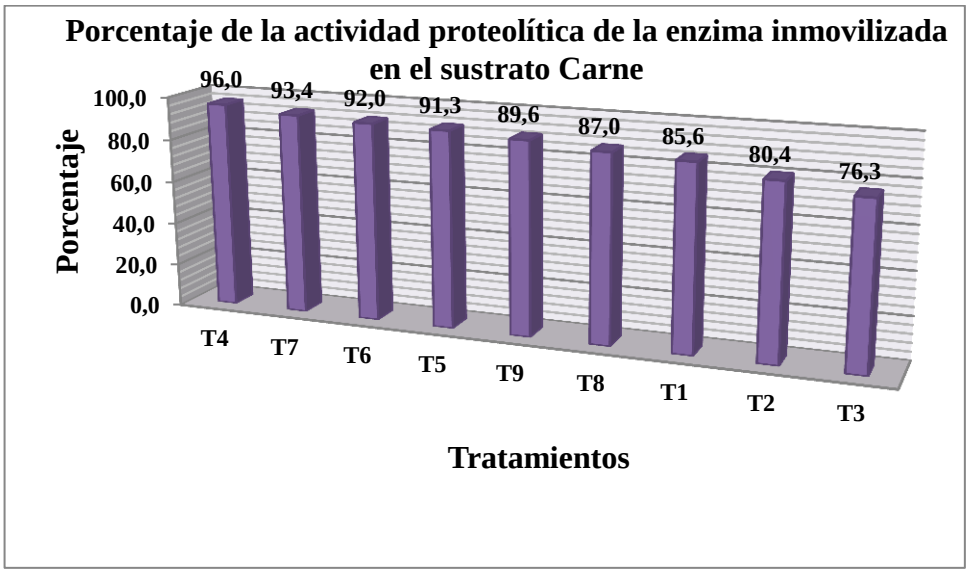
El coeficiente de variación para esta variable nos dio 1,54%, lo cual indica un correcto manejo de la investigación de campo.

TABLA Nº 11: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
4	B_1C_1	96,047	A
7	B_2C_1	93,390	AB
6	B_1C_3	92,003	B
5	B_1C_2	91,323	B
9	B_2C_3	89,610	BC
8	B_2C_2	87,017	CD
1	A_2C_1	85,610	D
2	A_2C_2	80,430	E
3	A_2C_3	76,270	F

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

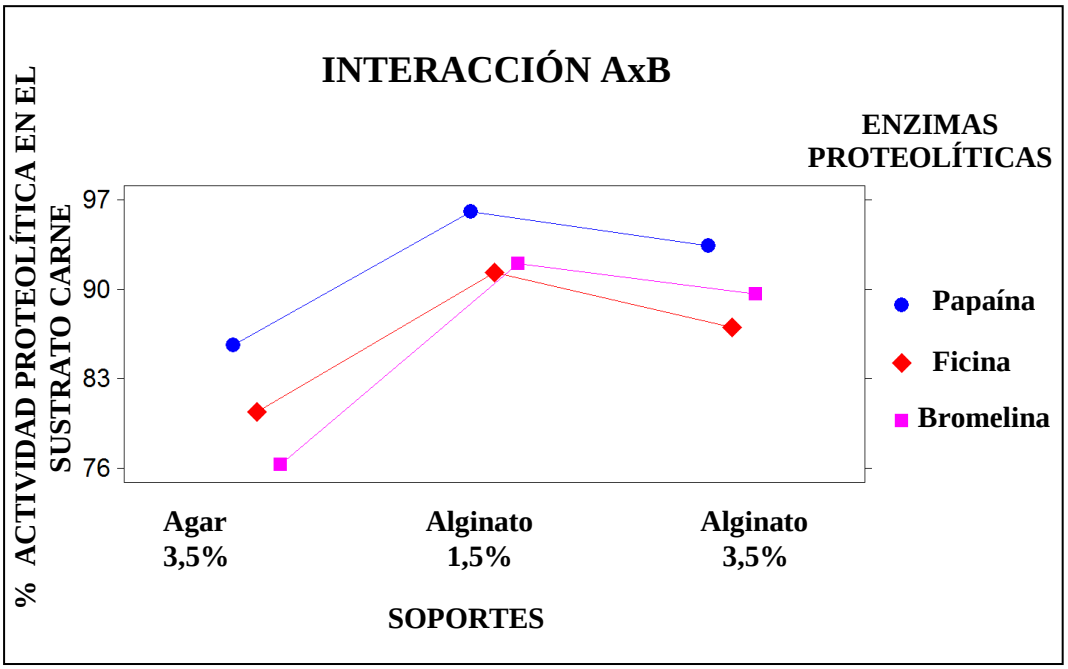
GRÁFICO Nº 9: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Según la prueba de Tukey al 5 % para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne correspondiente a la tabla Nº 11 y gráfico Nº 9, podemos determinar que el tratamiento T_4 (alginato 1,5% + papaína) sobresale con un 96,05% de sustrato hidrolizado en el nivel de significancia A, mientras el más bajo es el T_3 (agar 1,5% + bromelina) con un 76,27% de sustrato hidrolizado ubicándose en el nivel de significancia F, a pesar de las diferencias estadísticas entre los tratamientos se puede tomar a todos como muy buenos ya que actúan eficazmente en el sustrato, en este caso ablandando la carne.

GRÁFICO Nº 10: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

El gráfico Nº 10, de la Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne, podemos evidenciar que existe un semi paralelismo de las líneas de tendencia de las enzimas proteolíticas con la interacción de la ficina y bromelina en el 91% de actividad proteolítica y 1,5% de soporte alginato, además se observa que la línea de

tendencia de la enzima papaína se encuentra muy superior y no llega a interactuar con las demás.

4.2.3 Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (REI).

Para esta variable los tratamientos se redujo de 9 analizados en la variable anterior en el punto 4.2.1 a 6, ya que los 3 tratamientos que correspondían al soporte agar 3,5% no se pudo recuperar de la primera corrida experimental que determinó la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada, debido a que la estructura del soporte fue muy débil y se perdió en el sustrato.

De esta manera para determinar las siguientes variables de respuesta en el producto terminado se trabajó con 6 tratamientos que correspondieron al soporte alginato 1,5% y alginato 3,5% con sus respectivas combinaciones con las enzimas proteolíticas.

Según Won K y col (2005), en su estudio "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads", obtienen un porcentaje de actividad relativa del 72% al reutilizar tres veces lipasa inmovilizada en esferas de alginato.

También se ha reportado valores de actividad residual para proteasas de origen fúngico como la lipasa empleando como soporte de inmovilización celite y poliacrilamida de 98% después de 18 ciclos de reacción según Mansour E, Dawoud F. (2003) en su estudio "Inmovilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absortion procedure".

Además se reporta una actividad residual de 43% después de haber sido reutilizada cinco veces continuas bajo las mimas condiciones de operación, la mexicana inmovilizada en el soporte de alginato de sodio, en la investigación "Efecto de un proceso de inmovilización sobre la actividad proteolítica de mexicaína" de Flores G. (2011)

Mostrando que el uso repetitivo provoca una pérdida de la actividad debido a que existe una posible liberación de la enzima de las esferas de alginato, además del daño mecánico que sufren las mismas al ser utilizadas y recuperadas en repetidas ocasiones.

TABLA Nº 12: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	93,252	93,2523	115,368	0,0000 **
Factor B	2	89,906	44,2528	54,75	0,0000 **
Interacción A*B	2	25,357	12,6787	15,69	0,0007 **
Repeticiones	2	1,192	0,5862	0,73	0,5274 NS
Error	10	8,083	0,8083		
Total	17	217,791			
CV%	1,33				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativo

NS = No significativa

En el análisis de varianza para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, muestra diferencias altamente significativas para los factores A, B y la interacción AxB, lo que indica que estos factores influyen significativamente en la variable de respuesta que es la reutilización de la enzima inmovilizada, mientras para los bloques o repeticiones no existe diferencia significativa es decir que no hay variabilidad.

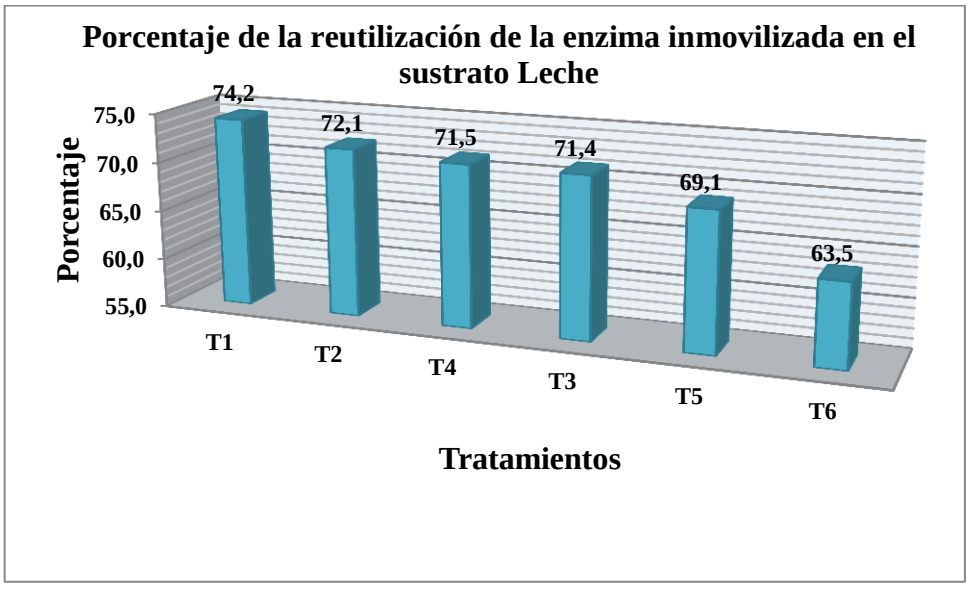
Para el coeficiente de variación tenemos 1,33%, lo que nos indica que se manejó correctamente el trabajo de campo.

TABLA Nº 13: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	74,247	A
2	A_1B_2	72,083	AB
4	A_2B_1	71,487	BC
3	A_1B_3	71,370	BC
5	A_2B_2	69,093	C
6	A_2B_3	63,463	D

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 11: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.

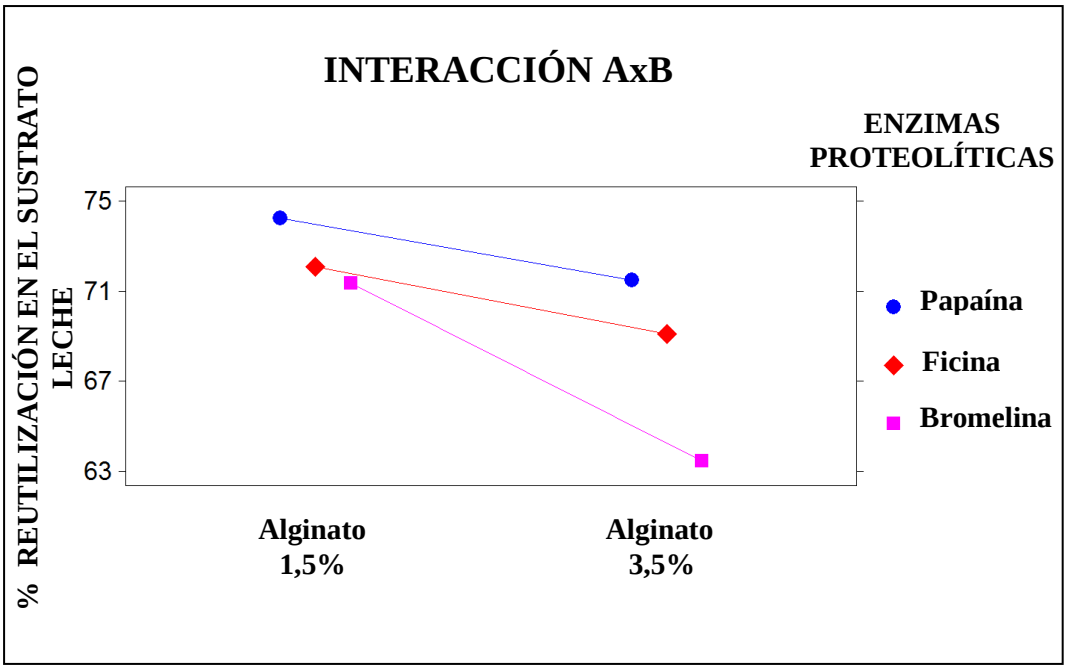


Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, representado en la tabla Nº 13 y el gráfico Nº 15, se puede observar que el mejor tratamiento es el T_1 (alginato 1,5%)

+ papaína) con 74,25% de actividad proteolítica sobre el sustrato después de realizar 5 corridas experimentales ubicado en el nivel de significancia A, mientras el más bajo es el tratamiento T_6 que corresponde a la combinación (alginato 3,5% + bromelina), en el nivel de significancia D.

GRÁFICO Nº 12: Interacción AxB para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Leche, se puede observar que las líneas correspondientes a las enzimas proteolíticas papaína, ficina y bromelina, mantienen una tendencia semi paralela sin interactuar entre ellas y declinan conforme se incrementa la reutilización de la enzima inmovilizada, además se puede observar que son superiores en la concentración de alginato al 1,5%.

TABLA Nº 14: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	198,01	198,01	17,16	0,0012 **
Factor B	2	4840,80	2420,20	209,72	0,0000 **
Interacción A*B	2	49,98	24,99	2,17	0,1392 NS
Repeticiones	2	0,50	0,25	0,002	0,9787 NS
Error	10	115,43	11,54		
Total	17	5204,72			
CV%	7,30				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

Según el análisis de varianza para el porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, se puede observar que existen diferencias altamente significativas para los tratamientos A, B y para la interacción AxB, y que existe diferencia no significativa para las repeticiones, lo que nos indica que los factores y la interacción de los mismos si influye en la variable de respuesta, mas no los bloques o repeticiones.

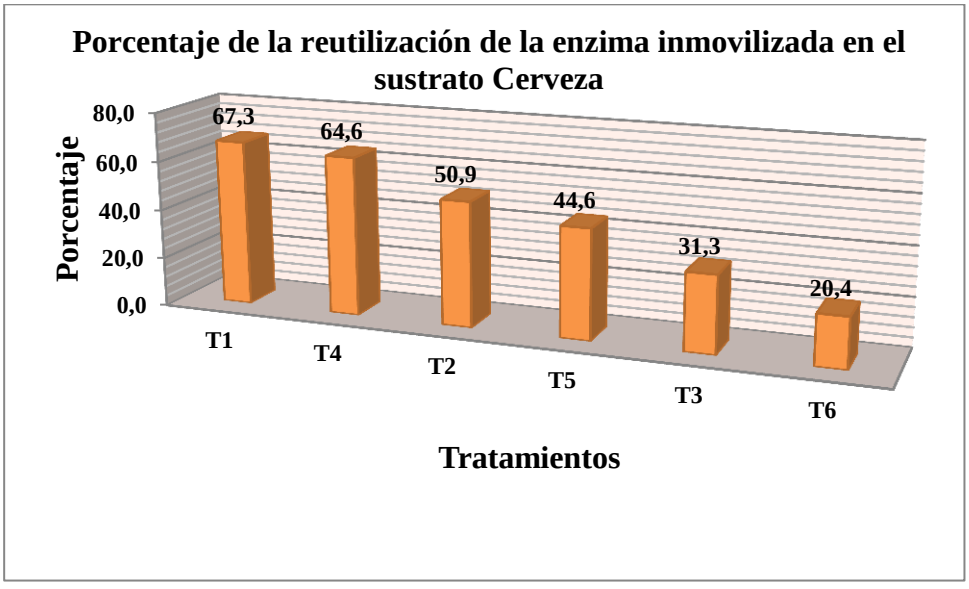
Para el coeficiente de variación tenemos 7,30%, indicándonos que la investigación de campo fue controlada correctamente.

TABLA Nº 15: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.

TRAT.	CÓDIGO	$\overline{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	67,347	A
4	A_2B_1	64,590	A
2	A_1B_2	50,850	B
5	A_2B_2	44,600	B
3	A_1B_3	31,300	C
6	A_2B_3	20,407	D

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

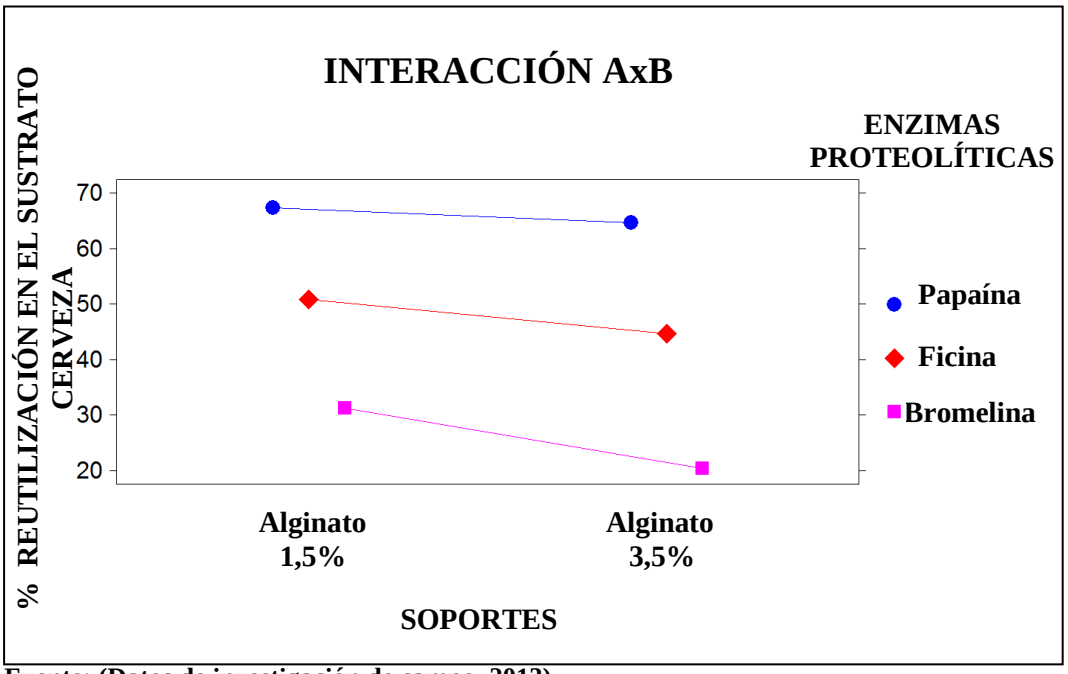
GRÁFICO Nº 13: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Se puede evidenciar que en la prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, el tratamiento T_1 que corresponde a la combinación de (alginato 1,5% + papaína) se ubica como mejor tratamiento, en el nivel de significancia A con el 67,35% de actividad proteolítica después de 5 corridas experimentales como lo indica la tabla Nº 15 y el gráfico Nº 13.

GRÁFICO Nº 14: Interacción AxB para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Según el gráfico Nº 14, de la interacción AxB para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Cerveza, podemos apreciar un paralelismo de las líneas de tendencia de las enzimas inmovilizadas frente a la reutilización en el sustrato cerveza, las cuales no llegan intersecarse en ningún punto del gráfico porque no hay significancia estadística.

TABLA Nº 16: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	121,06	121,057	323,68	0,0000 **
Factor B	2	1329,94	664,972	1778	0,0000 **
Interacción A*B	2	13,29	6,643	17,76	0,0003 **
Repeticiones	2	0,35	0,173	0,46	0,6420 NS
Error	10	3,74	0,374		
Total	17	1468,37			
CV%	0,96				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

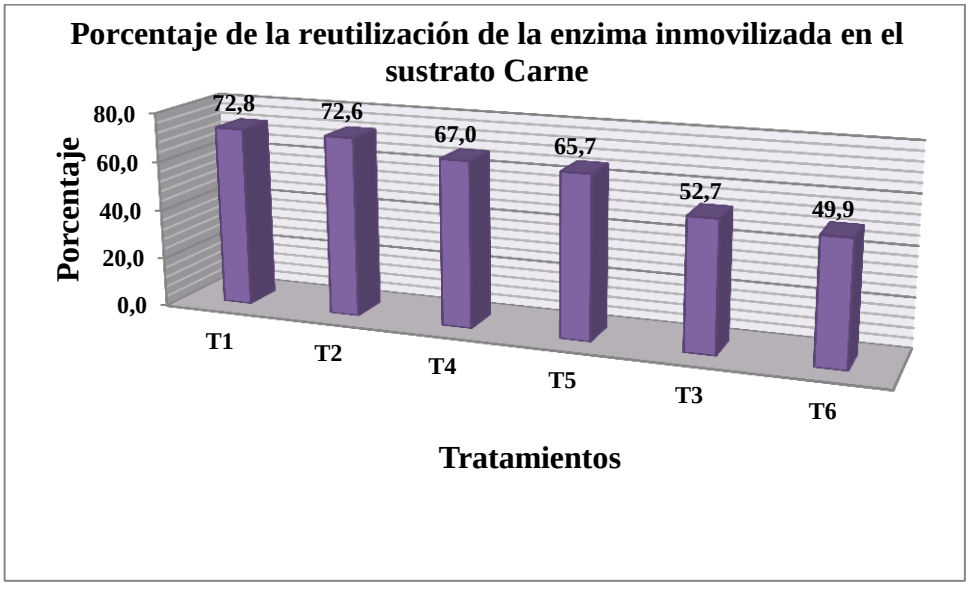
El análisis de varianza para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne, nos proporciona una diferencia altamente significativa para los factores A, B y para la interacción de los mismos, mientras para las repeticiones o bloques no existen diferencias, con un coeficiente de variación de 0,96%, indicándonos que la investigación de campo fue controlada correctamente.

TABLA Nº 17: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	72,810	A
2	A_1B_2	72,630	A
4	A_2B_1	66,997	B
5	A_2B_2	65,723	B
3	A_1B_3	52,737	C
6	A_2B_3	49,897	D

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

GRÁFICO Nº 15: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.

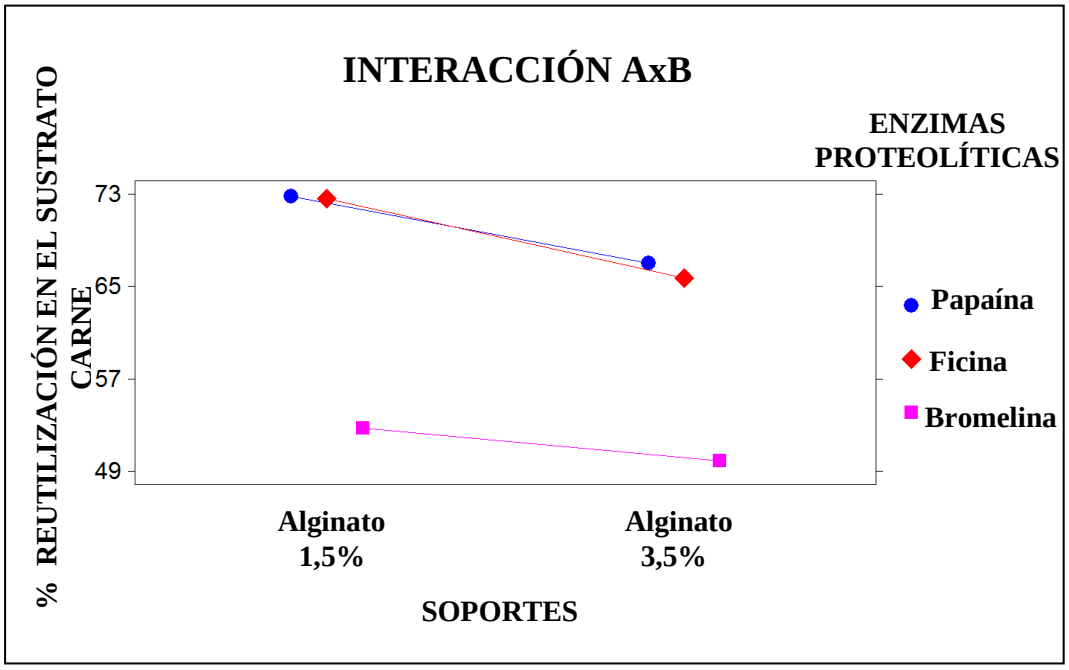


Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne, manifestada en la tabla Nº 17 y el gráfico Nº15, revela que estadísticamente el mejor tratamiento en el nivel de significancia A

superior es el T_1 que corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína) con el 72,81% de actividad proteolítica al final de la reutilización.

GRÁFICO Nº 16: Interacción AxB para la variable porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

Según se observa en la interacción AxB para el porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada en el sustrato Carne, existe un paralelismo de las líneas de tendencia, las enzimas papaína y ficina se mantienen muy unidas, mientras que la bromelina se encuentra muy inferior a ellas y no interacciona en ningún punto, disminuyendo parcialmente la actividad proteolítica conforme se incrementa la concentración del soporte alginato, lo que nos manifiesta una relación inversamente proporcional entre los factores,.

4.2.4 Porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (APEIA).

Según Kilincte (2012), el proceso de inmovilización aporta estabilidad a las proteínas, al restringir el movimiento de la molécula y ligándola a un cuerpo inerte mediante enlaces químicos, de esta forma, los diversos dominios se mantienen en la orientación correcta para conservar la actividad al menos durante un largo periodo de tiempo, en comparación con las enzimas en solución libre.

En el estudio "Efecto de un proceso de inmovilización sobre la actividad proteolítica de mexicaina" de Flores G. (2011), se reporta una actividad proteolítica en la enzima inmovilizada en el soporte de alginato de sodio sometida al almacenamiento a temperatura de refrigeración superior al 60% después de tres meses.

TABLA Nº 18: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	7,207	7,2073	3,61	0,0938 NS
Factor B	2	126,112	63,0558	31,60	0,0000 **
Interacción A*B	2	13,704	6,8522	3,43	0,0804 NS
Repeticiones	2	7,413	3,7066	1,86	0,2061 NS
Error	10	19,954	1,9954		
Total	17	174,390			
CV%	2,05				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

El análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche, presenta diferencia altamente significativa para el factor B que corresponde al tipo de enzimas proteolíticas, el factor A que corresponde a los soportes para la inmovilización (alginato 1,5%-3,5%), la interacción AxB y los bloques o repeticiones no presentan diferencias significativas que nos indican que no existe variabilidad para estos casos.

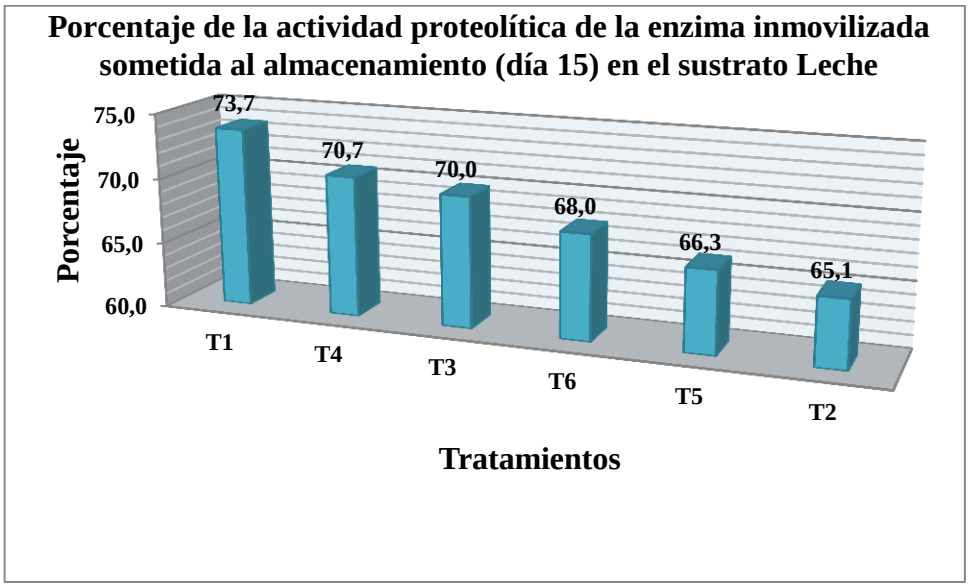
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 2,05%, lo cual nos garantiza de la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 19: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche.

TRAT.	CÓDIGO	$\overline{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	73,673	A
4	A_2B_1	70,717	AB
3	A_1B_3	69,993	ABC
6	A_2B_3	68,017	BCD
5	A_2B_2	66,280	CD
2	A_1B_2	65,143	D

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

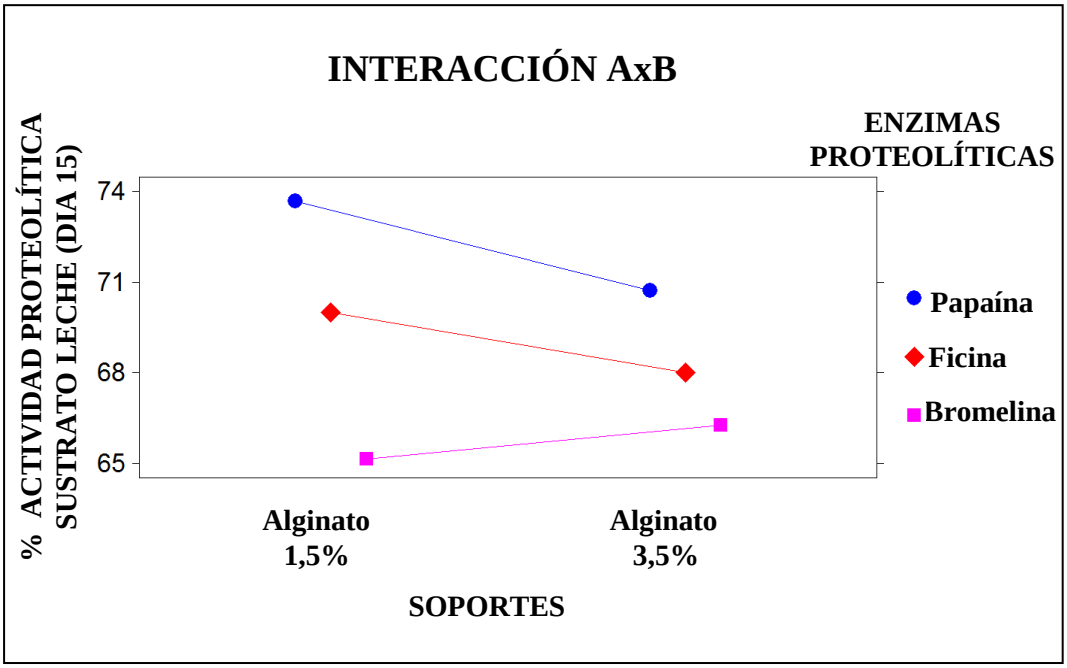
GRÁFICO Nº 17: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche, de la tabla Nº 19 y el gráfico Nº 17, se distingue estadísticamente la superioridad del tratamiento T_1 que corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína) en el nivel de significancia A, mientras que el tratamiento con menor actividad proteolítica después del almacenamiento es el T_2 que corresponde a la combinación (alginato 1,5% + ficina).

GRÁFICO Nº 18: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La interacción AxB para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Leche, nos indica un semi paralelismo de las líneas de tendencia de las enzimas, en donde se reduce la actividad proteolítica para las enzimas papaína y ficina conforme aumenta la concentración del soporte, mientras que la enzima bromelina incrementa en un 5%.

TABLA Nº 20: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	129,71	129,712	2,78	0,1149 NS
Factor B	2	681,00	340,498	7,32	0,0081 **
Interacción A*B	2	6,30	3,152	0,07	0,9317 NS
Repeticiones	2	30,96	15,478	0,33	0,7242 NS
Error	10	645,07	46,507		
Total	17	1313,04			
CV%	4,44				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

El análisis de varianza para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza, se distingue diferencia altamente significativa para el factor B, mientras que para el factor A, la interacción AxB y los bloques o repeticiones no presentan diferencias significativas.

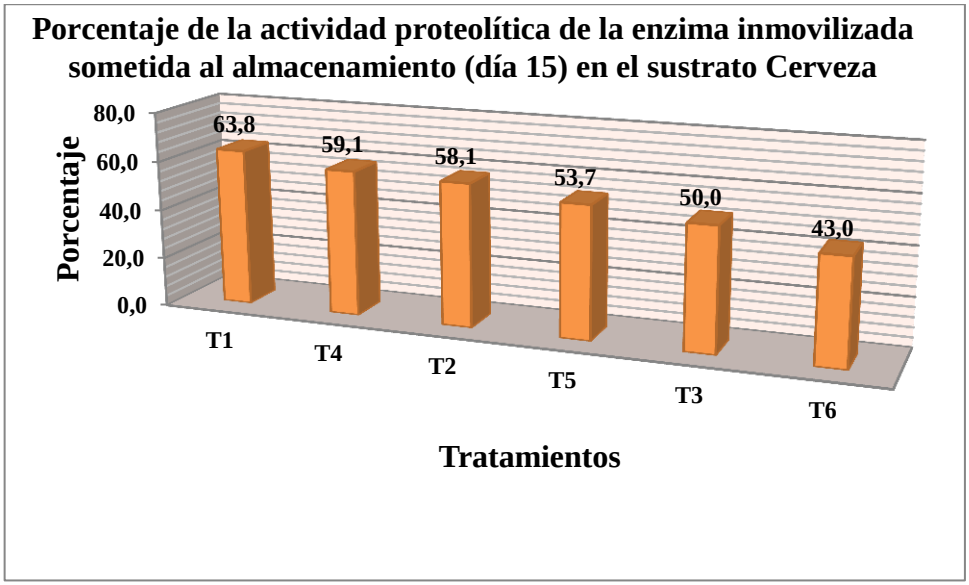
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 4,44%, lo cual nos garantiza la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 21: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	63,793	A
4	A_2B_1	59,053	AB
2	A_1B_2	58,057	AB
5	A_2B_2	53,717	AB
3	A_1B_3	50,033	AB
6	A_2B_3	43,007	B

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

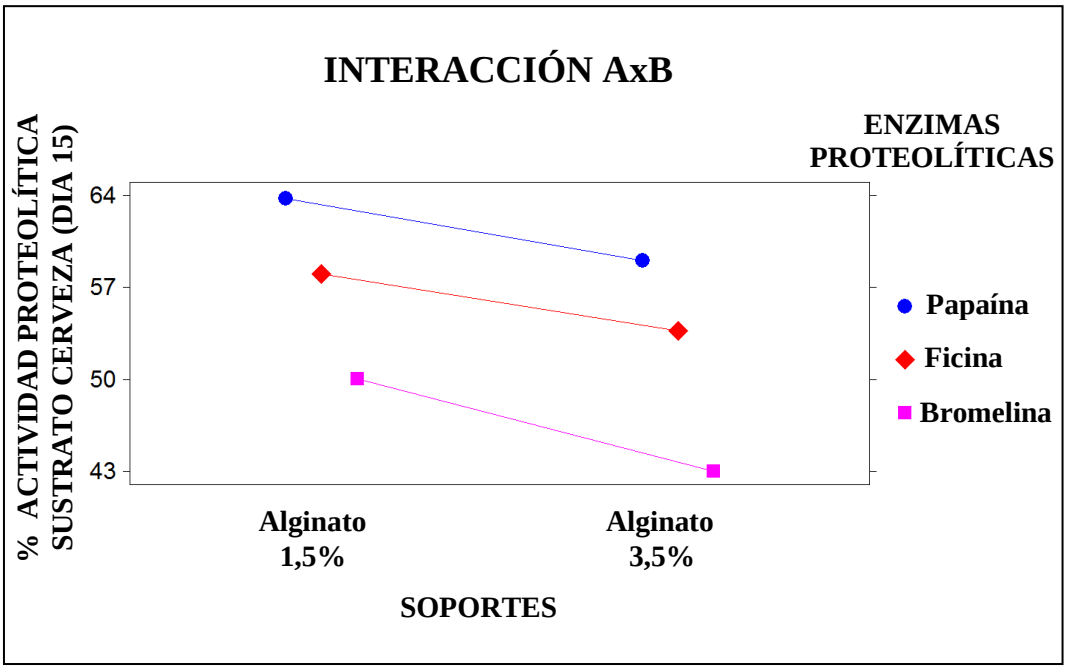
GRÁFICO Nº 19: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza, en la tabla Nº 21 y el gráfico Nº 19, destaca el tratamiento T_1 correspondiente a la combinación (alginato 1,5% + papaína) con un 64,94% de actividad proteolítica después de ser sometida al almacenamiento en el nivel de significancia A, seguido de cuatro tratamientos (T_4, T_2, T_5, T_3) en el nivel se de significancia AB, y por último en el nivel C al tratamiento T_6 de la combinación (alginato 3,5% + bromelina).

GRÁFICO Nº 20: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La interacción AxB para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Cerveza, nos plantea que las líneas mantienen una tendencia paralela, disminuyendo la actividad proteolítica conforme incrementa la concentración del sustrato, sin ellas sin llegar a intersecarse en ningún punto, mostrando que no existen diferencias significativas.

TABLA Nº 22: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	0,823	0,823	0,12	0,7515 NS
Factor B	2	257,777	128,889	18,40	0,0005 **
Interacción A*B	2	14,844	7,422	1,06	0,4163 NS
Repeticiones	2	33,452	16,726	2,39	0,1419 NS
Error	10	70,028	7,003		
Total	17	376,925			
CV%	3,80				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

En el análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne, podemos apreciar diferencia altamente significativa para el factor B, es decir que si influye en la variable de respuesta, el factor A, la interacción AxB y las réplicas o bloques no presentan diferencias significativas en la variable de respuesta.

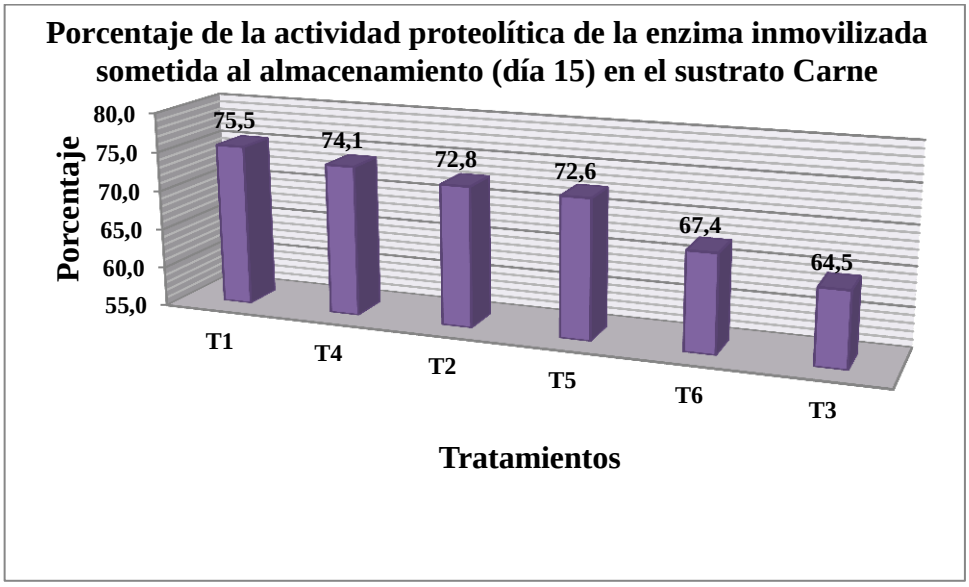
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 3,80%, lo cual nos garantiza la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 23: Prueba de Tukey para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	75,493	A
4	A_2B_1	74,057	AB
2	A_1B_2	72,757	AB
5	A_2B_2	72,587	AB
6	A_2B_3	67,350	BC
3	A_1B_3	64,460	C

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

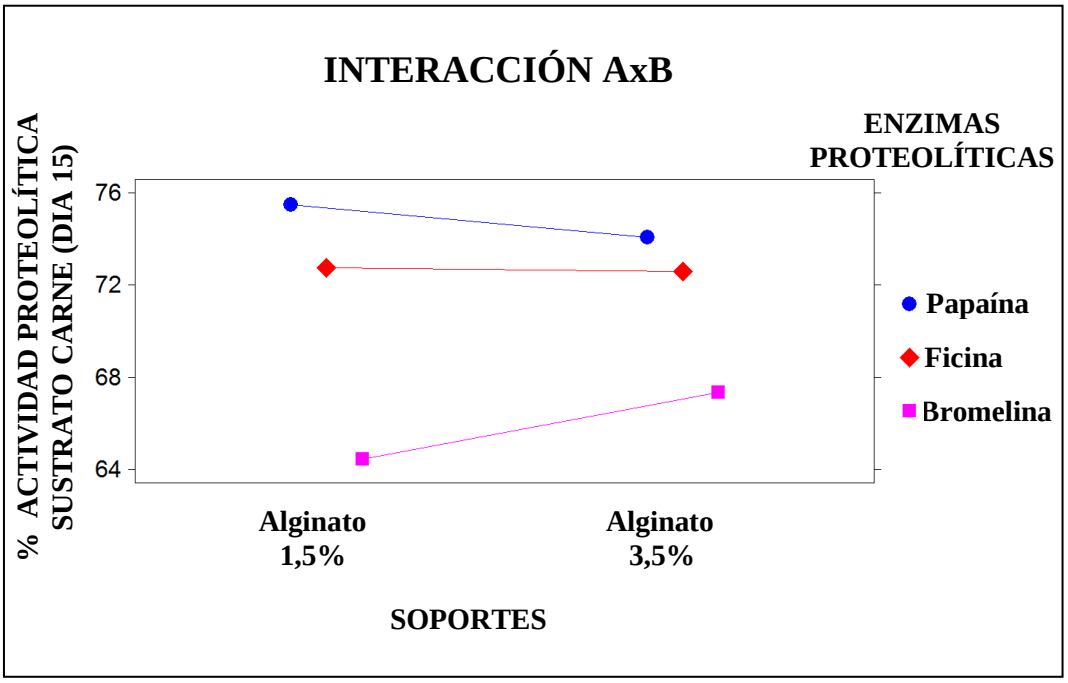
GRÁFICO Nº 21: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne, nos muestra al mejor tratamiento T_1 que corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína) con el 75,8% de actividad proteolítica después de 15 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración en el nivel de significancia A, como se puede apreciar en la tabla Nº 23 y el gráfico Nº 21.

GRÁFICO Nº 22: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 15) en el sustrato Carne, nos muestra el paralelismo de las líneas de tendencia de las enzimas proteolíticas empleadas para la inmovilización, las cuales no interactúan en ningún punto.

TABLA Nº 24: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	39,043	39,0433	41,40	0,0001 **
Factor B	2	69,866	34,9330	37,04	0,0042 **
Interacción A*B	2	3,017	1,5086	1,59	0,0001 **
Repeticiones	2	4,389	2,1944	2,33	0,1480 NS
Error	10	9,431	0,9431		
Total	17	125,746			
CV%	1,89				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

** = Altamente significativa

NS = No significativa

En el Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche, se observan diferencias altamente significativas para los factores A, B y la interacción AxB, que nos indican que tienen influencia sobre la variable, las repeticiones o bloques no presentan diferencias significativas.

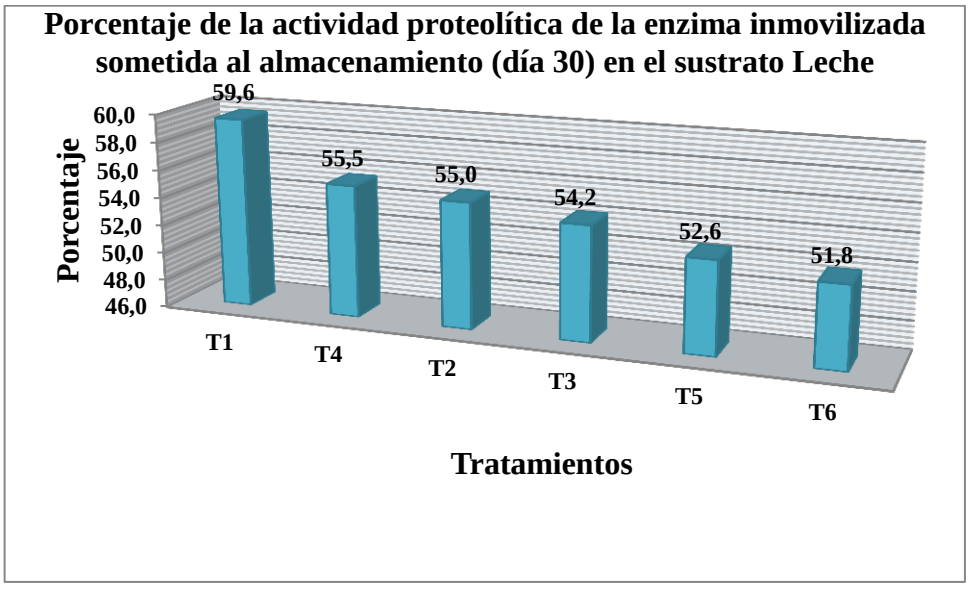
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 1,89%, lo cual nos garantiza la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 25: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1	A_1B_1	59,557	A
4	A_2B_1	55,453	B
2	A_1B_2	54,983	BC
3	A_1B_3	54,153	BCD
5	A_2B_2	52,597	CD
6	A_2B_3	51,807	D

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

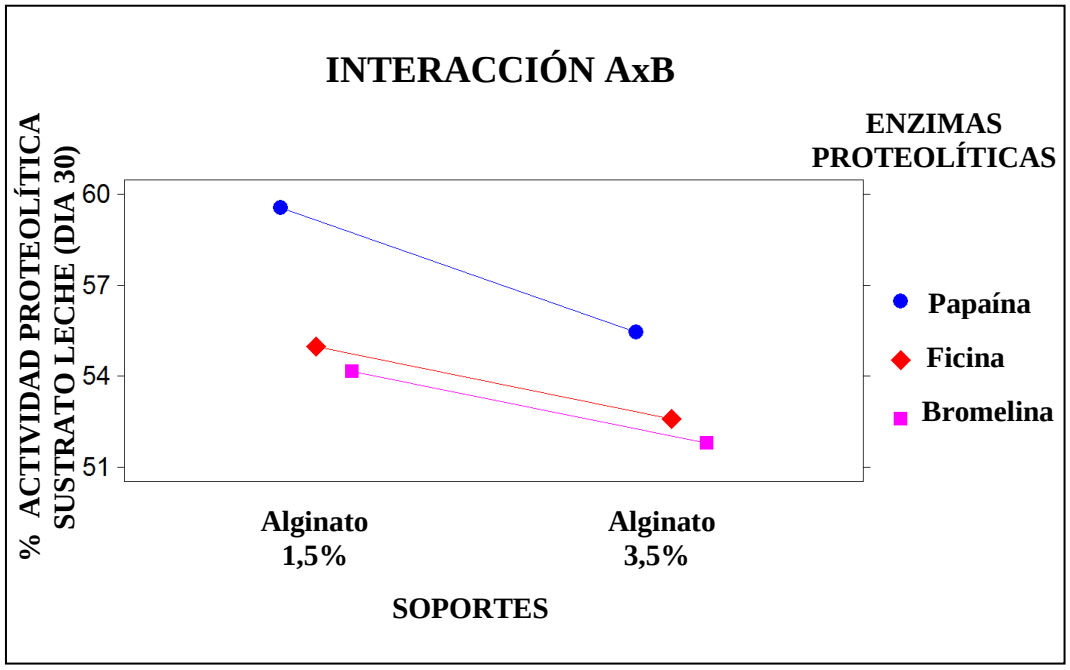
GRÁFICO Nº 23: Prueba de Tukey para el variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche, nos indica que estadísticamente, los tratamientos son muy cercanos, donde sobresale el T_1 con el 59,56% que corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína) en el nivel de significancia A, como se puede observar en tabla Nº 25 y el gráfico Nº 23.

GRÁFICO Nº 24: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Leche, del gráfico Nº 24, las líneas de tendencia de las enzimas proteolíticas inmovilizadas mantienen un paralelismo declinando conforme se incrementa la concentración del soporte, teniendo como mejores resultados a aquellos tratamientos que tienen en sus combinaciones el soporte alginato al 1,5%.

TABLA Nº 26: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	17,681	17,6814		0,1452 NS
Factor B	2	68,466	34,2330		0,7789 NS
Interacción A*B	2	1,365	0,6823		0,4069 NS
Repeticiones	2	9,275	4,6376	2,39	0,1420 NS
Error	10	19,419	1,9419		
Total	17	116,206			
CV%	3,25				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

NS = No significativa

En el análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza, observamos que no existen diferencias significativas para los factores A, B, interacción AxB ni las repeticiones o bloques, lo que nos indica que todas las enzimas inmovilizadas en diferentes porcentajes del soporte alginato, actúan de una manera muy semejante sobre el sustrato y tienen un comportamiento muy parecido al almacenamiento.

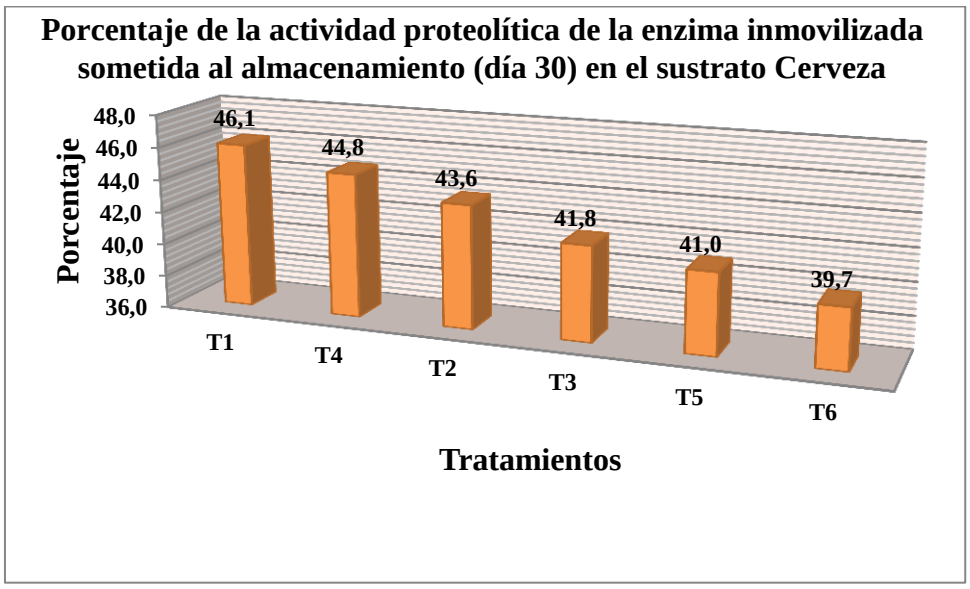
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 3,25%, lo cual nos garantiza la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 27: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	46,060	A
4	A_2B_1	44,803	AB
2	A_1B_2	43,550	ABC
3	A_1B_3	41,803	BC
5	A_2B_2	40,960	BC
6	A_2B_3	39,703	C

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

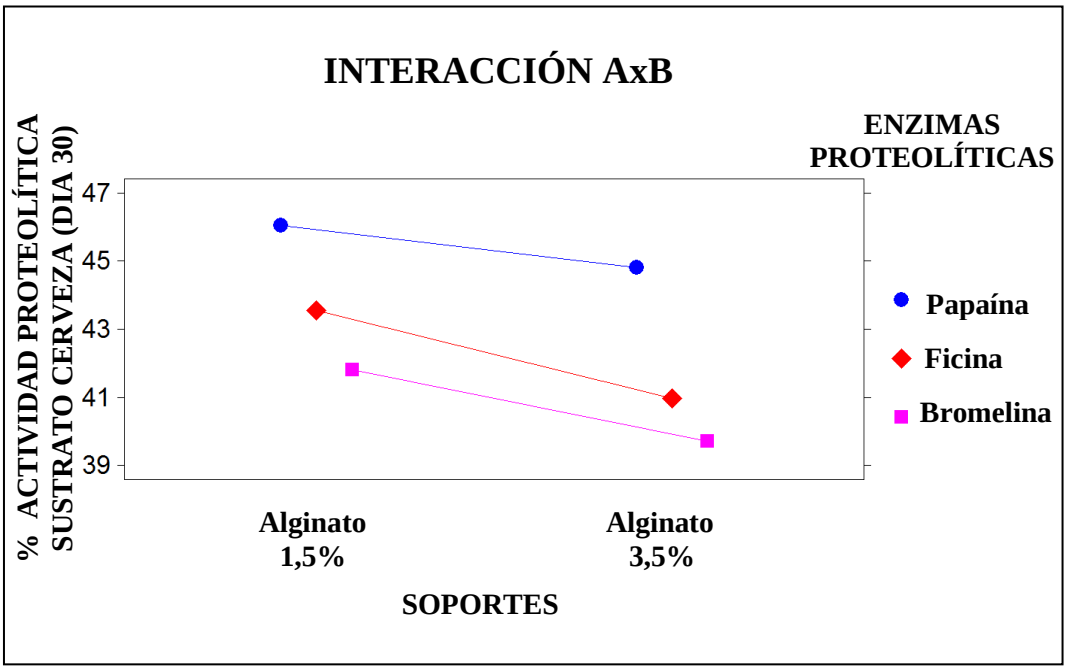
GRÁFICO Nº 25: Prueba de Tukey al 5 % para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey al 5 % para la variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza, como se observa en la tabla Nº 27 y el gráfico Nº 25, estadísticamente el tratamiento T_1 con un 46,06% correspondiente a la combinación (alginato 1,5% + papaína) presenta una superioridad en el nivel de significancia A.

GRÁFICO Nº 26: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Cerveza, podemos observar el paralelismo de las líneas de tendencia de las enzimas proteolíticas inmovilizadas, sin llegar a interactuar en ningún punto, y decayendo el porcentaje de la actividad proteolítica al aumentar la concentración del soporte, es decir los factores mantienen una relación inversamente proporcional.

TABLA Nº 28: Análisis de varianza para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Razón-F	Probabilidad
Factor A	1	234,79	234,794		0,0000 **
Factor B	2	1591,91	795,953		0,0000 **
Interacción A*B	2	170,74	85,372		0,0001 **
Repeticiones	2	2,00	1,000	0,25	0,7820 NS
Error	10	39,69	3,969		
Total	17	2039,13			
CV%	3,18				

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

**** =** Altamente significativa

NS = No significativa

El análisis de varianza para el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne, nos revela diferencias altamente significativas para los factores A, B y la interacción AxB, mientras que las repeticiones presentan diferencias no significativas lo que nos indica que no hubo diferencia en la toma de los datos de los bloques.

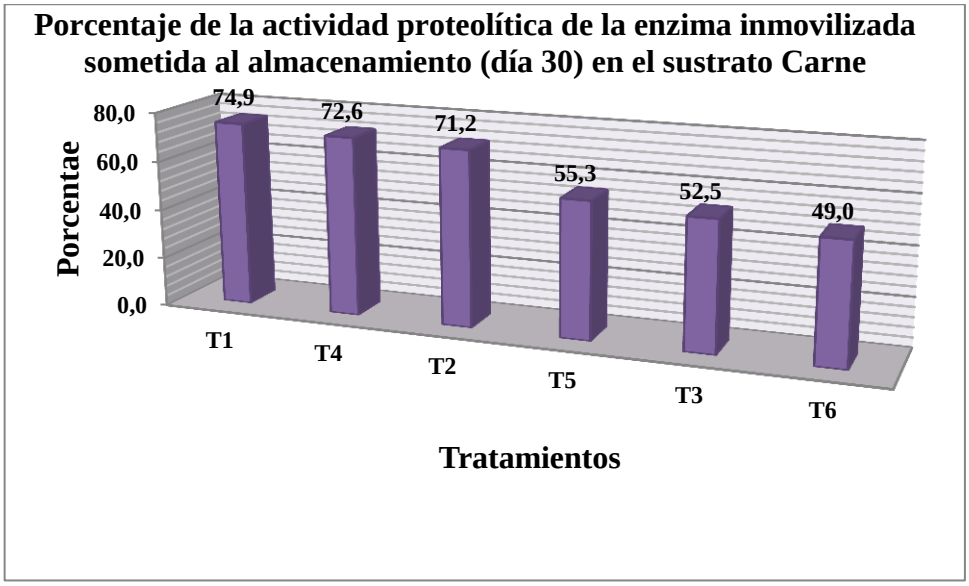
El coeficiente de variación calculado para este ADEVA es de 3,25%, lo cual nos garantiza la eficiencia del manejo y control de las variables dentro del trabajo de campo.

TABLA Nº 29: Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne.

TRAT.	CÓDIGO	$\bar{X}$	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1	A_1B_1	74,900	A
4	A_2B_1	72,587	A
2	A_1B_2	71,193	A
5	A_2B_2	55,283	B
3	A_1B_3	52,460	BC
6	A_2B_3	49,013	C

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

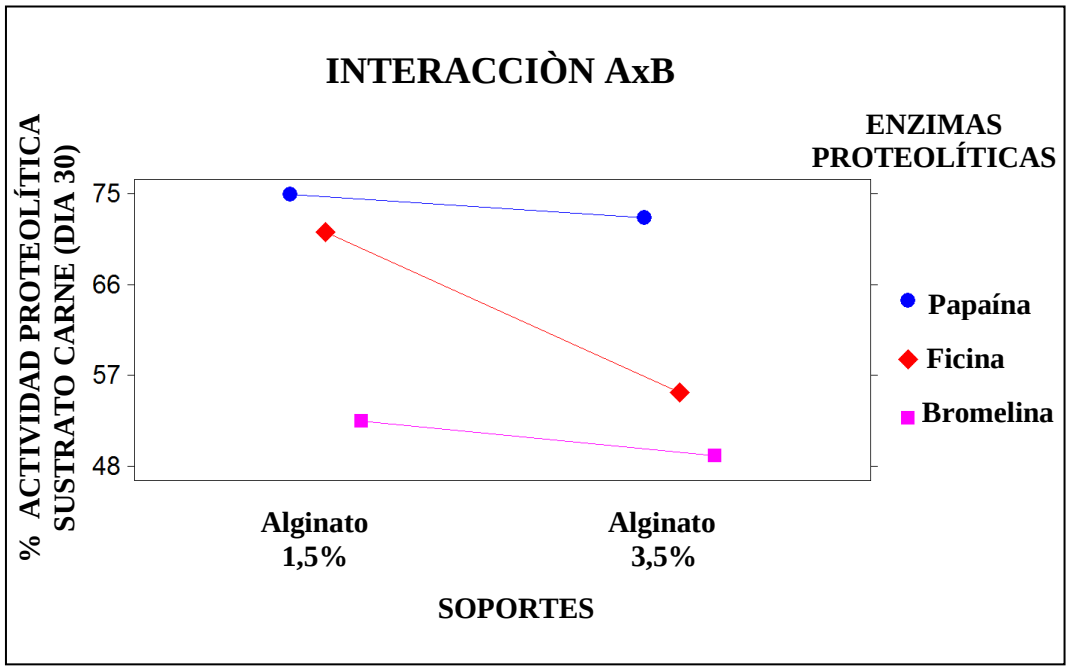
GRÁFICO Nº 27: Prueba de Tukey al 5% para el la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

La prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne, nos revela que el mejor tratamiento corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína) ubicado en el nivel de significancia A, como podemos apreciar en la tabla Nº 29 y gráfico Nº 27.

GRÁFICO Nº 28: Interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne.



Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la interacción AxB para la variable porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (día 30) en el sustrato Carne, podemos apreciar que no existe interacción entre los factores propuestos para la investigación de campo y el porcentaje de actividad proteolítica disminuye al incrementar la concentración del soporte de inmovilización lo que nos indica que existe una relación inversamente proporcional entre los factores.

4.2.5 Determinación de la relación costo beneficio.

Este análisis fue realizado una vez que determiné el mejor tratamiento.

TABLA Nº 30: Análisis de relación costo / beneficio en el mejor tratamiento.

CONCEPTO	Cantidad	C/U	C/T
Materia prima (papaya)	1kg	0,50	0,50
Alginato de sodio	0,375 g	0,69	0,26
Cloruro de Calcio 0,5M	100 g	0,073	7,30
Jeringuilla y aguja 20 ml	1	0,30	0,30
Agua	1,5lt	0,33	0,50
Energía	20KW	0,15	3,00
SUB-TOTAL 1			11,86
Imprevistos (10%"sub total")			1,19
Mano de obra (10%"sub total")			1,19
SUBTOTAL 2 (costo de producción)			14,24
30% de rentabilidad			4,27
Precio de venta			18,51

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

$$\textbf{Beneficio costo} = \frac{\textbf{IB}}{\textbf{CD+CI}}$$

$$\textbf{Beneficio costo} = \frac{\textbf{18,51}}{\textbf{14,24}}$$

Beneficio costo = 1,30

Para inmovilizar 25 mg de la enzima papaína es necesario 14,24 USD, el precio de venta con el 30% de rentabilidad corresponde a 18,51, lo que nos permite tener una relación costo / beneficio de 1,30 USD, es decir que por cada dólar invertido vamos a tener una utilidad de 0,30 ctvs.

Este precio referencial puede variar es decir incrementar, ya que en el mercado el kilogramo de enzima papaína seca sin purificar (látex de papaya seco), puede llegar a costar 200,00 USD, mientras que el kilogramo de enzima semipurificada puede costar 960,00 USD, precios que se incrementan dependiendo el grado de purificación y los métodos empleados para este fin, las enzimas en este estado libre pueden ser utilizadas una sola vez en el proceso ya que se pierden con el producto, esa es la ventaja que inmovilizada puede ser reutilizada y es más estable a condiciones de operación como el pH y la temperatura, lo que incrementaría el valor del producto.

V. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.

H_o = Los métodos de atrapamiento en gel y unión a un soporte, no inmovilizarán enzimas (papaína, ficina y bromelina), aptas para la aplicación en la industria alimentaria.

H_1 = Los métodos de atrapamiento en gel y unión a un soporte, inmovilizarán enzimas (papaína, ficina y bromelina), aptas para la aplicación en la industria alimentaria.

5.1 Verificación de hipótesis para la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en los sustratos: Leche, Cerveza y Carne

Para la verificación de la hipótesis, se realizó una comparación entre los valores Razón-F del análisis de varianza para el Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en el sustrato los sustratos: Leche, Cerveza, Carne con el valor de F tabulados en tablas de Fisher, para poder aceptar la hipótesis nula y si se rechaza, aceptar la hipótesis alternativa.

TABLA Nº 31: Valores de Fisher comparativos del análisis de varianza para el Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada en los sustratos: Leche, Cerveza y Carne.

Determinación	Razón F	Valor F tablas
Factor A	1040,69	3,634
Factor B	2900,34	3,634
Interacción A*B	111,99	3,007

Fuente: (Datos de investigación de campo, 2013)

En la tabla Nº 32, con un nivel de confianza del 95%, podemos observa que existe diferencia altamente significativa para los factores A, B y la interacción AxB, por lo cual acepto la hipótesis alternativa H_1 y rechazo la hipótesis nula $H_{o,}$ ya que el valor de Razón-F es mayor al valor de F de tablas.

Con lo cual se comprueba que con los métodos de atrapamiento en gel y unión a un soporte, se inmovilizó enzimas (papaína, ficina y bromelina), aptas para la aplicación en la industria alimentaria, con las cuales se midió la actividad proteolítica bajo las mismas condiciones de temperatura de incubación 40-42 ºC y el tiempo de 30 minutos en tres sustratos, reportándose porcentajes altos en la leche y carne, mientras que en la cerveza se registró porcentajes más bajos, pero con los que puedo corroborar y argumentar la verificación de la hipótesis.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

6.1 CONCLUSIONES.

Del presente trabajo de investigación puedo expresar las siguientes conclusiones.

- Se extrajo e inmovilizó enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas (papaya, higo, piña) mediante el método de atrapamiento en gel en el soporte agar-agar por adhesión o retención física en las cavidades interiores de la matriz sólida porosa y el método de unión a un soporte por adsorción o gelación iónica con la formación de esferas de alginato de calcio como resultado del intercambio iónico de la reacción del soporte alginato de sodio con la solución endurecedora de cloruro de calcio al 0,5 molar, posteriormente de aplicó en la industria alimentaria para medir la actividad proteolítica en tres sustratos (leche, carne, cerveza).

- Se determinó que el mejor método para la inmovilización de enzimas con el cual se obtuvo mejores resultados en las variables de respuesta, fue el de unión a un soporte por gelación iónica usando como soporte el alginato de sodio a una concentración de 1,5%, el cloruro de calcio al 0,5 molar como la solución endurecedora y con la enzima papaína.

- Las enzimas proteolíticas (papaína, ficina y bromelina) al actuar sobre la leche, descienden el punto isoeléctrico de las proteínas a 3,6 provocando la ruptura de molécula kapa caseína a nivel de los enlaces 105-106 entre los aminoácidos fenilalanina-metionina lo que provoca que se desestabilice las micelas y la caseína se divide de su fase líquida llamada suero formando coágulos, logrando una cuajada más firme, flexible e impermeable, obteniéndose un 66% de actividad proteolítica en este sustrato, en la cerveza la adición de enzimas ocasiona la fragmentación de las moléculas proteicas induciéndolas a precipitar, lo que produce la clarificación de la bebida en un 10%, en la carne provocan la hidrólisis de las proteínas, rompiendo la elastina y disminuyendo la resistencia del colágeno,

modificando la textura, lo que se ve reflejado en el ablandamiento con un 88% de sustrato hidrolizado.

- Se determinó la relación costo-beneficio del mejor tratamiento al T_7 correspondiente a la combinación (alginato 1,5% + papaína), llegando a establecer que el costo de extraer e inmovilizar 25 mg de enzima papaína es de 14,24 USD y el costo de venta es de 18,51 USD con el 30% de rentabilidad, es decir que por cada dólar invertido vamos a tener una utilidad de 0,30 USD.

6.2 RECOMENDACIONES.

- Para inmovilizar enzimas de uso en la industria alimentaria se debe utilizar el método de unión a un soporte con concentraciones bajas de alginato de sodio (1,5%), ya que permite el paso o interacción entre el sustrato y centro activo de las enzimas inmovilizadas, obteniéndose mejores resultados de actividad proteolítica.

- Para obtener la inmovilización en el soporte agar-agar es necesario trabajar con concentraciones más altas al 1,5% por cuanto esta no gelifica al ponerse en contacto con la solución endurecedora y no se produce la inmovilización con ninguna de las enzimas proteolíticas debido a que fue una concentración muy baja de este polímero,

- Para poder reutilizar la enzima inmovilizada en el soporte agra-agar se debe emplear una concentración superior a 3,5% para que contengan mayor cantidad de enzima adherida en su interior por retención física fueron y sus membranas sean más fuertes y estables.

- Utilizar frutas entre un 25-50% de madurez fisiológica porque las enzimas se encuentran presentes en mayor concentración en las frutas inmaduras.

- Aplicar métodos de purificación de enzimas para obtener mayores porcentajes de actividad proteolítica, reutilización y estabilidad el almacenamiento.

- Trabajar con una concentración mayor a 1:1 de enzima para preparar la solución, porque al mezclar con el soporte licuado, esta concentración baja, provocando que dentro del polímero quede inmovilizada menos cantidad de enzima, lo que se verá repercutido en la actividad proteolítica y el tiempo de reacción sobre el sustrato, ya que la concentración de enzima es inversamente proporcional al tiempo.

- Validar los métodos de secado e inmovilización utilizados en la presente investigación, con el estudio de otros soportes, concentraciones, extracción de enzimas y, a la vez estudiar la estructura de los mismos y su influencia en la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada.

VII. RESUMEN Y SUMARY.

7.1 RESUMEN

En la ciudad de Guaranda, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar, se realizó la investigación que tuvo como objetivo general "Extraer e inmovilizar enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas (papaya, higo, piña) mediante dos métodos y su aplicación en la industria alimentaria, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal de Bolívar",

Empleando procedimientos sencillos para la extracción y sin aplicar métodos de purificación de enzimas, se trabajó con la papaína, ficina y bromelina, y como soportes se empleó los biopolímeros agar-agar para el método de atrapamiento en gel y el alginato de sodio para el método unión a un soporte, a concentraciones o niveles de 1,5% y 3,5%.

Para el presente trabajo se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) de A*B con 3 repeticiones, dónde el factor A correspondió a los soportes para la inmovilización y el factor B para las enzimas proteolíticas, llegando a determinar al mejor tratamiento para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada a la combinación (alginato 3,5% + papaína) con un índice del 96,97% de enzima encapsulada o inmovilizada, debido a que una concentración mayor del biopolímero o soporte retiene en su membrana a las enzimas y no permite el paso de estas a la solución endurecedora en el proceso de la inmovilización.

Se valoró la actividad proteolítica de las enzimas inmovilizadas (papaína, Ficina y bromelina), en tres tipos de sustratos, leche, cerveza y carne, obteniéndose como mejor tratamiento a la combinación (alginato 1,5% + papaína).

Después de realizar cinco corridas experimentales bajo las mismas condiciones para evaluar la reutilización en tres tipos de sustratos (leche, cerveza y carne), se determinó el 57,8 % de actividad residual promedio.

Se evaluó el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento al día 15 y al día 30 con el 64,9% y el 53,4% de actividad proteolítica promedio sobre los sustratos (leche, cerveza, carne).

Se estableció que para inmovilizar 25 mg de la enzima papaína es necesario invertir 14,24 USD y el precio de venta con el 30% de rentabilidad corresponde a 18,51 USD, lo que nos permite tener una relación costo / beneficio de 1,30 USD, es decir que por cada dólar invertido vamos a tener una utilidad de 0,30 ctvs, esto con respecto al mejor tratamiento correspondiente a la combinación (alginato 1,5% + papaína), precio con el que obtendríamos grandes ventajas al poder reutilizar las enzimas y trabajar en procesos con condiciones más amplias en cuanto a rangos de a pH y temperatura, ya sea para la aplicación en alimentos como lo propone el trabajo de investigación, así como también en el campo del análisis instrumental para el diseño de biosensores, o para el tratamiento de efluentes procedentes de las empresas agroindustriales.

7.2 SUMARY

In the Guaranda city, in the Biotechnology Laboratory, Agricultural Sciences Faculty of State University of Bolivar, research was aimed at general objective "Extract and immobilized proteolytic enzymes present in three types of fruit (papaya, fig, pineapple) by two methods and their application in the food industry, in the Biotechnology laboratory, Bolivar State University"

Using simple procedures for extraction and without using enzyme purification methods are worked with papain, ficin and bromelain were used as supports and biopolymers agar-agar for gel entrapment method and sodium alginate for binding to a support method, at concentrations or levels of 1,5% and 3,5%.

For this work we applied a design randomized complete block (DBCA) of A * B interactions with 3 replications, where the factor A corresponded to the supports for immobilization and factor B to proteolytic enzymes, leading to determine the best treatment for variable percentage of immobilized enzyme combination (3,5% alginate + papain) with a rate of 96,97% of encapsulated or immobilized enzyme, because a higher concentration of the biopolymer or carrier retained in the membrane enzymes and does not allow passage of these to the hardening solution in the process of immobilization.

The proteolytic activity was assessed from the immobilized enzymes (papain, ficin and bromelain), three types of substrates, (milk, beer, and meat), obtaining as best combination treatment (1,5% alginate + papain).

After making five experimental runs under the same conditions to evaluate the reuse of three types of substrates (milk, beer and meat), we determined the residual activity 57,8% average.

Percentage of the proteolytic activity of the immobilized enzyme subjected to storage was evaluated at day 15 and at day 30 with 64,9% and 53,4% average proteolytic activity on substrates (milk, beer, meat).

We set 25 mg of immobilized enzyme papain need to invest 14,24 USD and the sale price with 30% return up to 18,51 USD, which gives us a cost / benefit ratio of 1,30 USD, which means that for every dollar we will have a profit of 0,30 cents, this about the best treatment for the combination (1.5% alginate + papain), price that would obtain great advantages to be able to reuse enzymes and processes work in wider conditions concerning pH and temperature ranges, whether for food applications as proposed in the research work as well as in the field of instrumental analysis for designing biosensors or for the treatment of effluents from agro-industrial companies.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Arroyo M. (2008) "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones" Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España. 16p.
- Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. (2005) "Papain hydrolysates of casein:molecular weight profile and encapsulation in lipospheres" J. Sci, Food Agric, Estados Unidos. 84 p.
- Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Butterfield DL. (2008) "Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly(ether)sulfone membranes through the avidin-biotin linkage" J. Memb. Sci, Estados Unidos. 241-252 p.
- Cabra J y Sánchez M. (2007) "Biotecnología para el desarrollo en Colombia" Mercado y consumo, Innovación y ciencia Vol. VI, No 3. 44-52 p.
- Carrera J. (2006) "Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal" Módulos de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, Colombia. 55p.
- FAO (2013) "ficha técnica higo"
- Gacesa P. y Hubble J. (2006) "Tecnología de la Enzimas", Zaragoza. España. 80p.
- García J. (2012) "Biología en la línea 2000"
- Godfrey T y Reichelt J. (2011) Industrial Enzymology.
- Goldstein L. (2006) "Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems". Methods Enzymol, Estados Unidos. 397-443 p.
- Herrera C, Bolaños N, (2010) "Manual de Química de Alimentos", Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 55p.

- Honda Y, Kako M, Abiko K. y Sogo Y. (2008) Industrial Application of immobilized enzymes,
- Tanaka, A. et al. eds. Marcel Dekker, pág. 209-234.
- Illanes A. (2009) "Biotecnología de Enzimas", Ediciones Universitarias. Universidad Católica de Valparaíso.
- Izquierdo y De la Riva G. (2009) "Plantbiotechnology and food security in Latin América and the caribbean" Electronic Journal of Biotechnology.
- Klei H, Sundstrom, D.W.; Shim D, 2005) Immobilization of enzymes by microencapsulation en Immobilized cells and enzymes: a practical approach J. Woodward,
- Lin H, Wang H, Xue C, Ye M. (2008) Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. Enz. Microb. Technol. 2002; 31: 588-592.
- Mansour E. y Dawoud F. (2003) "Inmovilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure" 35p
- Pestano B. (2005) El Cultivo de la Papaya (Primera parte)
- Roland J.F. (2005) Requirements unique to the food and beverage industry en Pitcher, W.H. et al. (eds.) Immobilized enzymes for food processing, CRC Press, Boca Raton, pp. 55-80.
- Scouten W.H, Luong, J.H.T, Brown, R.S. (2005) "Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design", Trends Biotechnol. 178-185 p.
- Schmidt H y Pennacchiotti I, (2011) "Las enzimas en los alimentos, su importancia en la química y la tecnología de los alimentos", Colombia. 55p.
- Taylor R. (2007) "Protein Immobilization: fundamentals and applications", Marcel Dekker, New York. 65p.
- Tucker G. y Woods L.(2010) Eds . "Enzymes in Food Processing", Blackie and Son Ltd. London. 73p.
- Wiseman A. (2006) "Hahdbook of enzyme biotechnology", 2da edición, England. 45p.

- Whithaker JR. (2009) “Effect of substrate concentration on rates of enzyme catalyzed reaction In: Principles of enzymology for the food science”, Marcel Dekker, California. 95p.
- Won K. y col. (2005) “Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads” 40p.
- http://www.dietaynutricion.net/informacion-utricionalde/papaya/, (2013).
- http://www2.udec.cl/~lilherna/enzimas.html, (2012).
- http://sotelo-ficus.blogspot.com/p/valor-nutricional-del-higo-100gr.html (2013).
- http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/pina/(2013).
- http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/pina.pdf (2013).

ANEXOS

ANEXO Nº 1: Ubicación del experimento



ANEXO Nº 2: Datos experimentales

2.1 Variable Porcentaje de enzima inmovilizada

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	61.73	63.29	63.38
5	A_2C_2	69.56	64.27	61.83
6	A_2C_3	55.95	58.24	58.36
7	B_1C_1	84.87	82.25	81.76
8	B_1C_2	85.42	86.18	84.76
9	B_1C_3	88.3	89.74	87.46
10	B_2C_1	96.75	96.65	96.6
11	B_2C_2	93.76	94.37	93.98
12	B_2C_3	91.07	90.34	90.82

2.2 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato leche)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	85.8	86.13	84.9
5	A_2C_2	75.55	75.89	76.68
6	A_2C_3	47.18	46.73	47.8
7	B_1C_1	85.51	86.25	87.15
8	B_1C_2	79.55	80.5	79.89
9	B_1C_3	52.36	56.52	55.28
10	B_2C_1	58.44	59.22	57.2
11	B_2C_2	67.67	68.06	66.43
12	B_2C_3	38.56	38.39	38.68

2.3 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato cerveza)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	6.93	7.25	6.19
5	A_2C_2	1.71	0.65	3.26
6	A_2C_3	1.96	3.99	2.53
7	B_1C_1	24.29	22.00	23.39
8	B_1C_2	11.57	13.45	10.35
9	B_1C_3	10.51	13.04	12.39
10	B_2C_1	21.60	20.95	22.25
11	B_2C_2	10.27	7.66	7.99
12	B_2C_3	1.96	3.99	2.53

2.4 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada (sustrato carne)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	85.80	86.13	84.90
5	A_2C_2	76.77	82.97	81.55
6	A_2C_3	76.06	76.24	76.51
7	B_1C_1	96.25	96.96	94.93
8	B_1C_2	90.94	91.38	91.65
9	B_1C_3	92.62	90.85	92.54
10	B_2C_1	92.98	93.77	93.42
11	B_2C_2	87.40	85.54	88.11
12	B_2C_3	88.46	90.76	89.61

2.5 Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato leche)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	74.84	73.82	74.08
8	B_1C_2	72.35	71.94	71.96
9	B_1C_3	71.90	71.41	70.80
10	B_2C_1	71.87	71.26	71.33
11	B_2C_2	67.82	68.16	71.30
12	B_2C_3	63.29	63.12	63.98

2.6 Variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato cerveza)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	66.78	70.00	65.26
8	B_1C_2	47.59	50.30	54.66
9	B_1C_3	29.46	32.35	32.09
10	B_2C_1	68.15	63.35	62.27
11	B_2C_2	41.27	47.15	45.38
12	B_2C_3	25.24	17.35	18.63

2.7 Variable Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada (sustrato carne)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	72.50	72.14	73.79
8	B_1C_2	72.91	72.83	72.15
9	B_1C_3	52.85	52.73	52.63
10	B_2C_1	67.05	66.48	67.46
11	B_2C_2	66.21	65.82	65.14
12	B_2C_3	50.45	50.20	49.04

2.8 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato leche)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	74.26	74.15	72.61
8	B_1C_2	73.01	68.33	68.64
9	B_1C_3	65.75	63.22	66.46
10	B_2C_1	70.91	69.68	71.56
11	B_2C_2	68.03	69.21	66.81
12	B_2C_3	67.14	65.43	66.27

2.9 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato cerveza)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	64.81	63.33	63.24
8	B_1C_2	63.57	53.59	57.01
9	B_1C_3	47.89	60.48	41.73
10	B_2C_1	64.43	46.06	66.67
11	B_2C_2	53.21	53.36	54.58
12	B_2C_3	43.65	41.49	43.88

2.10 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 15 (sustrato carne)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	76.49	76.02	73.97
8	B_1C_2	71.88	72.98	73.41
9	B_1C_3	67.67	69.09	56.62
10	B_2C_1	74.26	74.84	73.07
11	B_2C_2	71.90	73.83	72.03
12	B_2C_3	67.77	67.92	66.36

2.11 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato leche)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	59.84	59.79	59.04
8	B_1C_2	56.56	54.41	53.98
9	B_1C_3	55.91	53.39	53.16
10	B_2C_1	56.06	55.57	54.73
11	B_2C_2	52.22	51.53	54.04
12	B_2C_3	52.08	51.14	52.20

2.12 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato cerveza)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	44.97	45.97	47.24
8	B_1C_2	42.96	41.83	45.86
9	B_1C_3	42.64	39.39	43.38
10	B_2C_1	43.77	45.74	44.90
11	B_2C_2	42.59	40.00	40.29
12	B_2C_3	40.48	38.43	40.20

2.13 Variable Porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento día 30 (sustrato carne)

Nro. Tratamiento	Código	R1	R2	R3
1	A_1C_1	0	0	0
2	A_1C_2	0	0	0
3	A_1C_3	0	0	0
4	A_2C_1	0	0	0
5	A_2C_2	0	0	0
6	A_2C_3	0	0	0
7	B_1C_1	74.26	73.17	77.27
8	B_1C_2	67.19	72.98	73.41
9	B_1C_3	54.04	51.26	52.08
10	B_2C_1	71.90	73.83	72.03
11	B_2C_2	56.16	55.11	54.58
12	B_2C_3	49.75	48.55	48.74

ANEXO Nº 3: DETERMINACIÓN DE PROTEINAS "METODO DE BRADFORD"

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este étodo es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Azul de coomasie G-250	5 mg
Etanol	2.5 ml
Ac. fosfórico	5 ml
agua	Hasta 50 ml

Mezclar en el orden indicado, disolver con agitación y a continuación filtrar.

MÉTODO

1-Preparar la curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 60 μg; de tal manera que el volumen final en cada tubo sea de 300 μl.

2- Mezclar para ello el volumen adecuado de la disolución madre de albúmina bovina de un 1 mg/ml y el correspondiente volumen necesario de agua, de acuerdo con la siguiente tabla.

3- Añadir 1 ml del reactivo de Bradford a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla IV. Dejar a temperatura ambiente y leer Absorbancia a 595 nm frente al blanco. El color es estable 1 hora.

Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

	Reactivos			Resultados	
Tubos	Estándar (0,5 mg/ml)	H_2O	R. Bradford	A_{595} nm	[proteína]
Blanco	0 µl	100 µl	1 ml		
1	25 µl	75 µl	1 ml		
2	50 µl	50 µl	1 ml		
3	75 µl	25 µl	1 ml		
4	100 µl	0 µl	1 ml		
	Muestras				
M1	100 µl	0 µl	1 ml		
M2	100 µl	0 µl	1 ml		

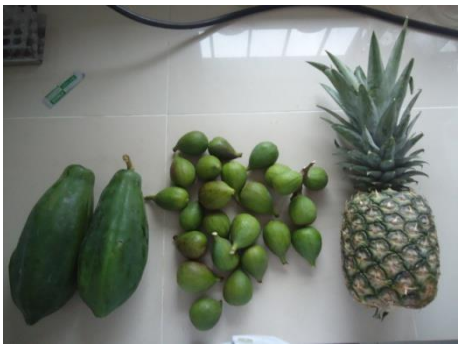
4- Representar la curva estándar.

5- Calcular el coeficiente de extinción.

6- Calcular las concentraciones de proteínas de las muestras.

ANEXO Nº 4: Fotografías del desarrollo de la investigación

RECEPCIÓN



LAVADO



Papaya



Higo



Piña

ANÁLISIS



ºBrix



pH

EXTRACCIÓN



Papaina



Ficina



Bromelina

SECADO



Temperatura controlada



Ficina y bromelina



Papaina

PREPARACIÓN



Solución de enzimas



Soluciones endurecedoras



Mezcla enzima-soporte

INMOVILIZACIÓN



Papaína



Ficina



Bromelina

APLICACIÓN



Sustratos a baño maría 40-42 °C



Sustrato leche



Molturado de la carne



Sustrato Carne



Sustrato Cerveza



Medición de la turbidez

ANÁLISIS DE PROTEÍNA



Preparación del reactivo



Pipeteado de la muestra



Adición del reactivo



Reposo



Insertado de la celda



Medición de la absorbancia

VISITA DE CAMPO





