

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



“NORMALIZACIÓN DE LA ENZIMA PAPAINA
INMOVILIZADA POR LA TÉCNICA DE ATRAPAMIENTO EN
GEL”

Trabajo de Graduación presentado por :
TANIA ETHEL CUADRA ZELAYA.

para optar al Grado de :
LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

Junio de 2000

San Salvador, El Salvador, Centroamérica

Universidad de El Salvador

Rectora :

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria General :

Lic. Lidia Margarita Muñoz Vela

Facultad de Química y Farmacia

Decana :

Lic. María Isabel Ramos de Rodas

Secretaria :

Lic. Ana Arely Cáceres Magaña

Asesora :

M.Sc. Sonia Maricela Lemus Martínez

Jurado Calificador :

Lic. Carmen Olivia Dimas

Lic. María Cristina Seoane de Rodríguez

MPDS Armando Nelson Genovez Leonor

San Salvador

Junio de 2000

El Salvador

AGRADECIMIENTOS

Es mi mayor deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas :

Ing. Manuel Saavedra de la Gerencia Técnica, Licda. Sulma de Serpas del Departamento de Control de Calidad, Sr. Alfredo Molina Jefe de Bodegas y todo el amable personal de Cervecería la Constancia S.A. de C.V., por la valiosa asesoría técnica y material brindada, sin la cual no habría sido posible la realización de partes muy importantes de este trabajo.

Licda. Sonia Marisela Lemus por sus sugerencias, motivación y confianza durante la realización de todo el trabajo.

A mis primas por su enorme ayuda, apoyo y comprensión en todos los momentos en que necesite de su auxilio. *Karla y Mariel D. Zelaya*

A mis amigos y amigas, porque la ayuda y el esfuerzo que me brindaron me ayudaron a salir adelante en muchas situaciones difíciles.

Dedicatoria

A Dios Tododeroso,
A mi abuelita Maria de Los Angeles Zelaya Torres
A mi papi Juan Agustín Cuadra
A mi mami Norma Zelaya de Cuadra
A mis hermanas Florence Juana María
y Carmen Dinora Cuadra Zelaya.
Por todo el amor que siempre me dan.

Indice

Contenido	Pág.
Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Capítulo I. Marco Teórico	
1. Generalidades de la Inmovilización de Enzimas.....	5
1.1 Definición.....	5
1.2 Marco Histórico.....	6
1.3 Propiedades y Beneficios de las Enzimas Inmovilizadas.....	8
1.3.1 Propiedades.....	8
1.3.1.1 Estabilidad.....	8
1.3.1.2 Propiedades Cinéticas.....	9
1.3.2 Beneficios.....	10
1.4 Requerimientos Básicos.....	11
1.5 Clasificación de las Técnicas de Inmovilización de Enzimas.....	12
1.5.1 Técnica de Atrapamiento en Gel.....	13
1.5.1.1 Ventajas y Desventajas de la Técnica de Atrapamiento en Gel.....	14
1.6 Soportes utilizados para la Inmovilización de Enzimas.....	15
1.6.1 Agar- Agar.....	16
1.6.2 Almidón.....	17
1.6.3 Hidroxietilcelulosa.....	18
1.7 Reactores.....	19
1.7.1 Reactores Discontínuos.....	19
1.7.2 Reactores Contínuos.....	21
2. Enzima Papaína.....	23
2.1 Generalidades.....	23

2.1.1 Aplicaciones Industriales de la Papaína.....	24
2.1.1.1 Industria de la Cerveza.....	24
2.1.1.2 Posibilidades Potenciales de Utilización de la Papaína.....	26
2.1.2 Preparación y Cristalización.....	26
2.2 Estructura.....	27
2.3 Propiedades Físicas.....	29
2.3.1 Estabilidad.....	30
2.4 Sitio Activo de la Papaína.....	30
2.5 Propiedades Enzimáticas.....	31
2.5.1 Métodos de Ensayo.....	31
2.5.2 Especificidad.....	33
2.5.3 Estudios Cinéticos.....	35
2.5.3.1 Efecto del pH.....	35
2.5.3.2 Efecto de la Temperatura.....	36
 Capítulo II. Metodología Experimental	
1. Material, Equipo y Reactivos.....	38
1.1 Inmovilización de la Enzima	38
1.2 Cambios en las Propiedades de la Enzima Libre e Inmovilizada.....	39
1.3 Montaje de Reactores Enzimáticos	39
2. Inmovilización de la Enzima	40
2.1 Inmovilización en Agar-Agar	40
2.1.1 Preparación del Soporte	40
2.1.2 Mezcla Enzima-soporte	40
2.1.3 Moldeo de la Enzima	41
2.1.3.1 Moldeo de la Enzima en Cilindros	41
2.1.3.2 Moldeo de la Enzima en Placa	42
2.2 Inmovilización en Almidón	42
2.2.1 Preparación del Soporte	42

2.2.2 Mezcla Enzima-soporte	43
2.2.3 Moldeo de la Enzima	43
2.2.3.1 Moldeo de la Enzima en Cubos	43
2.2.3.2 Moldeo de la Enzima en Placa	44
2.3 Inmovilización en Hidroxietilcelulosa	44
2.3.1 Preparación del Soporte	44
2.3.2 Mezcla Enzima-soporte	45
2.3.3 Moldeo de la Enzima	45
2.3.3.1 Moldeo de la Enzima en Cubos	45
2.3.3.2 Moldeo de la Enzima en Placa	46
3. Cambios en las Propiedades de la Enzima Libre e Inmovilizada.....	47
3.1 Ensayo General de Actividad	47
3.1.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH	50
3.1.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura.....	50
4. Montaje de Reactores Enzimáticos	52
4.1 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Continuo del Substrato	52
4.1.1 Montaje del Reactor Enzimático Tipo Columna Empacada	52
4.1.2 Operación del Reactor Enzimático	52
4.1.3 Seguimiento de la Reacción Enzimática	53
4.1.3.1 Método Forzado de Estabilidad en Cerveza Envasada.....	54
4.2 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Discontinuo de Substrato.....	55
4.2.1 Montaje y Operación del Reactor Tipo Tanque agitado.....	55
4.2.2 Seguimiento de la Reacción Enzimática	55
Capítulo III Análisis de Resultados	
1. Resultados	58
1.1 Inmovilización de la Enzima	58
1.2 Cambios en las Propiedades de la Enzima Libre e Inmovilizada	62
1.2.1 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH	62

1.2.1.1 Distribución "t" de student aplicada al Ensayo de Actividad en Función del pH	64
1.2.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 9)	65
1.2.2.1 Distribución "t" de student aplicada al Ensayo de Actividad en Función de la Temperatura (pH 9)	66
1.2.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 6).....	68
1.2.3.1 Distribución "t" de student aplicada al ensayo de Actividad en Función de la Temperatura (pH 6)	69
1.3 Montaje de Reactores Enzimáticos	70
1.3.1 Trabajo de Sistema Inmovilizado a Flujo Continuo del Substrato	70
1.3.2 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Discontinuo del Substrato.....	75
2. Discusión de Resultados	78
2.1 Inmovilización de la Enzima	78
2.2 Cambios en las Propiedades de la Enzima Libre e Inmovilizada	80
2.2.1 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH	80
2.2.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 9)	81
2.2.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 6).....	83
2.3 Montaje de Reactores Enzimáticos	84
2.3.1 Trabajo de Sistema Inmovilizado a Flujo Continuo del Substrato	84
2.3.2 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Discontinuo del Substrato.....	87
Conclusiones	89
Recomendaciones	91
Bibliografía.....	93
Anexos.....	97

Indice de Tablas y Cuadros

Tabla	Pág.
1. Clasificación de los Métodos Empleados para la Inmovilización de Enzimas.....	12
2. Aplicaciones Industriales de la Papaína.....	25
3. Composición en Aminoácidos de la Papaína.....	28
4. Propiedades Físicas de la Papaína.....	29
Cuadros.	
1. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Agar-agar.....	59
2. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Hidroxietilcelulosa.....	60
3. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Almidón.....	61
4. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de pH.....	62
5. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de pH.....	63
6. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de Temperatura (pH 9).....	65
7. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de Temperatura (pH 9).....	65
8. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de Temperatura (pH 6).....	68
9. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada Frente a los Cambios de Temperatura (pH 6).....	68
10. Actividad Clarificadora de la columna con papaína inmovilizada sobre flujo continuo de substrato cerveza	73
11. Evaluación de las muestras de cerveza tratadas por el Método Forzado de Estabilidad en Cerveza Envasada Modificado.....	75
12. Efecto Coagulante de la Enzima Papaína Inmovilizada sobre Substrato Leche.....	76

Índice de Esquemas y Figuras

Figura	Pág.
1. Reactores discontinuos.....	20
2. Reactores tipo tanque con agitación continua o de mezcla completa.....	21
3. Reactores de flujo continuo.....	22
4. Secuencia de Aminoácidos en la Papaína.....	28
5. Efecto del pH en la papaína.....	35
6. Formación del complejo tiolato imidazólico.....	36
7. Atrapamiento de la Enzima en Cilindros.....	41
8. Método Modificado de Kunitz.....	51
9. Forma de Agitación del Reactor en Lote	56
10. Reactor tipo columna empacada para utilizar a flujo continuo de substrato	72
11. Reactor tipo columna tanque agitado para utilizar a flujo discontinuo de substrato	77
Esquema	
1. Reactor utilizado en pruebas con enzima inmovilizada en cilindros.....	71

Indice de Gráficos

Gráfico

1. Efecto del Cambio de pH sobre la Actividad Enzimática con el proceso de Inmovilización.....	63
2. Efecto del Cambio de Temperatura a pH 9 sobre la Actividad Enzimática, y la influencia del proceso de Inmovilización.....	66
3. Efecto del Cambio de Temperatura a pH 6 sobre la Actividad Enzimática, y la Influencia del proceso de inmovilización.....	69
4. Efecto Clarificador de la Enzima Inmovilizada a Flujo Continuo de Substrato Cerveza....	74
5. Tiempo necesario para la Coagulación de Substrato Leche con Enzima Inmovilizada.....	78

Indice de Anexos

Anexo	Pág.
1. Preparación de Reactivos para el Ensayo de Actividad.....	98
2. Preparación de Buffer Fosfato a pH 5.5, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0.....	100
3. Proceso de Elaboración de la Cerveza	101
4. Ensayo para la Determinación de la Estabilidad de la Cerveza por Método Forzoso utilizado por La Constancia S.A. de C.V.	103
5. Gráfico de Relación entre Medidas de Turbidez en Unidades EBC y Absorbancia en Espectro Visible	107
6. Certificados de Análisis de Materias Primas y Reactivos	108
7. Esquema de Cálculo	125
8. Ensayos de Hipótesis y Significación Estadísticos	129

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
Ej.	Ejemplo
min.....	Minutos
s.n.t.	Sin notas tipográficas
p.	Página
TCA.....	Ácido Tricloroacético
Tr.	Traducción

Pesos y Medidas

Pesos y medidas	Significado
°C	Grados Celsius
cm.	Centímetro
g.	Gramo
h.	Hora
L.	Litro
mg.....	Miligramo
min.	Minutos
ml.	Mililitro
mm..	Milímetros
nm.	Nanómetro
seg.	Segundos

INTRODUCCIÓN

La papaína es una enzima proteolítica encontrada en el látex de papaya que tiene muchas aplicaciones y funciones en una gran variedad de industrias. Según los proveedores es la enzima con actividad proteolítica más potente en el mercado y no tiene un sustituto directo.

El uso de la papaína al igual que la mayoría de enzimas se ve afectado por su costo elevado y limitada estabilidad, además su aplicación es restringida en muchos casos por causar la hidrólisis excesiva de los substratos, dando lugar a la formación de productos con características no totalmente esperadas.

El inmovilizado de enzimas es una técnica que permite: ayudar a prevenir la hidrólisis excesiva, emplear la enzima en forma continua, fácil de recuperar y reutilizar en nuevos procesos, proporcionando las particularidades que den apertura a nuevas posibilidades de utilización.

Dadas las consideraciones anteriores en este trabajo se inmovilizó la enzima papaína aplicando la técnica de atrapamiento en gel, ensayando este proceso con tres soportes diferentes.

Se realizaron ensayos simultáneos de actividad de la enzima libre y la inmovilizada, a diferentes pH y temperaturas, determinando así las condiciones

óptimas de funcionamiento de cada una de ellas, y estableciendo sus similitudes y diferencias.

Finalmente se montaron dos minireactores enzimáticos para poder comprobar las propiedades proteolíticas sobre los substratos cerveza y leche, así como las características de utilización continua, recuperación y reutilización, propias de la enzimas inmovilizadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Normalizar la enzima papaína inmovilizada por la técnica de atrapamiento en gel.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Determinar el tipo de soporte y forma más adecuados para la inmovilización de la enzima.

2.2 Establecer las condiciones experimentales para realizar la inmovilización de la enzima por medio de la técnica de atrapamiento en gel.

2.3 Determinar y comparar las condiciones óptimas de actividad de la enzima soluble e inmovilizada a diferente pH y temperatura.

2.4 Montar un reactor adecuado para la utilización de la enzima inmovilizada.

2.5 Demostrar el uso continuo de la enzima inmovilizada en diferentes procesos.

Capítulo I

Marco Teórico

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

1.1 DEFINICIÓN.

La definición del término inmovilización es: El confinamiento físico o localización de moléculas enzimáticas durante un proceso catalítico continuo. ⁽²³⁾

“...La palabra continuo se enfatiza para limitar la definición a un espectro razonable. A pesar de que una enzima contenida en un vaso de precipitado o vial puede ser considerada una enzima inmovilizada, no se considera que lo sea dentro del contexto de la definición porque esta no puede ser utilizada eficientemente en una manera continua. Esto es, que una enzima en un vaso de precipitado o vial no puede ser usada fácilmente como un reactor enzimático continuo en el cual un substrato es adicionado y un producto es removido continuamente. Una enzima contenida en una celda de ultrafiltración o fibra tejida se considera inmovilizada dentro del alcance de la definición. En este caso la enzima está físicamente localizada en un lugar específico (Definido por la membrana semipermeable y sus paredes), donde la membrana permite el libre paso de el producto y un modo operacional continuo.”[†]

[†] ZABORSKY, Oskar. Inmovilized Enzymes. 1a. Edición. Cleveland, Ohio. Editorial CRC Press Inc. 1973. p. 1.

1.2 MARCO HISTÓRICO

El uso de enzimas en procesos industriales es limitado por diferentes factores : En parte, por el alto costo de las enzimas debido a la dificultad de su aislamiento, su inestabilidad, y al hecho que en la forma libre soluble, ellas usualmente pueden ser usadas solo una vez ⁽¹²⁾ .

A pesar de que el primer caso reportado de una enzima inmovilizada fue hace aproximadamente 70 años, uno de los mayores ímpetus del desarrollo de la tecnología de enzimas inmovilizadas ocurre de mediados a finales de los años 60, coincidiendo cercanamente con el desarrollo, y/o potencial desarrollo, de procesos comerciales utilizando estos agentes. Es importante mencionar algunas de las aplicaciones de esta tecnología que han logrado convertirse en procesos lo suficientemente eficientes como para ser utilizados de manera usual sustituyendo técnicas más costosas o complejas. El primer uso industrial de una enzima inmovilizada sucede en 1969 cuando la compañía Tanaba Seiyaku Ltd., de Japón inicia el proceso de aminociclasa inmovilizada, logrando, a diferencia del proceso químico, aislar por completo la forma Levógira del aminoácido de su isómero Dextrógiro. A principios de los años setenta se desarrollan los procesos de producción de los ácidos L-aspártico y L-málico utilizando enzimas contenidas en microorganismos completos e involucrando la inmovilización de células completas, dando lugar a un proceso mucho más económico comparado con el proceso utilizando la enzima soluble. Por muchas razones la aplicación más importante de enzimas inmovilizadas en la industria de alimentos actual, se encuentra en la

conversión de glucosa a fructosa por medio de la enzima glucosa isomerasa. Otros usos de la tecnología de enzimas inmovilizadas han sido reportados pero no han sido adaptados ampliamente, e indudablemente al ser esta una tecnología que incentiva el desarrollo de nuevos productos, el mejoramiento de la calidad y la reducción de costos ocupa un lugar muy importante dentro de actividades industriales ⁽⁹⁾, ambientales, analíticas y quimioterapéuticas ⁽²²⁾.

Se han desarrollado diferentes trabajos de investigación a nivel internacional acerca de la inmovilización de la papaína utilizando técnicas como : Unión con enlace covalente de sus derivados con polímeros insolubles en agua, unión covalente con resinas específicas y combinación de técnicas de enlace covalente ; que mostraron, en general, una disminución de la actividad de la enzima ; aunque su uso de manera continua o repetida si fue comprobado. La inmovilización de papaína por enlaces intermoleculares con glutaraldehído mostró una actividad de un 90% en comparación con la actividad de la enzima inicial siendo este un método que cambia radicalmente las propiedades de esta enzima⁽²³⁾.

La papaína inmovilizada covalentemente con ácido poliacrílico representa la primera de las aplicaciones de esta novedosa tecnología en el campo de la cosmética, utilizada de esta manera como exfoliante de las capas superiores y estrato córneo de la piel⁽²³⁾.

Por otra parte el estudio de la inmovilización de la enzima por atrapamiento en gel ha demostrado ser dependiente del método de preparación⁽²³⁾.

1.3 PROPIEDADES Y BENEFICIOS DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

1.3.1 Propiedades

Para hacer el mejor uso de las técnicas disponibles para la inmovilización de enzimas, es esencial conocer los cambios que pueden producirse en las propiedades físicas y químicas de una enzima durante la inmovilización. Los principales cambios observados se relacionan con la estabilidad y propiedades cinéticas de las enzimas, debido al microambiente impuesto por el soporte y los productos de su propia acción (21).

1.3.1.1 Estabilidad

La estabilidad de una enzima inmovilizada depende en general de la naturaleza intrínseca de la enzima y de las condiciones en las que se ha inmovilizado⁽²¹⁾. El incremento de la estabilidad es a menudo citado como una ventaja de la inmovilización enzimática. De un examen superficial de la literatura relativa a enzimas inmovilizadas, es fácil concluir que la inmovilización conduce casi invariablemente a la estabilización⁽¹⁰⁾.

Aunque es imposible deducir una expresión matemática para el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad, pueden verse ciertas tendencias. En el caso de enzimas proteolíticas se observa a menudo un efecto estabilizante, pudiendo ser

atribuido generalmente a una reducción en el grado de autólisis ⁽¹⁰⁾. Son pocos los ejemplos que presentan lo contrario, uno de ellos es la papaína ⁽⁴⁾.

En muchos casos la inmovilización parece conferir algunas ventajas de estabilidad en una enzima. En la práctica, estas son imposibles de predecir sobre una base << a priori >>. La complejidad global de los factores que afectan a la estabilidad enzimática sugiere que, en el presente, la única aproximación factible es el obtener datos experimentales bajo las condiciones a utilizar ⁽¹⁰⁾.

1.3.1.2 Propiedades Cinéticas

La cinética enzimática estudia la forma en que factores físicos y químicos influyen en la actividad enzimática, proporcionándonos mayor conocimiento de la reacción en estudio ⁽²¹⁾.

Se ha demostrado la existencia de cambios en el pH óptimo de una enzima producidos por la inmovilización. En comparación con la actividad de una enzima libre a varios pH, se ha puesto en evidencia que si una enzima está unida a una matriz cargada negativamente, el pH óptimo evoluciona hacia la alcalinidad, es decir, la enzima inmovilizada alcanza la actividad máxima a un pH alcalino aparentemente más alto. De forma similar, para una matriz cargada positivamente el aparente cambio de pH óptimo es hacia el lado ácido ⁽²¹⁾.

Se ha demostrado que la actividad relativa de las enzimas inmovilizadas sobre los substratos de peso molecular elevado es menor que sobre los substratos de peso molecular bajo ⁽²¹⁾.

1.3.2 Beneficios

La especificidad de las enzimas es claramente una consideración importante cuando seleccionamos catalizadores para reacciones de interés comercial. Sin embargo, el costo de producir las enzimas necesarias es a menudo prohibitivo. En este contexto las preparaciones de enzimas inmovilizadas pueden ser más efectivas ya que son recuperables y posiblemente más estables que las enzimas libres. Efectivamente, variables ejemplos notables de la exitosa adaptación de enzimas inmovilizadas han sido documentados ⁽²²⁾.

Existen varias ventajas relacionadas con el uso de enzimas inmovilizadas, que pueden ser consideradas en al menos tres áreas en las que se pueden utilizar :

Aplicaciones analíticas : Comenzando por el uso de electrodos enzimáticos, hasta el análisis automático en los que las enzimas inmovilizadas encuentran gran aplicación ; en el análisis rutinario de un gran número de muestras pequeñas (por ejemplo muestras de sangre) y el control continuo de corrientes de grandes volúmenes de muestra (ej. : urea en suero) ⁽²¹⁾.

Aplicaciones terapéuticas : Todas las aplicaciones en el campo biomédico se encuentran más en el estado de estudios básicos que en el de aplicaciones definitivas, encontrándose las aplicaciones potenciales dentro de dos áreas principales, el reemplazamiento de enzimas y la terapia enzimática ⁽²¹⁾.

Aplicaciones industriales : La mayoría de las aplicaciones industriales propuestas hasta la fecha implican el uso de hidrolasas, debido a que son generalmente más estables y no necesitan coenzimas. Las principales áreas de aplicación son la industria farmacéutica y alimentaria, aunque otras áreas potenciales incluyen el tratamiento de desechos y la química fina ⁽²¹⁾.

En el caso específico de la papaína, la inmovilización es un proceso que le puede proporcionar las características que permitan, hacerla utilizable en procesos continuos, con posibilidad de recuperar y por lo tanto de volver a utilizar en nuevos procesos ; previniendo además la acción hidrolítica excesiva sobre los substratos, proporcionando particularidades que den apertura a nuevas posibilidades de utilización.

1.4 REQUERIMIENTOS BÁSICOS

Para el desarrollo de un proceso utilizando enzimas inmovilizada se requiere de cuatro elementos : la técnica de inmovilización, el soporte, la enzima y el reactor. La elección específica de cada elemento está condicionada por la naturaleza de la

enzima, la aplicación que tendrá el sistema, la factibilidad de recuperación de la enzima y el costo de la misma ⁽¹¹⁾.

1.5 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

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

Tabla 1. Clasificación de los Métodos Empleados para la Inmovilización de Enzimas

Métodos Químicos (Dependientes de la formación de enlaces covalentes)
<ul style="list-style-type: none"> • Acoplamiento de la enzima a polímeros funcionalmente insolubles en agua • Incorporación de la enzima dentro de cadenas crecientes de polímeros • Enlazamiento intermolecular de la enzima con un reactivo multifuncional de bajo peso molecular
Métodos Físicos (Independientes de la formación de enlaces covalentes)
<ul style="list-style-type: none"> • Adsorción de la enzima sobre una matriz insoluble en agua • Atrapamiento de la enzima dentro de una matriz gelatinosa insoluble en agua (atrapamiento en gel) • Atrapamiento de la enzima dentro de una microcápsula permanente o no permanentemente semipermeable • Retención de la enzima dentro de dispositivos especiales dependientes de membranas semipermeables.

Fuente: ZABORSKY, Oskar. Inmovilized Enzymes. 1a. Edición. Cleveland, Ohio. United States. Editorial CRC Press Inc. 1973. p. 3.

Los métodos químicos de inmovilización incluyen cualquiera de aquellos procedimientos que involucren la formación de al menos un enlace covalente (o parcialmente covalente) entre una o varias moléculas enzimáticas y un polímero insoluble en agua. En realidad, normalmente, se forma más de un enlace covalente entre los reactantes ⁽²³⁾.

En los métodos físicos se incluye a todos aquellos procedimientos que involucren la fijación de una enzima en un soporte, sin la formación de un enlace covalente. En estos procedimientos, la inmovilización de las enzimas es dependiente de la operación de ciertas fuerzas físicas (Interacciones electrostáticas, formación de enlaces iónicos, interacciones proteína-proteína, etc.), el atrapamiento en microcompartimientos, o la contención en membranas semipermeables ⁽²³⁾.

1.5.1 Técnica de Atrapamiento en Gel

Esta técnica de inmovilización consiste en dar lugar a la formación de un gel en presencia de la enzima. Las condiciones deben ser idóneas para producir un gel con poros más pequeños que la enzima, de manera que ésta quede atrapada dentro de la matriz del gel ; además estos poros deben ser suficientemente grandes para permitir la difusión y transformación del substrato, y finalmente la liberación del producto ⁽¹²⁾.

1.5.1.1 Ventajas y Desventajas de la Técnica de Atrapamiento en Gel

Las ventajas de la técnica de atrapamiento en gel para la inmovilización de enzimas incluyen la simplicidad experimental, la necesidad de pequeñas cantidades de la enzima para producir un conjugado insoluble en agua, y al hecho de que es un método físico. Ninguna modificación química de la enzima se espera y consecuentemente ningún cambio en las propiedades intrínsecas se anticipa. El método además permite la elección de un considerable número de soportes insolubles en agua con carga neutra. Quizás lo más importante de este método es que permite la preparación de derivados enzimáticos insolubles en agua de formas físicas ampliamente diferentes ⁽²³⁾.

Desventajas de la técnica también existen. Operacionalmente, una buena inmovilización es dependiente de un delicado balance de factores experimentales. La naturaleza física exacta de los polímeros enlazados es a menudo muy importante para la obtención de una alta actividad. La inactivación química y térmica de las enzimas durante la formación del gel también puede suceder. La enzima atrapada en gel a veces necesita ser quebrada o partida en formas adecuadas. Una considerable desventaja de este método es la fuga de la enzima desde el interior del retículo polimérico. Durante la formación de la matriz y el atrapamiento de la enzima, se forman microespacios de diferentes tamaños (microporos), la distribución del tamaño de ellos es determinada ampliamente por el grado relativo de enlazamiento. Entre

mayores son los microporos, mayor será la fuga, pero ésta puede ser reducida por la disminución del tamaño de estos microporos. Severas fugas sucederán especialmente con enzimas inmovilizadas en gel de almidón. Otra desventaja mayor de el método es la limitación a substratos pequeños ; enzimas atrapadas en gel muestran muy poca actividad sobre substratos macromoleculares ⁽²³⁾.

1.6 SOPORTES UTILIZADOS PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Los materiales utilizados como soporte incluyen tanto materiales orgánicos como inorgánicos. Los soportes orgánicos generalmente tienen más sitios de enlace por gramo pero a menudo no tienen las propiedades más deseables de fluidez, y son con frecuencia afectados excesivamente por factores ambientales como pH o deterioro por microorganismos. La celulosa, el almidón, el dextran, la agarosa, el nylon, los polímeros basados en la acrilamida, en el estireno y en el anhídrido maleico son ejemplos típicos de soportes orgánicos ⁽¹²⁾.

Los soportes inorgánicos incluyen vidrios sólidos y porosos, tierras diatomáceas, alúminas, silíceas, pantallas de níquel, bolas de acero inoxidable, arena, rocas y titanio. Estos soportes generalmente tienen menos sitios activos que los soportes orgánicos pero son más estables. Estos con frecuencia tienen mejores propiedades de flujo, y algunos son muy económicos. Los soportes porosos ofrecen mayor área de superficie pero presentan más problemas de difusión en un reactor. En algunos

casos, los materiales orgánicos han sido primero unidos o inmovilizados a soportes inorgánicos. Esta situación frecuentemente tiene la ventaja de permitir la obtención de las propiedades más deseables de los dos tipos de soporte ⁽¹²⁾.

1.6.1 Agar-Agar

El agar (o agar-agar) es un coloide de algas (ficocoloide) extraído de especies del género *Gelidium* y otras agarófitas, todas ellas pertenecientes a las algas rojas (rodófitas). Es una sustancia amorfa y en el comercio se halla en forma de polvo, escamas, bloques rectangulares y haces de tiras delgadas. Es poroso, translúcido, membranoso, de color un tanto amarillento, quebradizo cuando está seco, y flexible cuando está húmedo ⁽¹³⁾.

El agar es el éster sulfúrico de una Galactona lineal. Consta de una cadena larga de residuos de D-galactopiranosos unidos por enlaces 1,3-glicosídicos ⁽¹³⁾.

El agar es insoluble en agua fría, pero se hincha mucho al absorber hasta veinte veces su peso en agua. Se disuelve fácilmente en agua hirviendo y al enfriarse se convierte en un gel firme. Basta 0.5% de agar en agua para la formación del gel ⁽¹³⁾.

El poder de gelación del agar sobresale entre todos los coloides. Aunque el sol de 1% de agar se solidifica aproximadamente a 40°C, su gel no se funde hasta 95°C. Tiene una viscosidad de sol relativamente baja y una transición de sol a gel bien

definida que se realiza cada vez casi a la misma temperatura mencionada (40°C), y es reversible a una temperatura relativamente alta (95°C) ⁽¹³⁾.

El sol 1% de agar en el punto de neutralidad tiene viscosidad de 1.26 con relación al agua, medida con el viscosímetro de Ostwald a 45°C. El sol de agar tiene carga ligeramente negativa ⁽¹³⁾.

El agar en estado seco no se infesta con insectos ni es atacado por microorganismos. En cambio, las soluciones, son medios muy fértiles para la proliferación de bacterias y hongos, por lo cual deben tomarse las precauciones ordinarias par impedir el desarrollo de dichos microorganismos ⁽¹³⁾.

1.6.2 Almidón

El almidón es un polisacárido natural altamente polimérico, compuesto de unidades de glucopiranososa ligadas por enlaces α -glucosídicos. Su fórmula aproximada es $(C_6H_{10}O_5)_n$, en la que n es probablemente mayor de un millar. Se presenta en forma de gránulos blancos, formados por un polímero lineal (amilosa) y un polímero ramificado (amilopectina) ⁽¹³⁾.

Los gránulos de almidón se hinchan progresivamente cuando se calientan en agua a 60-70°C ; se disuelven los polímeros lineales más cortos ; a temperaturas más altas los gránulos se gelatinizan. Con la gelatinización se pierde la birrefringencia, se

desintegra el gránulo y se forma una pasta, un gel o un sol. La temperatura para la gelatinización en el agua fluctúa entre 60 y 80°C ⁽¹³⁾.

Las propiedades coloidales más importantes del almidón en dispersión o en solución acuosa son la transparencia, el color, la viscosidad, fluidez, resistencia del gel, potencia adhesiva y capacidad de formar película ⁽¹³⁾.

1.6.3 Hidroxietilcelulosa

La celulosa hidroxietílica es un éter de celulosa que se expende en forma sólida seca o disuelta en solución acuosa de hidróxido de sodio o en agua ⁽¹³⁾. La forma sólida consiste en un polvo blanco, inodoro e insípido que fluye libremente; se ablanda entre 135 y 140 °C, tiene un pH cercano a 7 ; las soluciones son no iónicas ⁽¹⁷⁾.

Se disuelve con facilidad en agua fría o caliente produciendo soluciones claras uniformes o viscosas; es parcialmente soluble en ácido acético en insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos ⁽¹⁷⁾.

Se parece a la carboximetilcelulosa sódica en el sentido de que es un éter de celulosa, pero difiere en que es no iónica y, por ende, sus soluciones no son influidas por los cationes ⁽¹⁷⁾.

Se usa en farmacia como agente espesante, coloide protector, fijador, estabilizador y suspensor en emulsiones, jaleas y ungüentos, lociones, soluciones oftálmicas, supositorios y comprimidos ⁽¹⁷⁾.

1.7 REACTORES

Un reactor enzimático es básicamente, el recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control ⁽²¹⁾. El reactor provee la unión central entre el lote de alimentación inicial y el producto ⁽⁹⁾.

De acuerdo a las características de manejo del substrato en el sistema los reactores se pueden clasificar en reactores de flujo continuo y flujo discontinuo (o reactores en lotes) ⁽²³⁾.

1.7.1 Reactores Discontinuos

Los reactores discontinuos (Ver figura 1.) son el tipo más común de reactores utilizados en los procesos que emplean enzimas solubles. Una vez completada la reacción, la enzima soluble generalmente no se recupera de la mezcla de reacción y en consecuencia no se reutiliza. Puesto que uno de los principales objetivos de la inmovilización de una enzima es el poder recuperarla para reutilizarla, el uso de

enzimas inmovilizadas en un reactor discontinuo necesita con frecuencia un proceso adicional de separación de la enzima, en el cual se pueden producir pérdidas apreciables de la enzima inmovilizada así como pérdidas de la actividad enzimática debido por ejemplo al secado del material ⁽²¹⁾.

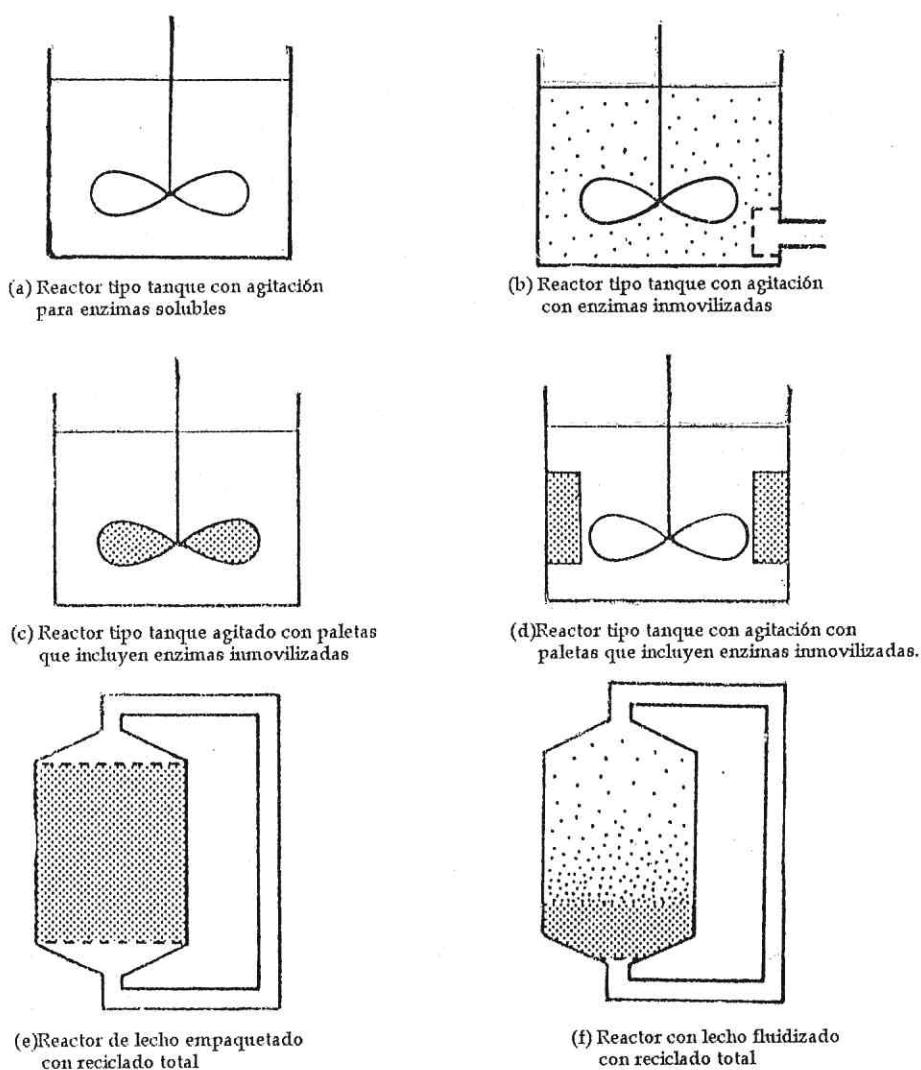


Figura 1. Reactores discontinuos

1.7.2 Reactores Continuos

Con la introducción de las enzimas inmovilizadas, las operaciones continuas se han hecho realidad en las reacciones catalizadas por enzimas, con las ventajas del control automático, facilidad de operación y control de calidad de los productos. Los reactores continuos se pueden dividir en dos grupos básicos, dependiendo del tipo de flujo: Reactores tipo tanque con agitación y alimentación continua (Ver figura 2.) y reactores de flujo pistón (Ver figura 3) ⁽²¹⁾.

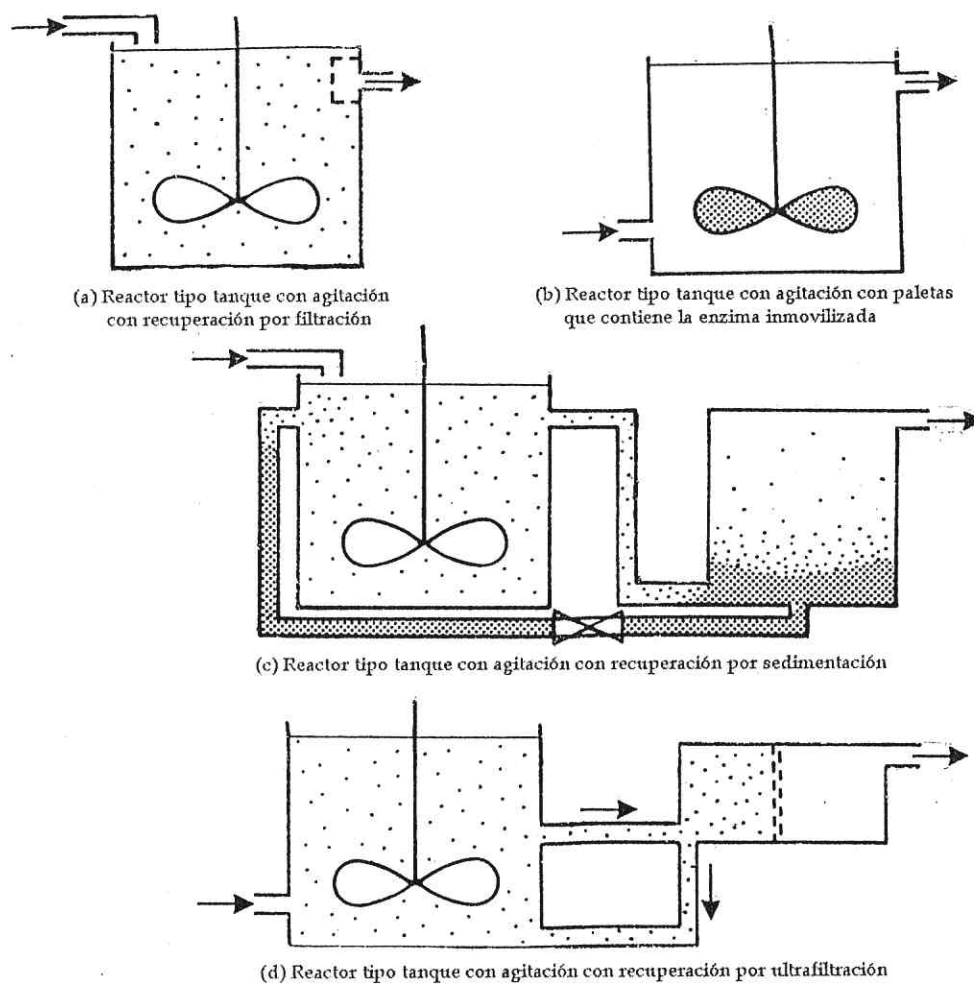


Figura 2. Reactores tipo tanque con agitación continua o de mezcla completa

Los reactores tipo tanque con agitación alimentados continuamente consisten en un tanque con una entrada de soluto y una salida de producto separadas, cuyo grado de conversión puede controlarse regulando el volumen del reactor, la velocidad de flujo y la cantidad y actividad de la enzima inmovilizada ⁽²¹⁾.

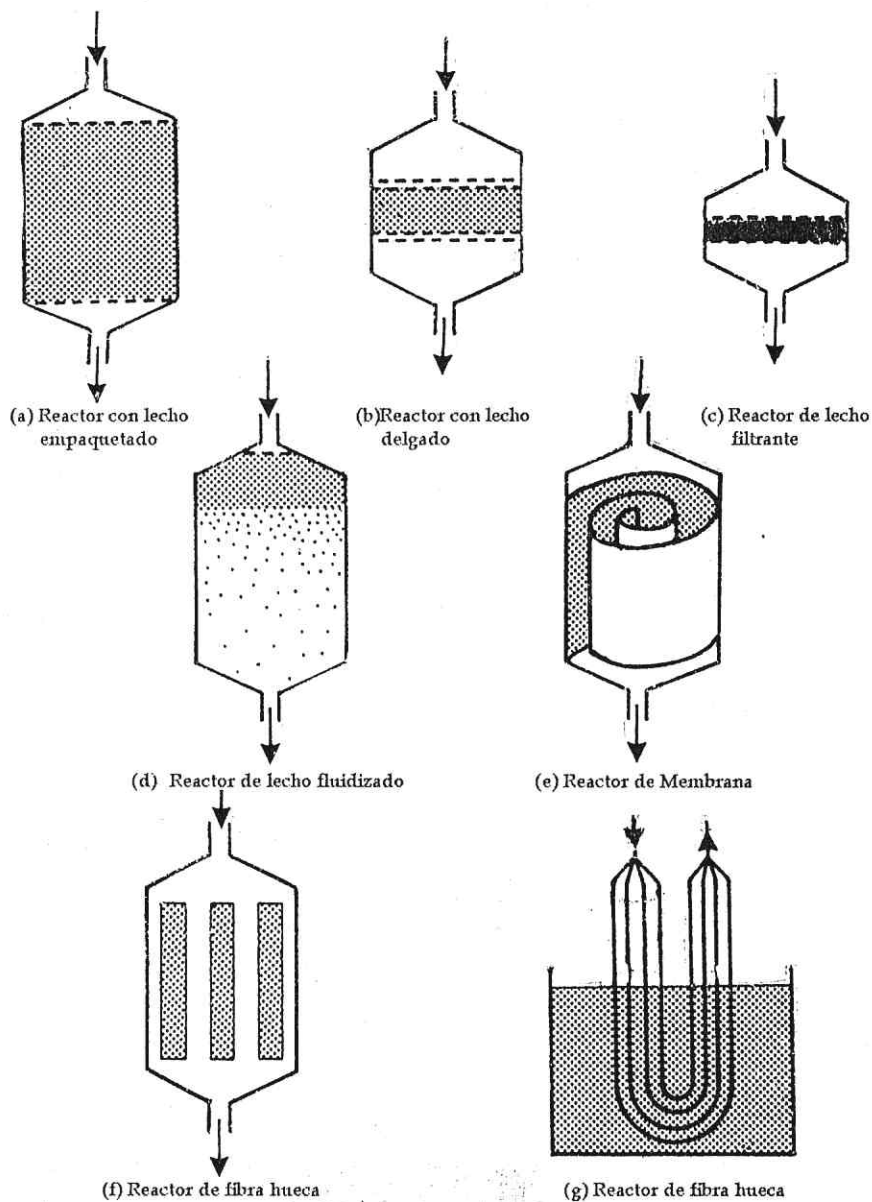


Figura 3. Reactores de flujo continuo

Los reactores de flujo pistón son un resultado directo de las propiedades de las enzimas inmovilizadas que se prestan a ser empaquetadas en columnas. El substrato pasa a través del lecho de la enzima inmovilizada y el producto se obtiene a la salida⁽²¹⁾.

2. ENZIMA PAPAÍNA (EC 3.4.22.2)[†]

2.1 GENERALIDADES

La papaína es uno de los mayores constituyentes proteicos del látex del fruto verde del papayo (*Carica papaya*). El término de papaína fue introducido por Wurzt y Bouchut para describir el principio proteolítico del látex de papaya. Este término es comúnmente aplicado tanto al látex crudo seco, como a la enzima proteolítica cristalina⁽⁵⁾.

La papaína es una proteasa muy bien conocida por su actividad hidrolítica en el eje de las inmunoglobulinas. Esta enzima se cree es producida en carácter de defensa de la fruta contra ser consumida previamente a que sus semillas hallan madurado⁽¹⁾.

Según los surtidores de papaína, es la enzima proteolítica más potente del mercado y no tiene un sustituto directo. También, no se ha producido ni introducido al mercado una enzima sintética con la misma calidad⁽¹⁹⁾.

[†] Número asignado por la Comisión de Enzimas

En El Salvador Existen dos estudios acerca de la producción de papaína refinada, el primero un proyecto del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo Internacional y el otro es el "Estudio de Prefactibilidad para una Planta de Papaína Refinada⁽⁸⁾"; existe además un tercer estudio : "Agroindustrialización de la Papaya en El Salvador". Los tres estudios explican la enorme factibilidad que existe en El Salvador para la Agroindustrialización del cultivo del Papayo a través de la producción de Papaína, y los halagadores resultados económicos que proyecta.

2.1.1 Aplicaciones Industriales de la Papaína

La papaína es una enzima proteolítica que tiene muchas aplicaciones y funciones en una gran variedad de industrias (tabla 2).

2.1.1.1 Industria de la cerveza

La industria cervecera utiliza el 75% de los suministros mundiales totales de papaína ⁽²⁰⁾, esta se utiliza para clarificar o estabilizar la cerveza contra el frío, o sea para prevenir la formación de niebla o enturbiamiento debido al frío en ésta. La niebla debido al frío consiste en partículas muy pequeñas, las cuales resultan de exponer la cerveza a una temperatura menor de 10 °C. La cantidad de niebla formada aumentará a medida que el período de almacenamiento aumente o a medida que la temperatura disminuya. Este problema existe debido a que la cerveza producida es

almacenada por largos períodos a temperaturas bien bajas, aún aquellas que han sido pasteurizadas ⁽⁸⁾.

Tabla 2. Aplicaciones Industriales de la Papaína

Industria	Aplicaciones
Elaboración de la cerveza	Clarificación de la cerveza fría
Alimento	Ablandador de carne, en especias, hidrolizados, en lechería.
Hidrólisis de la levadura	Hidrolizados de levadura
Farmacéutica	Asistente digestivo, producto de limpieza de lentes de contacto, cosméticos.
Alimento Natural	Ayuda Digestiva
Detergentes	Removedor de manchas
Veterinario	Agente antitusivo en diferentes preparaciones
Fotografía	Recuperación de la plata de la película fotográfica
Otros	Preservación de las especias (Actividad antimicrobiana)

Fuente: Executive Summary. The Study Investigated the US and the EU Market for Papain from the 1990- 1993 period. <http://www.tjpd.com/papain.htm>.

La composición de la niebla debida al frío varía de cerveza en cerveza. Esta generalmente consiste en taninos, carbohidratos y proteínas. La porción de taninos de esta niebla generalmente consiste de polifenoles. La porción de carbohidratos consiste en compuestos de bajo peso molecular como glucosa, xilosa y arabinosa. El uso de la papaína tiende a hidrolizar la fracción proteínica de la niebla debida al frío,

la cual es la causante esencial de esta turbidez ; en pocas palabras, las proteínas se pueden disolver gracias a la papaína y, en consecuencia la niebla u opacidad desaparece ⁽⁸⁾.

2.1.1.2 Posibilidades Potenciales de Utilización de la Papaína

Otras posibles aplicaciones que tiene la papaína son : La posibilidad de usarla en la fabricación de quesos, en la coagulación de la leche, en la fabricación de margarina exenta de efecto cuajante, en la panificación, en laboratorios bacteriológicos, en investigación de proteínas, en la industria del papel, etc. ⁽⁸⁾.

Una aplicación nueva, que es potencialmente muy grande, pero que es todavía de poca importancia hoy en día, es en la proteólisis de productos como soya, y pescado ⁽⁸⁾.

2.1.2 Preparación y Cristalización

La papaína es un primer constituyente del jugo y látex de papaya y alcanza su máxima concentración tempranamente en el desarrollo de la fruta ⁽⁵⁾.

El látex de la papaya contiene una mezcla de enzimas : Papaína, quimopapaína y Lisozima principalmente. La papaína puede separarse del resto de enzimas y prepararse rápida y económicamente, en una forma cristalina, en un estado de pureza bueno y en cantidades razonables, a partir del látex seco comercial ⁽⁸⁾.

Se han desarrollado muchos métodos para aislar la papaína del resto de enzimas, entre ellos cabe mencionar el desarrollado por Kimmel y Smith, que es uno de los métodos más usados de extracción de papaína. Este procedimiento comprende una extracción del látex, eliminación del material insoluble en el extracto a un pH 9, precipitaciones con sulfato de amonio seguidas de tres recristalizaciones. La papaína pura obtenida por este método contiene tres componentes: Papaína activa, papaína activable y papaína no activable. Por este método se obtienen aproximadamente 6 a 7 mg. de papaína pura por gramo de látex seco ⁽⁸⁾.

2.2 ESTRUCTURA

La papaína es funcionalmente clasificada como una enzima, hidrolasa y proteasa tiolica ⁽¹⁾. Fue la primera enzima reconocida como miembro de una clase de enzimas proteolíticas que necesitan un grupo sulfhidrilo libre para desarrollar su actividad ⁽⁵⁾. La base de datos SCOP (siglas en inglés para Clasificación Estructural de Proteínas) coloca a esta enzima en la clase de las Proteasas Cisteínicas (Superfamilia: Proteasas Cisteínicas) ⁽¹⁾.

La papaína existe como un monómero, consistente de 212 residuos. Es una proteína simple conteniendo solamente aminoácidos y desprovista de carbohidratos. Todos los aminoácidos usuales están presentes con excepción de la metionina. En la tabla 3 se presenta la composición en aminoácidos de la papaína, y en la figura 4 su secuencia ⁽⁵⁾.

La estructura cristalina determinada a través de la difracción de rayos X de la papaína indica que las dimensiones de su estructura celular son 65.7X50.7X31.5 angströms, desarrolladas en dos estructuras cristalinas una ortorómbica y otra monoclinica ⁽¹⁾.

2.3 PROPIEDADES FÍSICAS

Las principales propiedades físicas de la papaína se encuentran enlistadas en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades Físicas de la Papaína

Propiedad	Valor
Punto isoeléctrico	pH 8.75
Constante de sedimentación, $S_{20,w}$	2.42 ± 0.04 seg.
Constata de difusión, $D_{20,w}$	$10.27 \pm 0.13 \times 10^7$ cm ² seg ⁻¹
Peso molecular	23, 350 Daltons [§]
Coefficiente de Extinción, $E_{1cm}^{1\%}$ 280 nm.	25.0
Rotación óptica (pH 5.7, 25°C) $[\alpha]_D$	-66.7

Fuente: PERLMAN, G.E. LAZLO L. Methods in Enzimology. 1a. Edición. Nueva York. Editorial Academic Press. Vol XIV. 1970. P. 237.

[§] Papain. Karen Albrecht. Department of Chemistry. UWEC. 1996.
[Http ://www.chem.uwec.edu/Chem406/webpages/KAREN/facts.html](http://www.chem.uwec.edu/Chem406/webpages/KAREN/facts.html)

2.3.1 Estabilidad.

La enzima cristalina muestra un alto grado de estabilidad. Como cristales en suspensión en solución de cloruro de sodio, puede mantenerse a 4 °C por varios meses sin pérdida detectable de la actividad. Sin embargo la propiedad más notable de la papaína es su estabilidad cuando se expone a altas temperaturas, solventes orgánicos y reactivos los cuales pueden causar la desnaturalización de otras enzimas. Un hecho conocido desde hace muchos años es que la papaína en polvo resiste el calor seco a 100 °C por 3 horas, y aún en solución muestra una marcada estabilidad frente a la temperatura, por otro lado, es dependiente del pH ya que la enzima es inestable bajo condiciones muy ácidas. La exposición frente a agentes fuertemente desnaturalizantes tales como el ácido tricloroacético al 10% o el clorhidrato de guanidina 6M causa cambios irreversibles en la papaína los cuales para ambos se expresan en un cambio drástico en la rotación óptica y pérdida de la actividad. Similarmente, bajo condiciones ácidas, a valores de pH menores de 2.8 la enzima sufre disminución drástica de la actividad ⁽¹⁶⁾.

2.4 SITIO ACTIVO DE LA PAPAÍNA

La interacción entre enzima y substrato ocurre en la superficie de la molécula de papaína en un surco el cual está situado entre las dos partes de la molécula. La cadena lateral de Cisteína 25 se encuentra en la ranura. si el grupo SH de la cisteína

no se encuentra libre ya sea por bloqueo por metales pesados, por agentes alquilantes o por formación disulfídica, la actividad de la enzima desaparece completamente ⁽⁵⁾. Cercano al grupo sulfhidrico se encuentra el anillo imidazólico de la Histidina 159, el cual se encuentra unido a su vez, a través de puentes de hidrógeno, con la cadena lateral de Asparagina 175 ; dándole forma a la triada catalítica que forma el sitio activo de la papaína ⁽¹⁾.

En ausencia de una adición de activadores, existe una correlación lineal entre la actividad catalítica de la papaína y su contenido tiolico. El desarrollo de la máxima actividad hidrolítica de la papaína requiere de la activación de la enzima. La papaína es activada por una gran variedad de compuestos tiolicos tales como la cisteína y el glutatión, así como por agentes reductores tales como el borato de sodio. Se obtiene la máxima actividad con agentes reductores los cuales pueden actuar también como quelantes. El papel de los quelatos parece restringirse a la remoción de trazas de iones de metales pesados los cuales probablemente se unen al grupo tiolico esencial de la enzima ⁽⁵⁾.

2.5 PROPIEDADES ENZIMÁTICAS

2.5.1 Métodos de ensayo

La efectividad o potencia de una enzima es más útilmente expresada en términos de actividad. Cuando es posible ésta es expresada en unidades de

actividad las cuales se definen en términos del peso de sustrato transformado en producto, en un tiempo determinado. En el caso de la papaína, que es una enzima hidrolítica, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un mol de sustrato en un minuto ⁽⁸⁾.

Actualmente hay tres tipos comunes de ensayos utilizados para medir la actividad de la papaína : El primer grupo de éstos métodos se basa en la hidrólisis de moléculas de bajo peso molecular de sustratos sintéticos ; estos métodos son los más exactos, más caros y menos pertinentes para aplicaciones prácticas. El segundo grupo de estos métodos se basa en el grado de hidrólisis de sustratos proteicos ; existen una gran variedad de éstos métodos debido a tanta combinación de proteínas y metodología a escoger, son los métodos más útiles y confiables siempre que se especifique la naturaleza y fuente de proteína usada así como las condiciones en que se lleva a cabo el ensayo. El tercer grupo de estos métodos están basados en la habilidad de la enzima de coagular la leche, estos métodos son más baratos en términos de materiales, pero no en el tiempo que se toman; se expresan los resultados en unidades de coagulación de leche ⁽⁸⁾.

En esta tesis para medir la actividad de la papaína se utilizará el Método Modificado de Kunitz para la determinación de la actividad proteolítica de enzima; este método pertenece al segundo grupo de métodos de medición de actividad proteolítica antes mencionados ⁽⁸⁾.

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

2.5.2 Especificidad

La papaína hidroliza las amidas de la arginina, lisina, glutamina, histidina, glicina, y tirosina, todas ellas α -amino substituidas. Los enlaces peptídicos involucrando el grupo α -carboxílico del ácido glutámico son hidrolizados mucho más fácilmente por la papaína a pH 4 que a pH 7. En hidrólisis prolongadas de péptidos por acción de la papaína, los enlaces involucrando no solamente los residuos mencionados, sino también un gran número de otros enlaces son hidrolizados de igual manera ⁽⁵⁾.

La amplia variedad de enlaces peptídicos hidrolizados por la papaína puede ser superficialmente interpretado como indicativo de un bajo grado de especificidad de la enzima. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que factores gobernando la especificidad de la papaína no pueden ser discernidos a partir del examen de su

acción sobre pequeños substratos sintéticos o sobre péptidos pequeños elegidos al azar. Los estudios mencionados fueron dirigidos al examen de la premisa de que las endopeptidasas tienen amplios sitios activos los cuales se extienden sobre numerosos residuos de aminoácidos del substrato, Ej. una enzima proteolítica es capaz de reconocer una amplia porción de una cadena peptídica. De un estudio de la acción de la papaína sobre 40 péptidos diastereoisoméricos de alanina se concluyó que la papaína tiene un sitio activo que se extiende sobre aproximadamente 25 angströms, el cual puede ser dividido en siete "subsitos" cada uno acomodando un aminoácido residuo del substrato ⁽⁵⁾.

Merece especial mención una reacción particular de la papaína, la cual ofrece un paso de apertura en el estudio de la estructura de los anticuerpos, llamada efecto degradativo sobre las inmunoglobulinas. La papaína, se encontró que causa hidrólisis limitada de inmunoglobulinas nativas, a fragmentos biológicamente activos separables por cromatografía. Estos estudios pioneros los cuales seguidos por una investigación intensiva, han sido de la mayor importancia en la elucidación de la estructura de la inmunoglobulinas y constituye un contribución mayor al campo de la inmunoquímica ⁽¹⁶⁾.

Debido a su amplia especificidad, la papaína no ha sido comúnmente usada para la hidrólisis de proteínas y polipéptidos muy largos en trabajos consecuentes; sin embargo, ha sido excesivamente valiosa para la hidrólisis de péptidos de moderado

tamaño, particularmente cuando estos no contienen enlaces del tipo susceptible a las ampliamente utilizadas tripsina y quimiotripsina. Ej. Hemoglobina, citocromo c y subtisilina BPN' ⁽⁵⁾.

2.5.3 Estudios Cinéticos

2.5.3.1 Efecto del pH

la estabilidad de la papaína es suficientemente alta para permitir estudios cinéticos dentro del rango de 2.8-10.8 ⁽⁵⁾. Tiene un rango de actividad catalítica óptima más amplio que el de otras hidrolasas (Ver figura 5) ⁽²⁾.

La figura 6 ilustra el puente de hidrógeno entre el sulfuro y el nitrógeno. La enzima es más activa cuando los iones están apareados como un complejo tiolato imidazólico.

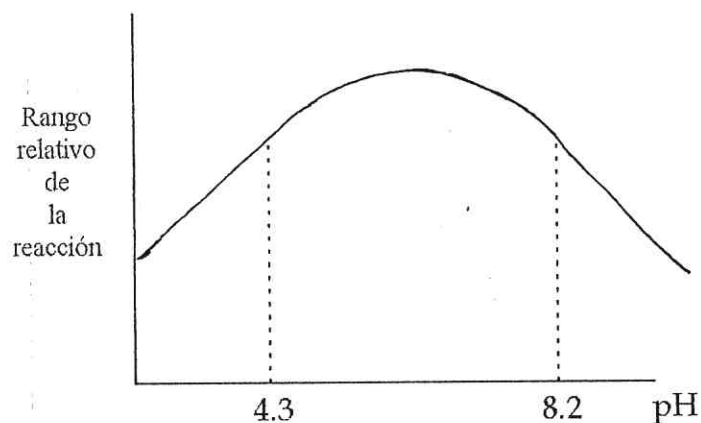


figura 5. Efecto del pH en la papaína

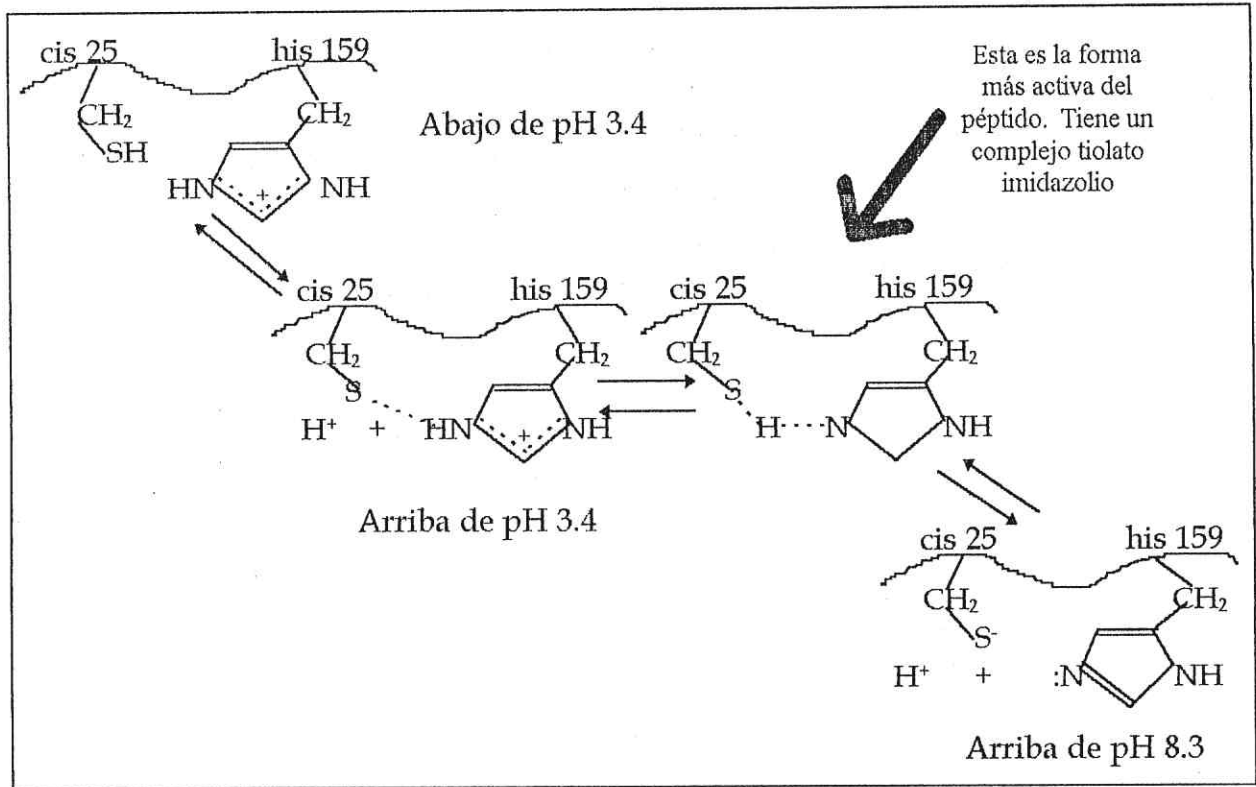


Figura 6. Formación del complejo tiolato imidazólico

2.5.3.2 Efecto de la temperatura

La enzima es suficientemente termoestable en presencia de sustratos que permiten mediciones cinéticas dentro del rango de temperaturas de 5 °C a 66 °C⁽⁵⁾.

Capítulo II

Metodología Experimental

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

Para la preparación de los reactivos específicos de los ensayos ver Anexo 1 y 2, y el control de calidad de los reactivos en Anexo 6.

1.1 INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

<u>Equipo</u>	<u>Material de Vidrio y Reactivos</u>	<u>Materia Prima</u>
Balanza Analítica E. Mettler Zürich Tipo H15 cap. 160 g.	Vasos de Precipitado	Papaína para fines Bioquímicos MERCK
	Agitadores de Vidrio	Agar-Agar
Mechero	Termómetro	Almidón Soluble
Baño de Agua Scientific Products B7001-3	Espátulas	Hidroxietilcelulosa
	Micropipetas	Glicerina
Refrigerador Admiral	Jeringas de 30 cc.	Agua destilada estéril.
Balanza Granataria, OHAUS Triple beam balance, cap. 2610 g.	Vidrios de Reloj	
	Placas de Vidrio	
	Probetas	
	Molde plástico reticulado	
	Buffer Fosfato	

1.2 CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA

(Determinaciones de pH y Temperatura)

<u>Equipo</u>	<u>Materiales</u>	<u>Reactivos</u>
Baño de Agua Scientific Products B7001-3	Vasos de Precipitado	Agua Endurada Artificialmente 30°DH
	Matraces Erlenmeyer	Solución de Fosfato Trisódico 2g/L
Espectrofotómetro uv-vis Lambda 12 Perkin Elmer.	Agitadores de Vidrio	Substrato de Caseína
Balanza Analítica E. Mettler Zürich Tipo H15 cap. 160 g.	Tubos de ensayo	Solución de Ácido Tricloroacético
	Pipetas mohr	Agua Endurada Artificialmente 15 °DH
pHmetro Mettler Toledo 355 Digital. Ion Analyzer	Espátulas	Solución de Fosfato Trisódico en Agua
	Vidrios de Reloj	Endurada Artificialmente a 15 °DH
Hot plate con agitador magnético Modelo 700-5011 Mig-by Barnant Co.	Pipetas volumétricas	Papaína inmovilizada
	Balones volumétricos	Buffer fosfato a diferentes pH
		Solución de Papaína

1.3 MONTAJE DE REACTORES ENZIMÁTICOS

<u>Equipo</u>	<u>Materiales</u>	<u>Reactivos</u>
Baño de Agua. Scientific Products B7001-3	Matraces Erlenmeyer	Papaína inmovilizada
	Tapones de hule horadados	Leche pasteurizada
Estufa Memmert. Tipo U30 110 V. 60 MHZ	Aros metálicos	Cerveza sin clarificar
	Soportes	
Enfriador Tappan	Pinzas de sostén	
Espectronic 20D. Milton Roy Company.	Pinzas de extensión	
	Espátulas metálicas	
	Columna para cromatografía 50 X 1.5 cm.	
	Cámara cúbica de vidrio	

2. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

2.1 INMOVILIZACIÓN EN AGAR-AGAR

2.1.1 Preparación del soporte

- a. En una balanza granataria pesar 10g. de agar-agar.
- b. En un erlenmeyer de 250 mL. colocar el agar y adicionar 100 mL. de agua destilada.
- c. Calentar en baño de agua a fuego moderado hasta completa disolución. Agitar constantemente.
- d. Esterilizar la solución homogénea en autoclave a 121°C, 15 lb. de presión durante 15 min..
- e. Enfriar hasta temperatura de 60 °C y mantener en baño maría.
- f. Repetir los pasos anteriores utilizando 6 g., 7 g., 8 g., y 9 g. de agar, en preparaciones individuales del soporte.

2.1.2 Mezcla enzima-soporte

- a. En una balanza analítica pesar 400 mg. de enzima papaína.
- b. Mezclar la enzima con la solución de agar a 47°C.

- c. Agitar vigorosamente durante 3 min..
- d. Mantener en baño de agua a 45°C.

2.1.3 Moldeo de la enzima

2.1.3.1 Moldeo de la enzima en cilindros (Figura 7.)

- a. Agregar la mezcla enzima-soporte sobre agua destilada estéril (5°C) utilizando una jeringa de 30 cc.
- b. Cortar en cilindros de 3 cm. de largo, con la ayuda de una espátula metálica estéril.
- c. Retirar los cilindros del agua, lavar y obtener el peso total.
- d. Almacenar los cilindros en una solución de agua destilada estéril a 10 °C.

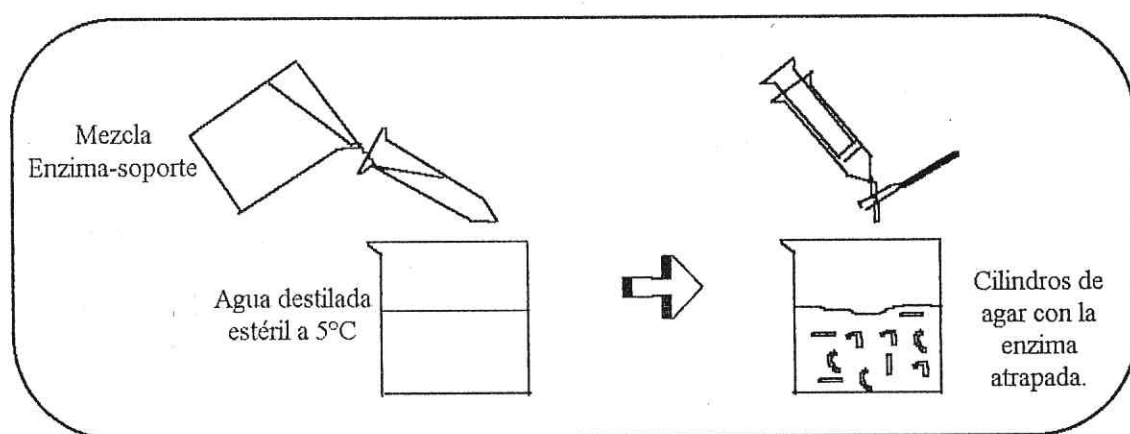


Figura 7. Atrapamiento de la enzima en cilindros

2.1.3.2 Moldeo de la enzima en placa

- a. Esterilizar con alcohol isopropílico 5 placas de vidrio de 11 X 4.5 cm., previamente pesadas
- b. Colocar las placas de vidrio horizontalmente sobre papel encerado
- c. Dispersar una capa delgada de aproximadamente 1 mm. de la mezcla enzima-soporte sobre la superficie descubierta de las placas, auxiliándose de una espátula estéril.
- d. Dejar reposar a temperatura ambiente hasta la solidificación del gel (aproximadamente 1 min.).
- e. Dar vuelta a las placas, dejando expuesta la superficie aun no cubierta por la mezcla de la enzima y el soporte, y proceder como en el literal b y c.
- f. Lavar las placas con agua destilada estéril, y obtener el peso total.
- g. Almacenar las placas en una solución de agua destilada estéril a 10 °C.

2.2 INMOVILIZACIÓN EN ALMIDÓN

2.2.1 Preparación del soporte

- a. En una balanza granataria pesar 20g. de almidón soluble.

- b. En un vaso de precipitado de 100 mL. colocar 50 mL de agua y 0.25 mL. de glicerina.
- c. Calentar esta mezcla a ebullición.
- d. Adicionar el almidón a la mezcla en ebullición, y agitar vigorosamente hasta obtener una solución clara.
- e. Enfriar hasta temperatura de 50 °C y mantener en baño maría.
- f. Repetir los pasos anteriores utilizando 15 g. y 17 g. de almidón, en preparaciones individuales del soporte.

2.2.2 Mezcla enzima-soporte

- a. En una balanza analítica pesar 400 mg. de enzima papaína
- b. Mezclar la enzima con la solución de almidón a 50 °C
- c. Agitar vigorosamente durante 3 min.
- d. Mantener en baño de agua a 50 °C

2.2.3 Moldeo de la enzima

2.2.3.1 Moldeo de la enzima en cubos

- a. Esterilizar a 180 °C por 3 horas una placa de vidrio de 20 x 20 cm.

- b. Enfriar la placa y fijar sobre ella, con cinta adhesiva, un molde plástico reticulado con divisiones de 1 X 1 X 0.5 cm., esterilizado previamente con alcohol isopropílico.
- c. Agregar la mezcla enzima-soporte sobre el molde reticulado, llenar los compartimientos y remover el exceso con ayuda de una espátula metálica estéril.
- d. Enfriar en refrigeración durante 1 hora.
- e. Retirar los cubos, lavar y obtener el peso total.
- f. Almacenar las placas en una solución de agua destilada estéril a 10 °C.

2.2.3.2 Moldeo de la enzima en placa

Proceder como en el punto 2.1.3.2 de este capítulo

2.3 INMOVILIZACIÓN EN HIDROXIETILCELULOSA

2.3.1 Preparación del soporte

- a. En una balanza granataria pesar 10g. de Hidroxietilcelulosa para síntesis.
- b. En un vaso de precipitado de 100 mL. colocar 50 mL de agua destilada estéril y 0.25 mL. de glicerina.
- c. Mezclar la hidroxietilcelulosa con la solución acuosa de la manera en que se indica en el siguiente punto (2.3.2 Mezcla enzima-soporte).

2.3.2 Mezcla enzima-soporte

- a. En una balanza analítica pesar 400 mg. de enzima papaína
- b. Mezclar la enzima con la solución acuosa preparada de acuerdo al procedimiento indicado para la inmovilización en hidroxietilcelulosa indicado en el punto 2.3.1
- c. Agitar vigorosamente durante 3 min..
- d. Mezclar con la hidroxietilcelulosa y agitar vigorosamente con doble agitador, hasta formar la suspensión más homogénea posible, sin pasar de un minuto de agitación.
- e. Moldear rápidamente la enzima como se indica en el siguiente punto (2.3.3 Moldeo de la enzima)
- f. Repetir los pasos anteriores utilizando 5 g. y 7.5 g. de hidroxietilcelulosa, en preparaciones individuales del soporte.

2.3.3 Moldeo de la enzima

2.3.3.1 Moldeo de la enzima en cubos

- a. Esterilizar a 180 °C por 3 horas una placa de vidrio de 20 x 20 cm.
- b. Enfriar la placa y fijar sobre ella, con cinta adhesiva, un molde plástico reticulado con divisiones de 1 X 1 X 0.5 cm., esterilizado previamente con alcohol isopropílico.

- c. Verter la mezcla enzima-soporte sobre el molde reticulado, llenar los compartimientos y remover el exceso con ayuda de una espátula metálica estéril.
- d. Mantener en estufa a 50 °C durante 2 horas.
- e. Enfriar en refrigeración durante 1 hora.
- f. Retirar los cubos, lavar y obtener el peso total.
- g. Almacenar los cubos en agua destilada estéril a 10 °C.

2.3.3.2 Moldeo de la enzima en placa

- a. Llenar un molde rectangular plástico, previamente esterilizado con alcohol isopropílico , con la mezcla enzima-soporte hasta una altura de aproximadamente 1 mm. sobre la base del molde.
- b. Mantener en estufa a 50°C durante 30 min..
- c. Colocar las placas horizontalmente sobre la mezcla semisólida.
- d. Mantener en estufa a 50 °C durante 15 min..
- e. Verter más mezcla enzima soporte sobre las placas, hasta obtener una capa sobre ellas de aproximadamente 1 mm.
- f. Mantener en estufa a 50 °C durante 2 horas.

- g. Enfriar en refrigeración durante una hora.
- h. Retirar las placas, desde la base del soporte, con ayuda de una espátula.
- i. Lavar las placas y obtener el peso total.
- j. Almacenar las placas en agua destilada estéril a 10 °C.

3. CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA

Los ensayos se hacen en lote, que consiste en trabajar con reactores (en este caso tubos de ensayo) en los cuales el sistema enzimático y el substrato están en contacto directo, hasta que finaliza la reacción.

Para verificar los cambios en las propiedades de la enzima libre e inmovilizada se desarrolla como base el ensayo de actividad por el Método Modificado de Kunitz.

Los ensayos tanto para verificar el efecto del cambio del pH y el efecto del cambio de la temperatura sobre la actividad se verifican por triplicado.

3.1 ENSAYO GENERAL DE ACTIVIDAD

Para medir la actividad proteolítica de la papaína se utilizó el Método Modificado de Kunitz basado en el grado de hidrólisis de substratos proteicos.

Método Modificado de Kunitz (Figura 8)

1. En cada uno de 4 tubos de ensayo (12 mm X 120 mm) pipetear 1 mL. de sustrato de caseína ajustado a pH 9.0 (Anexo 1).
2. Etiquetar los tubos de la siguiente manera: el primero E¹⁵, el segundo E⁰, el tercero I¹⁵ y I⁰ el cuarto tubo.
3. Colocar los tubos en baño de agua a 40°C y dejar 10 min. para alcanzar la temperatura del baño.
4. En el tubo etiquetado E¹⁵ pipetear 1 mL. de solución de Papaína, anotar tiempo cero, agitar rotatoria y simultáneamente el tubo y colocar nuevamente en el baño.
5. En el tubo etiquetado I¹⁵ colocar una cantidad de enzima inmovilizada (exactamente pesada) equivalente a 1 mL. de solución de papaína y continuar como se ha dicho anteriormente.
6. Repetir el procedimiento anterior para el tubo vacío E^{0'} al cual se le añade 1 mL. de solución de papaína, y para el tubo vacío I^{0'} al cual se le añade el equivalente de enzima inmovilizada.
7. Incubar durante 15 min., medidos cuidadosamente.
8. Detener la reacción adicionando 3 mL. de solución de ácido tricloroacético a cada uno de los tubos conteniendo la enzima (E¹⁵, I¹⁵, E^{0'}, I^{0'}), agitando enérgicamente después de cada adición.
9. Añadir el contenido del tubo E⁰ en el tubo E^{0'}, y el del tubo I⁰ en el I^{0'}.

10. Colocar de nuevo los tubos en baño de 40 °C durante una hora para permitir la coagulación completa de la proteína precipitada.
11. Filtrar con papel filtro Whatman N° 42 o equivalente.
12. Leer la absorbancia de los filtrados a 280 nm contra el blanco (Solución de ácido tricloroacético).

Unidad de Actividad (Unidad Kunitz)

La unidad es la actividad en la cual, bajo condiciones descritas, da un incremento en la absorbancia de 0.100.

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

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

Donde : C : Es la concentración de la solución enzimática original en mg/mL.

E¹⁵: Absorbancia después de 15 min. de reacción

E⁰: Absorbancia inicial

$$\text{Actividad} = \frac{I^{15} - I^0}{C} \times 10^4 \quad (\text{Para la enzima inmovilizada})$$

Donde : C : Es el peso de enzima soluble presente el peso de enzima inmovilizada pesado.

I¹⁵: Absorbancia después de 15 min. de reacción

I⁰: Absorbancia inicial

3.1.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH

- a. Preparar soluciones de buffer fosfato a pH 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0 (Anexo 2). Para el ensayo a pH 9.0 no se prepara buffer (Anexo 1).
- b. Preparar el sustrato de caseína y la solución de papaína ajustados a pH 5.5 (Anexo 1).
- c. Desarrollar el ensayo de actividad como indica el Método Modificado de Kunitz.
- d. Repetir el paso c. utilizando sustrato de Caseína y solución de papaína ajustados a pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0 y 9.0.

3.1.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura

La influencia ejercida por la temperatura en la actividad enzimática se verificará determinando la actividad de la enzima a las siguientes temperaturas : 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, y 60°C.

Se realiza el Método Modificado de Kunitz de la manera explicada en el numeral 2.1, repitiendo el procedimiento para cada una de las temperaturas indicadas y manteniendo constante el pH, durante un ensayo a 9.0 y en el otro ensayo a 6.0

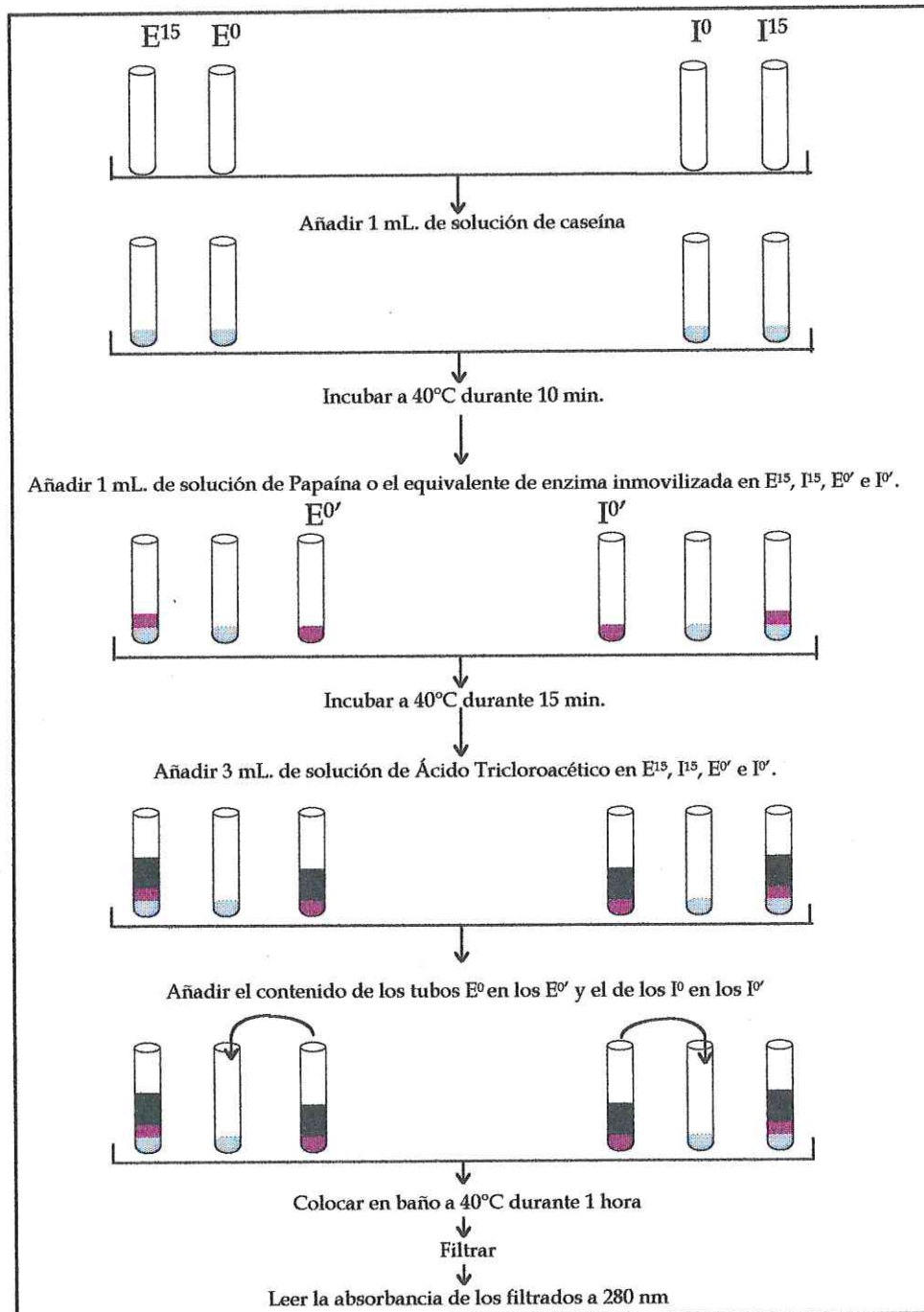


Figura 8. Método Modificado de Kunitz

4. MONTAJE DE REACTORES ENZIMÁTICOS

4.1 TRABAJO DEL SISTEMA INMOVILIZADO A FLUJO CONTINUO DEL SUBSTRATO

4.1.1 Montaje del Reactor Tipo Columna Empacada

- a. Llenar la columna de reacción con enzima inmovilizada con una cantidad de cilindros que contengan el equivalente a 300 mg. de enzima pura. Dejando un espacio libre de 4 cm. en la parte superior y colocar un tapón horadado.
- b. Sujetar la columna de reacción a un soporte metálico por medio de pinzas
- c. Ajustar la manguera alimentadora de substrato al tapón horadado de la parte superior y al recipiente contenedor de substrato.
- d. Adaptar a la parte inferior o salida , el recipiente receptor del líquido efluente.

4.1.2 Operación del Reactor Enzimático

- a. La solución de substrato consiste en cerveza, filtrada en fase de enfriamiento a la cual no se le ha adicionado papaína aún (Anexo 3).
- b. Calentar la cerveza en mechero hasta llevarla a 68 °C
- c. Colocar en estufa durante 30 min. a 68 °C.
- d. Enfriar.

- e. Difundir la cerveza sobre la columna empacada a una velocidad de 4.4 mL./h. los primeros cuatro días y de 2.2 mL./h. los siguientes días.

4.1.3 Seguimiento de la Reacción Enzimática

- a. Tomar una muestra de 75 mL. del líquido efluente, previa la realización del tratamiento enzimático.
- b. Tomar muestras del líquido efluente cada 24 horas durante 4 días y luego cada 72 horas hasta completar 9 días.
- c. Realizar a cada muestra el análisis de evaluación indirecta de la acción de la papaína por el Método Forzado de Estabilidad En Cerveza modificado.

4.1.3.1 Método Forzado de Estabilidad en Cerveza Envasada Modificado. (Ver Anexo 4)

- a. Enfriar por 24 horas a -5°C una muestra de cerveza sin tratar
- b. Hacer lecturas de turbidez (Absorbancia), previa agitación, a 610 nm, manteniendo la muestra dentro del rango de 4°C - 6°C .
- c. Enfriar por 24 horas a -5°C la muestra tratada.
- d. Realizar paso b para la muestra tratada.

- e. Colocar en estufa calibrada a 60 °C durante 24 horas.
- f. Enfriar a temperatura ambiente.
- g. Repetir desde el paso c al f. hasta alcanzar un valor de turbidez de 0.180.

Cálculos.

$$\text{Valor de Estabilidad} = A + \frac{(B-A) \times (2 - T1)}{(T2 - T1)}$$

Donde: A = # de días calientes hasta penúltima medición

T1 = Valor de turbidez (El correspondiente a las unidades EBC en Anexo 5),
de la penúltima medición en frío.

B = # de días calientes de la última medición

T2 = Valor de turbidez de la última medición en frío (El correspondiente a las unidades EBC en Anexo 5).

Normas.

Valor de Estabilidad	Clasificación
< 1.0	Bajo
1.0 a 2.0	Regular
2.01 a 5.0	Buena
> 5.0	Excelente

4.2 TRABAJO DEL SISTEMA INMOVILIZADO A FLUJO DISCONTINUO DEL SUBSTRATO.

4.2.1 Montaje y operación del Reactor Tipo Tanque con agitación

El reactor consiste en un contenedor de vidrio de 21 X 12 X 5 cm., que tiene 5 ranuras equidistantes en las que se colocan las placas.

- a. Colocar las placas de vidrio cubiertas con la enzima inmovilizada, en cantidad total equivalente a 340 mg. , dentro del contenedor cúbico.
- b. Colocar el reactor en baño maría a 50 °C durante 10 min..
- c. Calentar 500 mL. de leche (pasteurizada o cruda) llevando a 50°C.
- d. Agregar la leche dentro del reactor.
- e. Agitar el substrato cada quince min., recorriendo el ancho de el reactor 20 veces entre cada placa con ayuda de una microespátula (Figura 9.)

4.2.2 Seguimiento de la Reacción Enzimática

- a. Anotar las características organolépticas del substrato en cada agitación.
- b. Suspender la reacción cuando se tenga el producto de la reacción formado (un coagulo de consistencia esponjosa), mediante el retiro de las placas.

- c. Lavar las placas con agua destilada estéril y colocarlas nuevamente en el contenedor cúbico limpio.
- d. Repetir el procedimiento de operación y de seguimiento de la reacción hasta que ya no se produzca la transformación del sustrato.

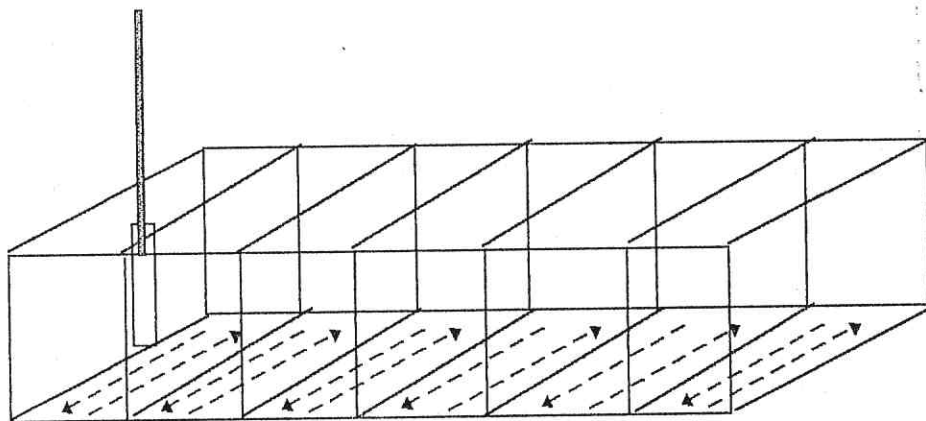


Figura 9. Forma de Agitación del Substrato en Reactor en Lote.

Capítulo III

Análisis de Resultados

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. RESULTADOS

1.1 INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

Se realizaron ensayos iniciales con tres soportes, hidroxietilcelulosa, almidón y agar-agar, para seleccionar entre ellos aquel que ofreciera :

- a) Condiciones de fluidez tales que permitan, a una temperatura razonable, el mezclado homogéneo entre el soporte y la enzima, y el moldeo requerido de la enzima inmovilizada.
- b) Consistencia sólida y resistencia a la abrasión de el producto enzimático inmovilizado final.

De acuerdo a las consideraciones expresadas los ensayos de inmovilización se realizan variando la concentración del soporte y manteniendo constante la concentración de papaína.

Se describen las características de los productos de inmovilización resultantes y luego se elige aquel que presente las condiciones que permitan un mejor trabajo posterior en los reactores.

Cuadro 1. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Agar-agar

CONCENTRACIÓN DEL AGAR-AGAR	RESULTADOS
10 %	<ul style="list-style-type: none"> • Las características de flujo del soporte en solución caliente a 47 °C no permiten un mezclado óptimo con la enzima en los 3 min. establecidos para ello, además en el moldeo permite tanto la formación de cilindros de enzima inmovilizada y de placas cubiertas con ella. • El producto final presenta consistencia sólida y características de no abrasión, pero la coloración no es homogénea: se observan partes blancas y partes traslúcidas.
9 %	<ul style="list-style-type: none"> • La fluidez del soporte en solución caliente (47 °C) no permite el mezclado homogéneo con la enzima en el tiempo de operación establecido, y en el moldeo permite la formación de cilindros de enzima inmovilizada y placas cubiertas con ella. • El producto final es sólido pero su coloración evidencia la heterogénea distribución de la enzima en el soporte, al presentarse áreas más oscuras y otras más claras, además de tener superficie lisa resistente a la abrasión
8 %	<ul style="list-style-type: none"> • Las características de flujo del soporte son adecuadas para permitir un mezclado homogéneo con la enzima en el tiempo establecido y en el moldeo permite al principio la formación de gotas de enzima y luego de cilindros, además de permitir el moldeo en placa. • El producto final es sólido, de coloración homogénea y de superficie lisa resistente a la abrasión.
7 %	<ul style="list-style-type: none"> • La fluidez del soporte en solución caliente (47 °C) es adecuada para el mezclado homogéneo con la enzima, al moldear permite la formación de gotas de enzima al inicio de la operación y luego da lugar a la formación de cilindros, y también da lugar al moldeo en placa. • El producto final es sólido, de coloración homogénea y de superficie lisa resistente a la abrasión.
6%	<ul style="list-style-type: none"> • Las características de flujo del soporte en solución permiten el mezclado homogéneo con la enzima, el moldeo en gotas durante la mitad del proceso de moldeo, cilindros la otra mitad del proceso, y también la inmovilización en forma de placas. • El producto final es sólido de coloración homogénea y de superficie lisa resistente a la abrasión.

Cuadro 2. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Hidroxietilcelulosa

CONCENTRACIÓN DE LA HIDROXIETILCELULOSA	RESULTADOS
20 %	<ul style="list-style-type: none"> • Se presenta facilidad de mezclado homogéneo de la enzima con el soporte, y el moldeo en cubos se realiza con facilidad, sin embargo el moldeo en placa presenta problemas de adherencia. • La enzima inmovilizada en forma de cubos consiste en un producto semisólido de coloración homogénea con tendencia a absorber agua en contacto con solución acuosa, formado un producto pastoso con ninguna resistencia a la abrasión. El producto en placa consiste en una especie de pasta de coloración homogénea adherida a las placas con ninguna resistencia a la abrasión.
15 %	<ul style="list-style-type: none"> • El mezclado de la enzima con el soporte se realiza con facilidad, al igual que el moldeo en cubos. Solamente el moldeo en placa presenta dificultad de la enzima en adherirse a la placa. • La enzima inmovilizada en cubos consiste en un producto de consistencia pastosa y coloración homogénea que absorbe agua en presencia de solución acuosa. El producto en placa presenta dificultad de desmoldar pues es como una pasta de coloración homogénea que se adhiere parcialmente a las placas y presenta pérdida de producto en el moldeo en evidencia de su baja resistencia a la abrasión.
10 %	<ul style="list-style-type: none"> • Se obtiene una mezcla homogénea enzima soporte. El moldeo en cubos se lleva a cabo de manera aceptable, pero existen altas dificultades en el moldeo en placa pues se dificulta su adherencia en el material de vidrio que es liso. • Inicialmente la consistencia de los cubos es aceptable pero a temperaturas mayores a los 4 °C adoptan una consistencia pastosa, siempre presentan coloración homogénea, y presentan la característica de absorber agua en contacto con solución acuosa. Como resultado de moldeo en placa solamente se obtiene una pasta adherida débilmente a las placas, de coloración homogénea y de alta sensibilidad a la abrasión.

Cuadro 3. Resultados de la Inmovilización de la Enzima en Almidón

CONCENTRACIÓN DEL ALMIDÓN	RESULTADOS
40 %	<ul style="list-style-type: none"> • La disolución del soporte en el agua resulta bastante difícil y por la agitación se produce mucha pérdida de él, luego el flujo del soporte en solución caliente (50 °C) permite el mezclado de este con la enzima aunque no libremente, ya que a esa temperatura existe formación de una sustancia bastante viscosa y de color lo suficientemente blanco para no distinguir la distribución de la enzima, sin embargo el moldeo tanto en cubos como en placa se realiza con facilidad. • La consistencia final del producto es sólida, de coloración homogénea, pero presenta desprendimiento de soporte cuando entra en contacto con una solución acuosa.
35 %	<ul style="list-style-type: none"> • La disolución del soporte en el agua resulta difícil, dándose pérdida de almidón por adhesión a las paredes del contenedor. La fluidez del soporte en solución caliente (50 °C) permite un mezclado con cierta dificultad de este con la enzima, pero si da presenta la factibilidad de moldear tanto en cubos como en placa. • El producto final es sólido, de coloración homogénea, pero presenta desprendimiento del soporte cuando entra en contacto con una solución acuosa.
30 %	<ul style="list-style-type: none"> • la disolución del soporte en agua resulta levemente difícil y se produce pérdida de almidón por adhesión a las paredes del contenedor. Las características de flujo del soporte en la solución acuosa caliente (50 °C) dan lugar a un mezclado homogéneo con la enzima, y presenta buenas condiciones para el moldeo en cubos y en placa. • El producto final es sólido, de coloración homogénea, pero presenta desprendimiento del soporte cuando entra en contacto con una solución acuosa.

1.2 CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA.

Debido a los resultados obtenidos en la inmovilización de la enzima en los diferentes soportes, se selecciona el proceso de inmovilización en agar-agar para la realización de los ensayos siguientes en el proceso experimental, ésto dadas sus mejores características en condiciones experimentales.

Para los ensayos de actividad se emplea el sistema enzima-soporte en forma de cilindros que miden un promedio de 0.1 mm de diámetro y 3 cm. de largo, seccionando de acuerdo al peso necesario para el ensayo.

1.2.1 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH.

Cuadro 4. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. (Temperatura 40 °C)

pH del Substrato	Actividad de la Enzima Libre (Unidades Kunitz)	Actividad de la Enzima Inmovilizada (Unidades Kunitz)
5.5	5.701×10^4	0.173×10^4
6.0	6.832×10^4	0.259×10^4
7.0	3.419×10^4	1.093×10^4
7.5	3.025×10^4	0.768×10^4
8.0	2.588×10^4	0.634×10^4
9.0	1.575×10^4	0.048×10^4

Cuadro 5. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de pH. (Temperatura 40 °C)

pH del Substrato	Actividad de la Enzima Libre (%)	Actividad de la Enzima Inmovilizada (%)
5.5	83.45	15.83
6.0	100.00	23.70
7.0	50.04	100.00
7.5	44.28	70.27
8.0	37.88	58.01
9.0	23.05	4.39

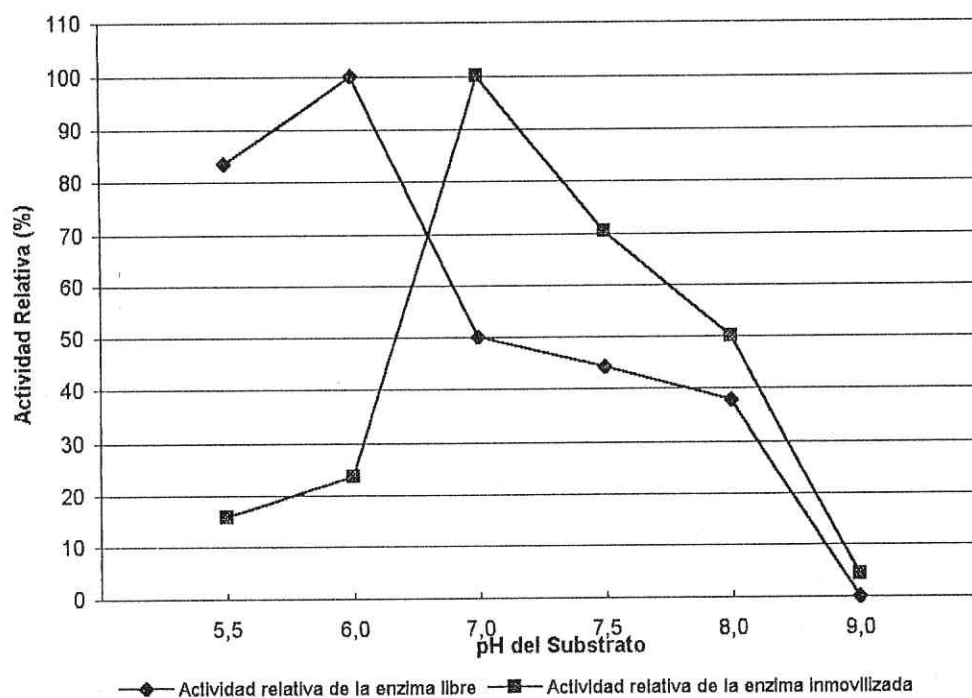


Gráfico 1. Efecto del Cambio de pH sobre la Actividad Enzimática con el proceso de inmovilización. Nótese que hay un desplazamiento del pH óptimo de trabajo para la enzima inmovilizada y mejora levemente su estabilidad en el rango de pH de 7 a 8.5 aprox.

1.2.1.1 Distribución "t" de student aplicada al Ensayo de Actividad en Función del pH.

Para comenzar se plantean las siguientes hipótesis :

Hipótesis Nula: H_0 : No existe diferencia significativa entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de pH.

Hipótesis Alternativa: H_1 : Si existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de pH.

Se obtienen los datos de la media aritmética, la desviación típica de las actividades relativas de la enzima libre e inmovilizada y luego se obtiene el valor de "t" de student aplicado a los resultados obtenidos del ensayo de actividad en función del pH, esto de acuerdo al esquema de cálculo explicado en el Anexo 8.

El valor de "t" que se obtiene para este ensayo es de 0.34, comparándolo con el valor teórico donde t tiene $(n-1=6-1)$ grados de libertad :

el valor crítico para un nivel de significación de 1 % = 3.36

Y para un nivel de significación de 5 % = 2.02,

se observa que el dato práctico encontrado es menor que estos valores ; por lo que se acepta que : No existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la inmovilizada frente a los cambios de pH.

1.2.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 9)

Inicialmente se realiza el ensayo de actividad en función de la temperatura a un pH constante de 9.0, por ser el pH básico al cual se realiza el método modificado de Kunitz, posteriormente se realiza a pH 6.0 por ser el pH óptimo teórico de la enzima libre.

Cuadro 6. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de temperatura (pH 9).

Temperatura (°C)	Actividad de la Enzima Libre (Unidades Kunitz)	Actividad de la Enzima Inmovilizada (Unidades Kunitz)
20	0.722 X 10 ⁴	0.007 X 10 ⁴
30	1.131 X 10 ⁴	0.030 X 10 ⁴
40	1.497 X 10 ⁴	0.048 X 10 ⁴
50	2.696 X 10 ⁴	0.218 X 10 ⁴
60	3.871 X 10 ⁴	0.295 X 10 ⁴

Cuadro 7. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 9)

Temperatura (°C)	Actividad de la Enzima Libre (%)	Actividad de la Enzima Inmovilizada
20	18.65	0.02
30	29.22	10.17
40	38.67	16.27
50	69.65	73.90
60	100	100

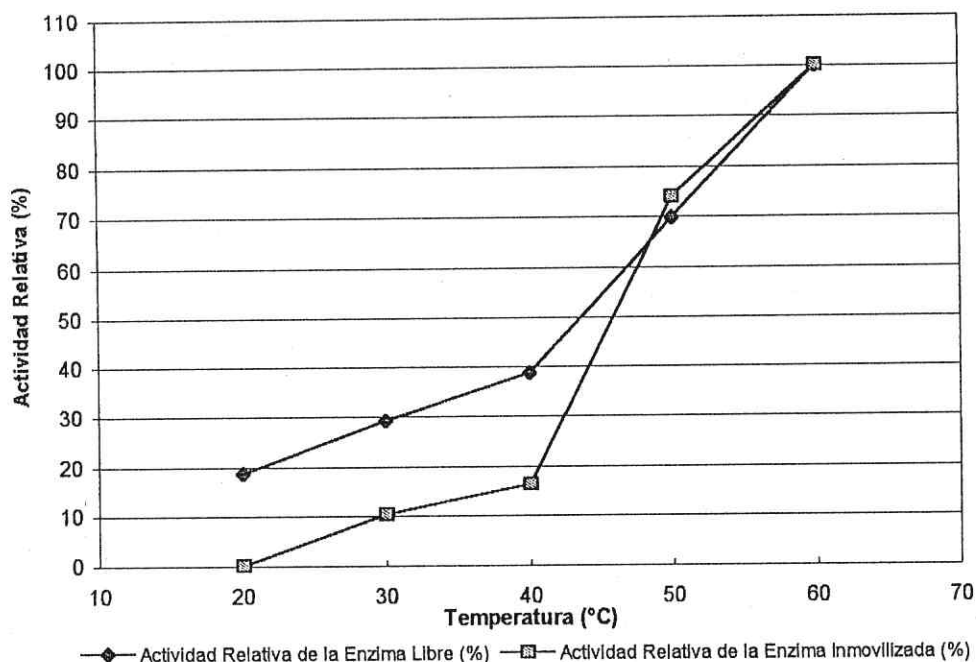


Gráfico 2. Efecto del cambio de Temperatura a pH 9 sobre la Actividad Enzimática, y la influencia del proceso de Inmovilización. Obsérvese cierta estabilidad en la actividad de la enzima inmovilizada a temperaturas menores de 40 °C y un ligero aumento a temperaturas mayores que ésta.

1.2.2.1 Distribución "t" de student aplicada al Ensayo de Actividad en Función de la Temperatura a pH 9.

Para comenzar se plantean las siguientes hipótesis :

H_0 : No existe diferencia significativa entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de temperatura en un pH de 9.0

H_1 : Si existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de temperatura en un pH de 9.0.

Se obtienen los datos de la media aritmética, la desviación típica de las actividades relativas de la enzima libre e inmovilizada y luego se obtiene el valor de "t" de student aplicado a los resultados obtenidos del ensayo de actividad en función de la temperatura a pH 9, esto de acuerdo al esquema de cálculo explicado en el Anexo 8.

El valor de t que se obtiene para este ensayo es 0.40, comparándolo con el valor teórico t tiene $(n - 1 = 5 - 1)$ grados de libertad,

el valor crítico para un nivel de significación de 1 % = 3.75

Y para un nivel de significación de 5 % = 2.13,

se observa que el dato práctico encontrado es menor que estos valores ; por lo que se acepta que : No existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima soluble y la inmovilizada frente a los cambios de temperatura a un pH de 9.0.

1.2.3 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 6).

Cuadro 8. Actividad de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de temperatura (pH 6).

Temperatura (°C)	Actividad de la Enzima Libre (Unidades Kunitz)	Actividad de la Enzima Inmovilizada (Unidades Kunitz)
20	2.115 X 10 ⁴	0.065 X 10 ⁴
30	4.423 X 10 ⁴	0.219 X 10 ⁴
40	6.746 X 10 ⁴	0.274 X 10 ⁴
50	6.754 X 10 ⁴	0.523 X 10 ⁴
60	9.461 X 10 ⁴	0.633 X 10 ⁴

Cuadro 9. Actividad Relativa de la Enzima Libre e Inmovilizada frente a los cambios de Temperatura. (pH 6)

Temperatura (°C)	Actividad de la Enzima Libre (%)	Actividad de la Enzima Inmovilizada (%)
20	22.35	10.27
30	46.75	34.60
40	71.30	43.29
50	71.38	82.62
60	100	100

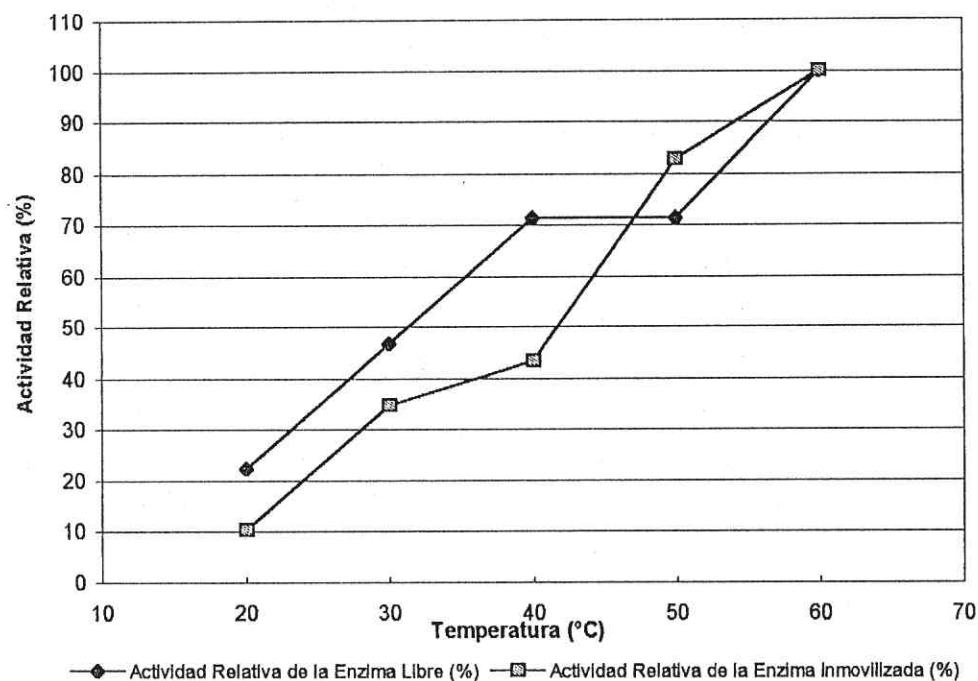


Gráfico 3. Efecto del cambio de Temperatura a pH 6 sobre la Actividad Enzimática y la influencia del proceso de Inmovilización. Existe bastante similitud en el comportamiento de la enzima inmovilizada con el de la enzima libre a este pH, observándose siempre un descenso general de la actividad del inmovilizado, más acentuadamente, en este caso, a temperaturas menores de 50°C y un aumento a temperaturas mayores.

1.2.3.1 Distribución "t" de student aplicada al Ensayo de Actividad en Función de la Temperatura a pH 6.

Para comenzar se plantean las siguientes hipótesis :

H_0 : No existe diferencia significativa entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de temperatura en un pH de 6.0

H_1 : Si existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de temperatura en un pH de 6.0

Se obtienen los datos de la media aritmética, la desviación típica de las actividades relativas de la enzima libre e inmovilizada y luego se obtiene el valor de "t" de student aplicado a los resultados obtenidos del ensayo de actividad en función de la temperatura a pH 6, esto de acuerdo al esquema de cálculo explicado en el Anexo 8.

El valor de "t" que se obtiene para este ensayo es 0.32, comparándolo con el de la tabla donde t tiene $(n - 1 = 5 - 1)$ grados de libertad,

el valor crítico para un nivel de significación de 1 % = 3.75

Y para un nivel de significación de 5 % = 2.13,

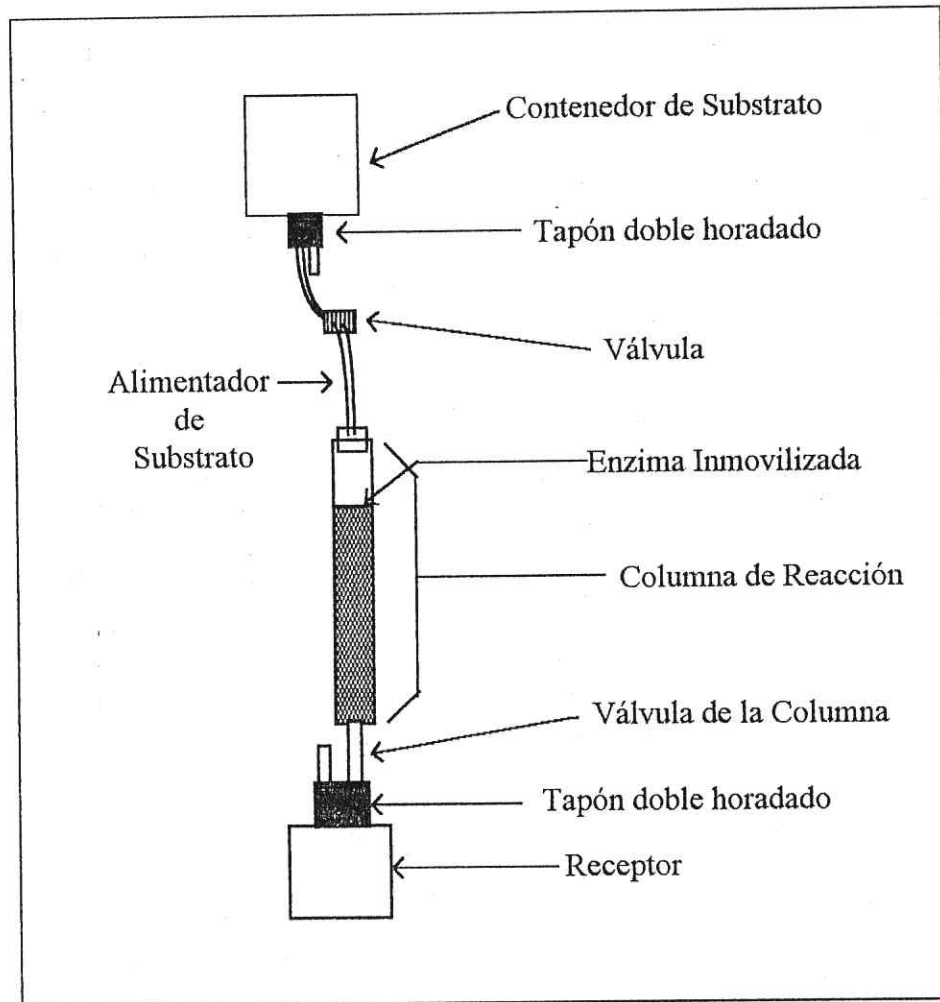
se observa que el dato práctico encontrado es menor que estos valores ; por lo que se acepta que : No existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima soluble y la inmovilizada frente a los cambios de temperatura a un pH de 6.0 .

1.3 MONTAJE DE REACTORES ENZIMÁTICOS

1.3.1 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Continuo del Substrato

Para este ensayo se hace el montaje de el reactor tipo columna empacada (ver esquema 1 y figura 10), conteniendo una cantidad de enzima inmovilizada

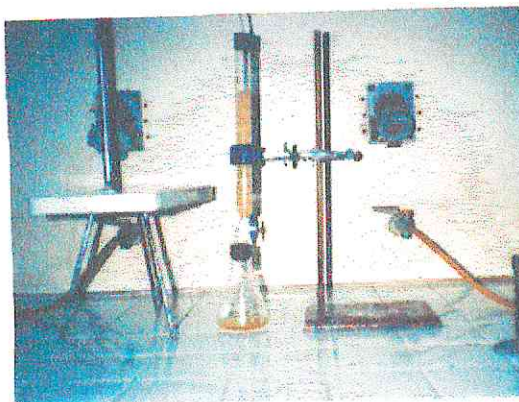
equivalente a 300 mg. de enzima soluble. verificándose el proceso a temperatura ambiente (25°C- 27°C), se realiza un lavado de la columna con solución tampón (buffer fosfato pH 8.5) cada 6 días.



Esquema 1. Reactor utilizado en pruebas con enzima inmovilizada en cilindros



a) Cilindros de Enzima
Inmovilizada



b) Vista Parcial del
Reactor



c) Vista total del Reactor

Figura 10. Reactor tipo columna empacada para utilizar con flujo continuo de sustrato

El seguimiento de la reacción se realiza por lectura espectrofotométrica a 610 nm, empleando el método de lectura de turbidez debida a proteínas[§], durante los primeros 4 días y luego cada 2 días.

Cuadro 10. Actividad clarificadora de la columna con papaína inmovilizada sobre flujo continuo de substrato cerveza.

Nº de Muestra	Tiempo (Días)	Volumen Tratado (mL.)	Absorbancia Previa al tratamiento	Ciclo Frío (h.)	Absorbancia después del tratamiento
1	1	100	0.084	24	0.045
2	2	110	0.084	23.5	0.040
3	3	100	0.100	24	0.043
4	4	100	0.125	24	0.060
5	6*	145	0.125	24	0.079
6	8	110	0.125	24	0.061
7	10	100	0.134	24	0.196
8	12*	145	0.134	25	0.246
9	14	100	0.134	23.5	0.207

* Lavado con solución tampón

Se hace un seguimiento de la calidad de la cerveza obtenida siguiendo el ensayo de estabilidad mencionado en el punto 4.1.3.1 del capítulo II. Esta es una prueba indirecta de la resistencia de la cerveza a la formación de turbidez por el frío y se realiza de la manera detallada en el punto mencionado: se repiten ciclos fríos y calientes hasta llegar a una lectura de turbidez límite establecida, se calcula el valor

[§] CABELLO VELASCO. Manual de Microbiología Industrial. 1a. Edición. México DF Universidad Autónoma de México. 1994. p. 188.

de estabilidad a través de la fórmula y finalmente, de acuerdo al resultado obtenido, se asigna la clasificación de estabilidad sugerida por la norma.

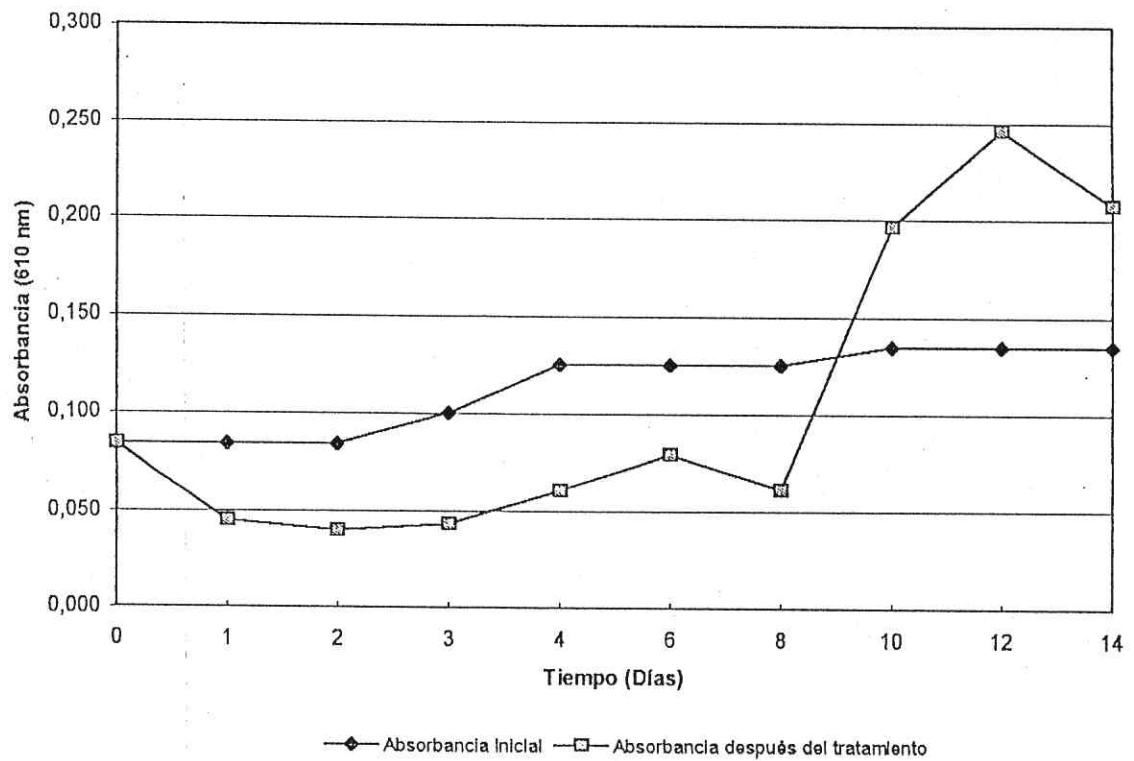


Gráfico 4. Efecto Clarificador de la Enzima Inmovilizada a Flujo Continuo de Substrato Cerveza. La menor absorbancia indica el mayor efecto clarificador. Nótese el súbito aumento de la absorbancia el noveno día de funcionamiento.

Cuadro 11. Evaluación de las muestras de cerveza tratadas por el Método Forzado de Estabilidad en Cerveza Envasada Modificado.

N° de Mx.	N° de Días Calientes hasta penúltima medición	Valor de turbidez de la penúltima medición		N° de Días Calientes hasta última medición	Valor de turbidez de la última medición		Valor de Estabilidad	Clasificación de Calidad
		ABS	EBC		ABS	EBC		
0	0	0.054	0.79	2	0.198	2.18	0.87	Baja
1	4	0.172	1.90	5	0.205	2.25	4.29	Buena
2	3	0.167	1.86	5	0.193	2.13	3.52	Buena
3	1	0.140	1.65	2	0.254	2.71	1.33	Regular
4	2	0.178	1.95	3	0.210	2.30	2.14	Buena
5	1	0.150	1.73	2	0.180	2.00	2.00	Regular
6	2	0.178	1.65	3	0.195	2.15	2.70	Buena
7	0	0.125	1.46	1	0.196	2.14	0.79	Baja

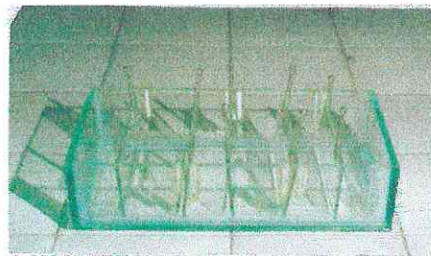
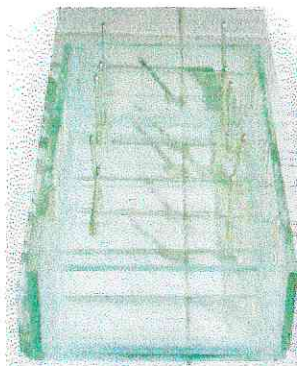
1.3.2 Trabajo del Sistema Inmovilizado a Flujo Discontinuo del Substrato

Para este ensayo se hace el montaje del reactor tipo tanque con agitación (Ver figura 11), Conteniendo una cantidad de enzima inmovilizada equivalente a 220 mg. de enzima soluble. Se utiliza como sustrato en cada ciclo 500 mL. de leche ultrapasteurizada y leche cruda, verificándose el proceso a 50 °C, se cambia el lote de sustrato después de obtener el producto requerido y se lavan las placas con agua destilada entre cada proceso.

El seguimiento de la reacción y de la calidad del producto se realiza por evaluación cualitativa de este.

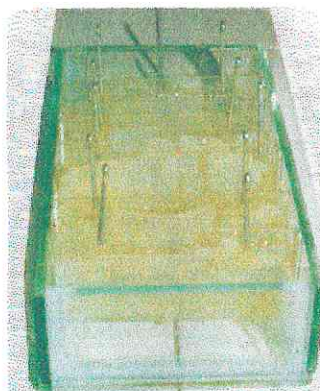
Cuadro 12. Efecto Coagulante de la Enzima Papaína Inmovilizada sobre Substrato Leche.

ENSAYO	TIEMPO DE REACCIÓN (HORAS)	RESULTADOS EN LECHE PASTEURIZADA	RESULTADOS EN LECHE CRUDA
1	1.5 -2.5 $\bar{X} = 2$	Se observa la formación de un coagulo suave, con poco drenaje del suero (Húmedo) , olor lácteo casi imperceptible, sabor amargo.	Se observa la formación de un coagulo elástico, tendencia a retener el suero, olor lácteo casi imperceptible, sabor agradable.
2	2.5 - 3.5 $\bar{X} = 3$	Formación de coagulo suave, húmedo, olor lácteo , sabor amargo.	Formación de coagulo suave y elástico, retención de suero, olor lácteo, sabor agradable.
3	3.4 - 4.5 $\bar{X} = 3.95$	Coagulo suave, húmedo, olor lácteo suave, sabor amargo.	Coagulo suave y elástico, retiene el suero, olor lácteo fuerte, sabor agradable.
4	8 -10 $\bar{X} = 9$	Coagulo suave, húmedo, olor lácteo moderado, sabor amargo.	Coagulo suave y elástico, que retiene el suero, olor lácteo muy fuerte y sabor agradable.
5	16 -20 $\bar{X} = 18$	Coagulo suave, húmedo, olor lácteo fuerte, sabor amargo.	Coagulo suave y elástico, que retiene el suero, olor lácteo fuerte intenso y sabor ácido.
6	20-26 $\bar{X} = 23$	Coagulo suave, húmedo, olor lácteo fuerte, sabor amargo.	Coágulos suaves y elásticos combinados con coágulos granulares e inelásticos, olor lácteo fuerte intenso y sabor ácido.
7	27 - 33 $\bar{X} = 30$	Coágulos suaves y húmedos combinados con coágulos granulares e inelásticos, olor fuerte y desagradable y el sabor del producto en general es amargo.	Coágulos suaves y elásticos combinados con mayor cantidad de coágulos granulares e inelásticos, olor lácteo fuerte intenso y sabor ácido.
8	25-29 $\bar{X} = 27$	Combinación de coágulos suaves y húmedos con granulares e inelásticos, olor fuerte y desagradable y el sabor es amargo el de los primeros y regularmente ácido el de los segundos coágulos respectivamente.	Combinación de coágulos granulares e inelásticos con poca cantidad de coágulos suaves y elásticos, Olor lácteo fuerte intenso, sabor ácido muy fuerte.



a) Reactor sin enzima inmovilizada

b) Reactor cubierto con
enzima inmovilizada



c) Reactor en
funcionamiento

Figura 11. Reactor tipo tanque agitado para utilizar con flujo discontinuo de substrato

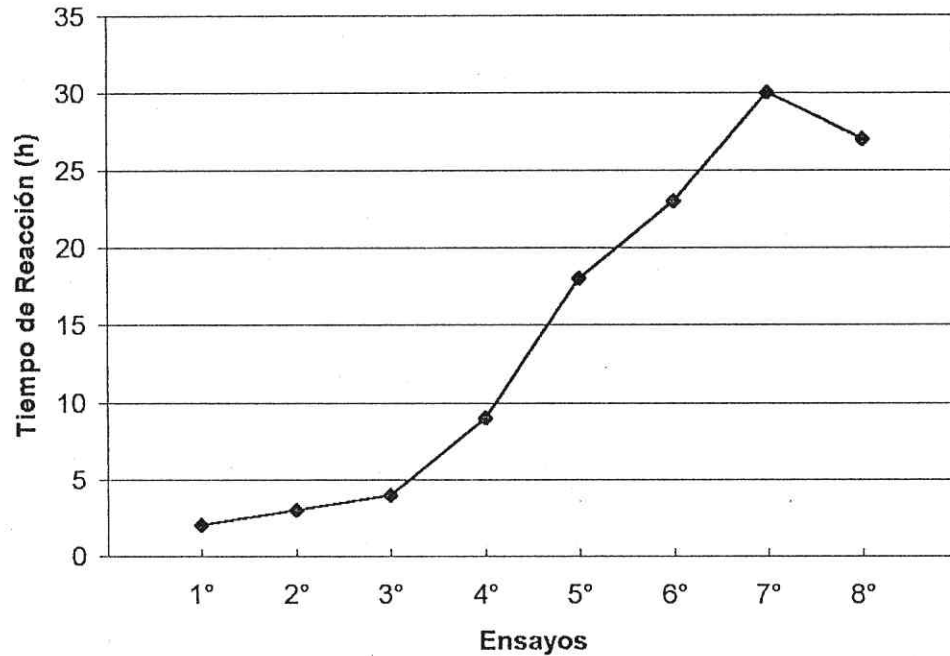


Gráfico 5. Tiempo Necesario para coagulación de Substrato Leche con Enzima Inmovilizada. El tiempo de reacción aumenta a medida que se realizan más ensayos, se da una disminución notable del tiempo de reacción necesario en el último ensayo.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.1 INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

- En los cuadros 1, 2 y 3 se presentan las características cualitativas de la enzima inmovilizada en los diferentes soportes y las diferentes concentraciones ensayadas para cada uno de ellos

- Para la enzima inmovilizada en agar-agar se utiliza la temperatura de 47°C como límite de manejo, ya que permite una mejor manipulación del material a pesar de que se encuentra un poco alejada del rango de solidificación.
- El agar es el material que mejor permite el moldeo en forma de cilindros, que son preferidos respecto a los cubos ya que da lugar a la obtención de un producto enzimático con mayor superficie de contacto.
- El cuadro 2 presenta las características del proceso de inmovilización en hidroxietilcelulosa, el que de manera general resulta bastante difícil y produce un inmovilizado cuyas características no son las más adecuadas para un proceso industrial en el que se establezca contacto con un substrato líquido o que contenga una cantidad de agua considerable. Este hecho nos explica la utilización de celulosas en métodos de inmovilización químicos.
- La función de la glicerina como plastificante en la inmovilización de la enzima con hidroxietilcelulosa resulta demasiado débil frente a las características propias de este gel.
- El cuadro 3 muestra los resultados de la inmovilización en almidón. El producto final presenta características de consistencia que indican la posibilidad de poder

mejorar su resistencia a la abrasión ya sea con la utilización de aditivos o de un tipo diferente de almidón.

2.2 CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA

2.2.1 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función del pH

- En el cuadro 4 se presenta la actividad en unidades Kunitz de la enzima libre e inmovilizada a los diferentes pH ensayados y a una temperatura constante de 40°C, esta actividad se calcula basándose en el incremento de la absorbancia de el substrato caseína debido a la hidrólisis causada por la papaína, el valor numérico presentado se obtiene aplicando la fórmula descrita en el método de ensayo (capitulo II parte 3.1)
- Los ensayos de actividad se hacen por triplicado, para encontrar el valor presentado en los resultados se toman los dos valores más cercanos obtenidos (calculados en unidades Kunitz) y se obtiene el promedio de ellos, el tercer valor es descartado.
- La mayor actividad de la enzima libre se presenta a pH 6.0 lo que concuerda con el pH óptimo teórico.
- El sistema inmovilizado presenta su mayor actividad a pH 7 lo que indica un desplazamiento hacia la alcalinidad, respecto al pH óptimo de la enzima libre.

- En general se observa una disminución de la actividad de la enzima inmovilizada respecto a la enzima soluble en el ensayo en función del pH.
- La actividad al pH óptimo de la enzima libre (6.0) supera en un 84% la actividad al pH óptimo de la enzima inmovilizada.
- En el cuadro 5 se presenta la actividad relativa tanto de la enzima libre como de la inmovilizada ; esta actividad se calcula asignando el valor de 100% al mayor valor de actividad encontrado para cada enzima. (Cálculos en anexo 7).
- El gráfico 1 presenta la manera en que varía la actividad de la enzima libre y de la inmovilizada a diferentes pH.
- La relación entre las actividades de la enzima libre e inmovilizada, y el pH presenta una tendencia a forma de campana lo que confirma la propiedad de las enzimas, que al igual que otras proteínas, de poseer grupos ionizables cuya conformación puede verse afectada por los cambios de pH⁽²¹⁾.

2.2.2 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 9).

- Los resultados presentados en el cuadro 6 son los de la actividad en unidades Kunitz de la enzima libre e inmovilizada ensayando diferentes temperaturas a un pH constante de 9.0 , se basan en el incremento de la absorbancia del sustrato

caseína debido a la hidrólisis causada por la papaína, el valor numérico obtenido en unidades Kunitz se obtiene aplicando la fórmula descrita en el método de ensayo (Capítulo II parte 3.1)

- La mayor actividad de la enzima libre, y también de la inmovilizada, se presenta a la mayor temperatura estudiada (60°C). Esto confirma que la enzima es enormemente activa a temperaturas altas.
- La preparación del substrato caseína para el ensayo de actividad realizado requiere de un calentamiento a ebullición (Anexo 1), lo que descarta el hecho de que la alta temperatura aplicada pueda ser una fuente de datos erróneos.
- La actividad de la enzima inmovilizada presenta una evidente disminución de la actividad en comparación con la actividad de la enzima libre, en este ensayo en función de la temperatura.
- En la temperatura óptima (60°C), la actividad de la enzima libre supera en un 92% la actividad de la enzima inmovilizada.
- En el cuadro 7 se presenta la actividad relativa tanto de la enzima libre como de la inmovilizada, ésta actividad se calcula asignando el valor de 100% a la mayor actividad encontrada para cada enzima (Cálculos en anexo 7).

- El gráfico 2 presenta la manera en que varía la actividad de la enzima libre a diferentes temperaturas a pH constante de 9.0.
- En general la actividad de la enzima libre a diferentes temperaturas se presenta más uniforme que la actividad de la enzima inmovilizada, en la cual se observan variaciones bastante pronunciadas entre 40°C y 50°C.

2.2.1 Ensayo de la Actividad Enzimática en Función de la Temperatura (pH 6)

- En el cuadro 8 se presenta la actividad en unidades Kunitz de la enzima libre e inmovilizada ensayadas a diferentes temperaturas a un pH constante de 6.0, estos resultados se basan en el incremento de la absorbancia del substrato caseína debido a la hidrólisis causada por la papaína, el valor numérico obtenido en unidades Kunitz se obtiene aplicando la fórmula descrita en el método de ensayo (Capítulo II parte 3.1)
- La actividad de las enzimas es mayor a pH 6.0 que a pH 9.0, y a 60°C que a otra temperatura. Confirmando que la enzima es enormemente activa a temperaturas altas.
- En este ensayo en función de la temperatura, nuevamente se observa que la actividad de la enzima inmovilizada presenta una evidente disminución de la actividad en comparación con la actividad de la enzima libre.

- En la temperatura óptima (60°C) y a pH 6.0, la actividad de la enzima libre supera en un 93.3% la actividad de la enzima inmovilizada, bastante cercana a la variación a pH 9.0.
- En el cuadro 9 se presenta la actividad relativa tanto de la enzima libre como de la inmovilizada, ésta actividad se calcula asignando el valor de 100% a la mayor actividad encontrada para cada enzima (Cálculos en Anexo 8).
- El gráfico 3 presenta la manera en que varía la actividad de la enzima libre a diferentes temperaturas manteniendo constante el pH a 6.0.
- En este ensayo la actividad de la enzima libre a diferentes temperaturas se presenta más uniforme que la actividad de la enzima inmovilizada especialmente en el rango de 40°C a 50°C.

2.3 MONTAJE DE REACTORES ENZIMÁTICOS.

2.3.1 Trabajo del sistema inmovilizado a flujo continuo del sustrato

- Para el montaje del reactor del tipo columna empacada, se hizo necesario la adaptación de dos tubos extra (esquema 1), uno en el tapón del contenedor de sustrato y otro en el tapón del receptor del producto, esto para poder lograr un flujo uniforme del sustrato en la columna de reacción.

- En teoría se utilizan aproximadamente 2 mg. de papaína para clarificar 100 mL. de cerveza. Para el montaje del reactor utilizado no se toma en cuenta este dato pues no era posible determinar con exactitud la cantidad de sustrato que sería posible clarificar con la cantidad contenida en él, finalmente la relación entre papaína y cerveza clarificada es de aproximadamente 29 mg. para cada 100 mL.
- En el cuadro 10 se presentan los diferentes factores observados en el funcionamiento del reactor: tiempo de actividad, volumen de sustrato transformado, absorbancia del sustrato previa al tratamiento, duración del ciclo frío posterior al tratamiento (necesario de acuerdo al ensayo indicado para medir indirectamente el efecto de la papaína) y absorbancia después del tratamiento.
- La absorbancia tanto previa como posterior al tratamiento indican la cantidad de agregados proteicos presentes en la cerveza, por lo que observando la disminución de este parámetro posterior al tratamiento pone en evidencia de que el sistema ejerce la función esperada.
- La actividad de la enzima, de acuerdo a los datos del cuadro 10, se mantiene constante durante los primeros tres días, y aunque con mayor variación aun se aprecia un efecto hasta el octavo día esto nos indica que en principio la enzima inmovilizada puede utilizarse en forma continua.

- Existen diversos factores que pueden haber afectado los resultados en este experimento, los relacionados con el substrato son: oxidación y crecimiento microbiano principalmente⁽⁷⁾, y los relacionados con el reactor: compresión de la columna, obstrucción y contaminación microbiana⁽²¹⁾.
- En el cuadro 11 se presentan los parámetros utilizados para calcular de manera indirecta la eficiencia de la enzima impidiendo la formación de turbidez debida al frío. Se tienen el número de días en los que se le da seguimiento al ensayo, los datos de absorbancia obtenidos se traducen a unidades EBC valiéndose de la curva de calibración (Anexo 5), y los valores y clasificación final se hacen aplicando la ecuación y la norma explicada en el método de ensayo (capítulo II parte 3.1)
- La muestra denominada con el número cero representa el blanco, es decir que no fue sometida al tratamiento de clarificación, por lo que al hacer la evaluación de calidad obtiene un bajo valor de estabilidad y una clasificación de calidad baja.
- Todas las muestras obtenidas durante el período en que se considera activa la enzima (ocho días: muestra seis) reportan buenos resultados de estabilidad, de buena a regular, y tomando en cuenta que las condiciones del ensayo a las que fueron sometidas son más intensas que las del ensayo base (anexo 4), se puede considerar que el tratamiento a través de la enzima inmovilizada fue eficiente.

- El gráfico 4 muestra el efecto clarificante de la enzima durante el tiempo en funcionamiento. Este gráfico indica que el funcionamiento de la enzima durante los primeros tres días es bastante homogéneo, disminuye un poco el cuarto día y el sexto día disminuye más dando la pauta para realizar el primer lavado, así su actividad aumenta viéndose el efecto al octavo día. Después del octavo día de funcionamiento de la columna ocurre un aumento súbito de la absorbancia, lo que indicaba un tipo de problema en el sistema, se espera el día doce para realizar el siguiente lavado y comienza a disminuir la absorbancia pero la contaminación microbiana ya es evidente.

2.3.2 Trabajo del sistema inmovilizado a flujo discontinuo del substrato

- El cuadro 12 muestra el tiempo de reacción necesario para la formación del queso utilizando la enzima inmovilizada, además de las características observadas en él para cada substrato (leche ultrapasteurizada y leche cruda).
- Para obtener los rangos de tiempo presentados en el cuadro se realizan ensayos con 2 lotes de enzima inmovilizada para el tratamiento de leche ultrapasteurizada, y 1 lote para el tratamiento de leche cruda. Se toman el resultado de tiempo mayor y menor para cada lote de leche, a los cuales también se les calcula la media aritmética.

- La leche cruda necesita mayor tiempo para ser transformada por la enzima que la leche ultrapasteurizada, y la mayoría de los límites de tiempo de reacción mayores se refieren a su proceso.
- La leche cruda da lugar a un producto de calidad superior al de la leche ultrapasteurizada, lo cual abre una enorme posibilidad para la utilización de la papaína en la industria láctea.
- El gráfico 5 muestra los tiempos de reacción necesarios para obtener el producto en lotes consecutivos de leche y con la misma enzima. La transformación de hasta al menos 7 lotes indica la posibilidad de reutilización de la enzima.
- Los primeros tres lotes de leche transformados presentan un buen tiempo para la transformación de substrato sin embargo los últimos lotes, es demasiado el tiempo requerido.
- La disminución en el tiempo de reacción del último lote puede indicar el inicio de una fermentación debida a microorganismos y a la misma acidez de la leche, motivo por el cual es suspendido hasta ese ensayo el experimento.
- La carga microbiana del substrato es un factor muy importante que influyó en el funcionamiento de la enzima en los dos reactores montados.

CONCLUSIONES

- ♦ De los tres soportes ensayados para la inmovilización de la enzima papaína, el agar-agar fue el que presentó las mejores características para la elaboración de un producto enzimático utilizable en procesos de transformaciones industriales continuos y discontinuos con substratos fluidos.
- ♦ La inmovilización de la enzima papaína en agar-agar permite el moldeo y utilización de la enzima al menos en dos formas físicas : en cilindros y en placa, aplicables al montaje de reactores del tipo columna empacada y reactores en lote respectivamente.
- ♦ Los resultados obtenidos reflejan que el proceso de inmovilización produce un descenso de la actividad de la enzima que oscila entre el 84% y 95%, sin embargo esto no implica un impedimento a su actividad por tratarse de una enzima muy potente.
- ♦ El pH óptimo de actividad de la enzima papaína se desplaza en 1 unidad de pH arriba de la normal (6.0) debido al proceso de inmovilización, no obstante demuestra actividad aún en contacto con substratos de pH bajo (cerveza : pH= 4.3).

- ♦ La enzima inmovilizada al igual que la enzima libre muestra una gran estabilidad cuando se expone a temperaturas altas, mostrando su mayor actividad a la temperatura más alta ensayada (60°C), aunque también permite trabajar con el sistema inmovilizado a condiciones ambientales (25°C-28°C).
- ♦ La papaína inmovilizada en gel de agar-agar puede ser utilizada en procesos continuo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de actividad con substrato cerveza.
- ♦ La papaína inmovilizada en gel de agar-agar puede ser utilizada y reutilizada en procesos discontinuos, en base a los resultados obtenidos en el ensayo de actividad con substrato leche.
- ♦ La papaína inmovilizada en gel de agar-agar presenta buenas posibilidades de utilización en la industria cervecera y en la industria del queso.

RECOMENDACIONES

- ◇ El almidón es un soporte que presenta muy buenas características para la inmovilización de enzimas, por lo que es recomendable hacer ensayos con materia prima de diferente calidad a la utilizada en este trabajo, con otros aditivos y variando la técnica de inmovilización.
- ◇ Se recomienda ensayar la inmovilización de la enzima papaína en otros soportes como el alginato u otro que pueda dar lugar a características que la hagan utilizable con substratos sólidos o menos fluídos, o en reactores del tipo tanque agitado conteniendo enzimas inmovilizadas.
- ◇ Tomando en cuenta los datos presentados en diferentes investigaciones : estudios de prefactibilidad para una planta de papaína refinada, un estudio económico sobre la agroindustrialización de la Papaya en El Salvador, y la presente investigación es importante recomendar estudios a nivel laboratorio y luego a nivel industrial acerca de la extracción y purificación de papaína a partir del látex de *Carica papaya*, dando lugar a una propuesta de agroindustrialización más concreta de este fruto.
- ◇ En cuanto al estudio del funcionamiento de la enzima papaína inmovilizada en gel de agar es recomendable realizar más estudios a nivel de laboratorio y a nivel

industrial, en los que se tomen en cuenta los diferentes factores experimentales y económicos que puedan afectar su actividad en los procesos específicos planteados en este trabajo : la clarificación de cerveza y la producción de queso.

- ◇ Es recomendable la exploración de las posibilidades de aplicación de la enzima papaína inmovilizada en la industria farmacéutica, como en el caso de medicamentos utilizados en el tratamiento de cicatrices de la piel, medicamentos de auxilio digestivo, y para la producción de aminoácidos específicos.
- ◇ Se recomienda hacer estudios en las demás perspectivas de aplicación de la papaína inmovilizada especialmente en procesos de la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBRECHT, K. Papain. Department of Chemistry. UWEC. Wisconsin .Estados Unidos. 1996. URL: www.chem.uwec.edu/Chem406/webpages/KAREN/facts.html
2. ALBRECHT, K. pH Effect on Papain. Department of Chemistry. UWEC. Wisconsin. Estados Unidos.
URL : www.chem.uwec.edu/carbox.html
3. BAVARESCO De PRIETO, Aura M. Las técnicas de la Investigación. 4a. Edición. México D.F. Grupo Editorial Iberoamericana. 1986.
4. BAILEY, J. OLLIS, D. Biochemical Engineering fundamentals. Chapter 14, s.n.t.
5. BOYER, Paul D. The Enzymes. 3^{ra} Edición. Nueva York. Estados Unidos. Editorial Academic Press Inc., Vol III. 1971.
6. CABELLO VELASCO. Manual de Microbiología Industrial. 1a. Edición. México DF. Universidad Autónoma de México. 1994.

7. CERVECERÍA VIRTUAL. Maduración. Perú. Última modificación octubre de 1998. URL : www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/bodega.htm
8. CHÁVEZ CRISONINO, Patricia. "Estudio de Prefactibilidad para una Planta de Papaína Refinada". El Salvador. Facultad de Ingeniería .UCA. 1981.
9. COONEY, C.L. Bioreactors : Design and Operation. February 1983. Science Magazine ; vol. 219.
10. GACESA, P. y HUBBLE J. Tecnología de las Enzimas. 1a. edición. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1991.
11. GARCÍA CHACON, Mayra Judith. MONTES GÓMEZ, Rosalinda. "Ensayos Preliminares para la Inmovilización de la Enzima Glucosa Oxidasa por el Método de Atrapamiento en Gel". El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. UES. 1994.
12. HULTIN, H.O. Current and Potencial Uses of Inmovilized Enzimes. October 1983. Food Technology Magazine ; vol. 37 No 10.

13. KIRK, R.E. Enciclopedia de Tecnología Química. [Tr. Oscar G. Carrera, et. al.] México, Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana. 1961. Tomo I.
14. MILLER. J.C & J.N. Estadística para Química Analítica. 2a. Edición. Willmington, Delaware. E.U.A. 1993.
15. MURRAY R. S. Ph. D. Estadística. 1a. Edición. México DF. Editorial McGraw Hill. 1970.
16. PERLMAN, G.E. LAZLO L. Methods in Enzimology. 1a. Edición. Nueva York. Estados Unidos. Editorial Academic Press. Vol XIV. 1970.
17. THE PHILADELPHIA COLLEGE OF PHARMACY. Remington's Pharmaceutical Sciences. [Tr. Dr. Mario Arnaldo Marino, et al]. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1987. Tomo II, IV y V.
18. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. The United States Pharmacopeia Twenty third Revition. Washington D.C. 1995.

19. ULTRAPAPAÍNA S.A de C.V. Proyecto Agroindustrial Desarrollado para Producir una Enzima Proteolítica llamada Papaína...Colima, México. Última modificación : 10-jun-1998 por JAC.

[Http ://colima.podernet.com.mx/ultrapapaína/usos_e.html](http://colima.podernet.com.mx/ultrapapaína/usos_e.html)

20. UNCTAD/GATT. Monografía sobre canales comerciales : La Papaína en El Reino Unido. Ginebra. Suiza. 1987.

21. WISEMAN, A. Manual de Biotecnología de los Enzimas. 1a. edición . Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1991.

22. WOODWARD, J. Inmovilized Cells and Enzymes. A Practical Approach. 1a. Edición. Oxford, England. IRL Press Limited. 1985.

23. ZABORSKY, Oskar. Inmovilized Enzymes.1a. Edición. Cleveland, Ohio. Estados Unidos. Editorial CRC Press Inc. 1973.

ANEXOS

ANEXO 1
PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD

Reactivo	Material	Procedimiento
Agua Endurada artificialmente a 30° DH ¹	<ul style="list-style-type: none"> • 0.630 g. de CaCl₂.2H₂O • 0.466 g. de MgCl₂.6 H₂O • 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el CaCl ₂ .2H ₂ O y el MgCl ₂ .6H ₂ O en 1 L. de agua destilada o Buffer fosfato del pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L.	<ul style="list-style-type: none"> • 4.63 g. de Na₃PO₄.12 H₂O • 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O en 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido
Substrato de Caseína	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g. de Caseína Hammarstein • Solución de fosfato trisódico 2 g/L. • Agua (endurada artificialmente a 30°DH) 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver la caseína en 50 mL. de solución de fosfato trisódico. • Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N • Calentar por 15 min. en agua hirviendo • Enfriar • Colocar la solución en un balón volumétrico de 100 mL. • Aforar la solución con el agua endurada (30 °DH). • Ajustar el pH a 9.0 o al pH requerido con ácido cítrico 0.05 M o NaOH 0.2 N

¹ °DH : Grados de Dureza

Reactivo	Material	Procedimiento
Solución de Ácido Tricloroacético	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g. de Ácido Tricloroacético • 100 mL. de agua destilada 	Disolver el Ácido Tricloroacético en agua y diluir a 100 mL. *
Agua Endurada Artificialmente a 15 °DH	<ul style="list-style-type: none"> • 0.315 g. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ • 0.233 g. de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ • 1 L. de agua destilada o buffer fosfato del pH requerido 	Disolver el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de agua destilada o Buffer fosfato del pH requerido.
Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en Agua Endurada Artificialmente a 15 °DH	<ul style="list-style-type: none"> • 9.26 g. de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ • 1 L. de Agua Endurada Artificialmente a 15°DH 	Disolver el $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1 L. de Agua Endurada (15°DH), ajustar a pH 9.0 o pH requerido, con ácido cítrico 0.05 M.
Solución de Papaína	<ul style="list-style-type: none"> • 0.015 g. de Papaína • Solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en Agua Endurada Artificialmente a 15 °DH ajustada a pH 9.0 o pH requerido 	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver la papaína en solución de Fosfato Trisódico 2 g/L en Agua Endurada Artificialmente a 15 °DH. • Colocar en un balón volumétrico de 50 mL. • Aforar con la solución mencionada.

*Realizar el procedimiento tomando precauciones necesarias.

ANEXO 2
PREPARACIÓN DE BUFFER FOSFATO A PH 5.5 6.0, 7.0, 7.5 Y 8.0

Reactivo	Material	Procedimiento
Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M	<ul style="list-style-type: none"> • 23.22 g. de KH_2PO_4 • Agua libre de CO_2 	Disolver el KH_2PO_4 en agua libre de CO_2 y aforar a 1000 mL.
Buffer Fosfato pH 5.5	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mL. de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M • 3.3 mL. de NaOH 0.2 N • Agua libre de CO_2 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL. agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2
Buffer Fosfato pH 6.0	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mL. de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M • 5.6 mL. de NaOH 0.2 N • Agua libre de CO_2 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL. agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2
Buffer Fosfato pH 7.0	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mL. de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M • 29.1 mL. de NaOH 0.2 N • Agua libre de CO_2 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL. agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2
Buffer Fosfato pH 7.5	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mL. de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M • 40.7 mL. de NaOH 0.2 N • Agua libre de CO_2 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL. agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2
Buffer Fosfato pH 8.0	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mL. de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M • 46.1 mL. de NaOH 0.2 N • Agua libre de CO_2 	Colocar la solución de Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 M en un balón volumétrico de 200 mL. agregar el NaOH indicado y aforar con agua libre de CO_2

ANEXO 3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

El proceso de elaboración de cerveza consta de tres etapas claramente definidas, que son cocimiento, fermentación y maduración las cuales dependen exclusivamente del tipo de cerveza que se piensa elaborar, debido a que según la clase de cerveza varía la cantidad y tipo de materia prima⁽⁷⁾.

Con el nombre de maduración se distingue la etapa siguiente a la fermentación y comprende todo el tiempo que dure la cerveza en los tanques a baja temperatura antes de ser filtrada. Comúnmente se divide en dos etapas que son reposo y acabado, entre el reposo y el acabado puede haber una prefiltración, preenfriamiento y precarbonatación⁽⁷⁾.

Al final de la maduración como se va a llevar a cabo una filtración y por lo tanto una eliminación de la levadura, se tendrá que proteger la cerveza agregándole antioxidantes para que se combinen con el oxígeno y evitar que se combine con la cerveza pudiéndose emplear ácido ascórbico o bisulfito de sodio o potasio para mejorar la clarificación de la cerveza se emplean clarificantes que pueden ser gelatina, viruta y una mezcla de bentonita con ácido tánico. La clarificación normal de la cerveza en maduración es afectada por maltas muy frescas que no han tenido el debido tiempo de reposo, temperaturas altas en maduración, alto extracto fermentable residual, poco tiempo de maduración, falta de presión positiva en los

tanques de maduración y también por maltas mal modificadas o con un alto contenido de beta glucanos⁽⁷⁾.

Para proteger la cerveza contra la turbiedad fina o por frío se emplean estabilizadores que son enzimas proteolíticas de origen vegetal como la papaína de la papaya o la bromelina de la piña. El efecto de los estabilizadores contra la turbiedad por frío es degradar proteínas, proteosas y peptonas hasta polipéptidos para que no se combinen con los antocianógenos y no se formen los complejos proteína-tanino que ocasionan la turbiedad, estos se agregan por lo general antes de la filtración⁽⁷⁾.

ANEXO 4
**ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA CERVEZA POR MÉTODO
 FORZOSO UTILIZADOS POR LA CONSTANCIA S.A. DE C.V.**

LA CONSTANCIA, S. A.

MEMORANDUM

29 OCTUBRE 1987
 GMH/MDEG

A : DR. ALIRIO MENJÍVAR - JEFE LABORATORIO CONTROL DE CALIDAD
 DE : G M HAUSINGER - MAESTRO CERVECERO
 ASUNTO : DETERMINACION DE ESTABILIDAD CON METODO FORZOSO

PRINCIPIO:

SE MANTIENE LA MUESTRA DE LA CERVEZA A UN RITMO PREVIAMENTE FIJADO, A UNA TEMPERATURA DE 0°C Y 60°C, CUANDO LA TURBIDEZ ALCANZA 2.0 UNIDADES E.B.C., SE TERMINA EL TRATAMIENTO TÉRMICO Y EL RESULTADO SE REFLEJA EN DÍAS CALIENTES.

APARATO NECESARIO : HAZE - METER TIPO : UKML.

REFRIGERADORA 0°C , CON UNA EXACTITUD DE MÁS Ó MENOS : 0.1°C.

BAÑO MARÍA , REGULABLE CON UNA EXACTITUD DE MÁS Ó MENOS : 1°C.

BOTELLAS CLARAS.

METODOLOGIA :

10. EN 4 BOTELLAS SE TERMINA LA TURBIDEZ INICIAL.
20. TEMPERATURA DE 24 HORAS A 60°C.
30. TEMPERATURA DE 24 HORAS A 0°C.
40. MEDICIÓN DE TURBIDEZ CON PREVIA AGITACIÓN.
50. REPETICIÓN DE LOS PUNTOS ANTERIORES HASTA LLEGAR A UNA TURBIDEZ DE 2 UNIDADES E.B.C., MÁS LA TURBIDEZ INICIAL.

FORMULA DE CALCULO :

2

$$A + \frac{(B - A) \times (2 - T1)}{T2 - T1}$$

- A = DIAS CALIENTES HASTA LA PENULTIMA MEDICION
 T1 = TURBIDEZ DE LA PENULTIMA MEDICION.
 B = DIAS CALIENTES ULTIMA MEDICION
 T2 = TURBIDEZ ULTIMA MEDICION.

NORMAS :

- MENOS QUE 1 = BAJO
 1- 2 = REGULAR
 MAS QUE 2 = BUENO
 MAS QUE 5 = EXCELENTE

NOTA :

SI NO TIENE BOTELLA CLARA, SE PUEDE USAR BOTELLA ÁMBAR, SIN MUCHOS RAYONES, EN ESTE CASO, HAY QUE MEDIR LA TURBIDEZ 4 VECES POR BOTELLA, GIRÁNDOLA CADA VEZ A 90° Y USAR RESULTADO PROMEDIO.

ATENTAMENTE,

GERHARD MICHAEL HAUSINGER

CC: ING J A SALAZAR
 ING L A GUEVARA

LA CONSTANCIA, S. A.

Turbidez - (7)
(1-7)ESTABILIDAD EN CERVEZA ENVASADA

1. METODO FORZADO.

a - Principio:

Mantener la muestra,cerveza en botella,a un ritmo de 24 horas, a una temperatura de 0° y 60°C., hasta que alcance un valor de turbidez de 2.0 unidades EBC,(138 FTU ASBC),se termina el tratamiento térmico y el resultado se expresa en días calientes

b - Equipos:

- Haze Meter.(Con escala FTU de EBC o ASBC)
- Equipo enfriador a 0°C,con exactitud de 0.1°C
- Baño de maría, regulable con una exactitud de $\pm 1.0^\circ\text{C}$
- Botellas Claras o Ambar sin muchos rayones, en este caso hay que hacer 4 mediciones de turbidez en cada botella, cada 90°y uasar un resultado promedio.

c - Procedimiento:

1. Seleccionar 4 botellas, con mínimo de rayaduras.
2. Marcar sobre corona, un cuadrante, para puntos de referencia,y colocar punto de inicio,para la primera lectura.
3. Enfriar por 24 horas a 0°C , para efectuar lecturas de Inicio de la prueba,cada 90°. Rotar las botellas en sentido de las agujas delreloj , para cada medición (Equipo Haze Meter)
4. Colocar en estufa calibrada a T. de 60°C , y mantener las botellas a 60°C por 24
5. Enfriar a temperatura ambiente.(despues de cada ciclo caliente.(Bajo agua del grifo,para evitar choque Térmico)
6. El agua del Haze Meter deberá ser a 0°C.(evitar choque Térmico)
7. Efectuar lecturas de turbidez en frio,igual que en punto # 3.con previa agitación
8. Repetir desde paso #4 al 8 hasta alcanzar un valor de turbidez de 2.0 Unidades EBC más la tubidez Inicial.

Nota: Se puede considerar que , cada ciclo completo , calentamiento y enfriamiento equivale a 30 días de estabilidad es el estante.

d. CALCULO

$$\text{Valor de Estabilidad} = A + \frac{(B - A) \times (2 - T1)}{(T2 - T1)}$$

donde: A= # Días Calientes hasta la penultima medición
T1= Valor de Turbidez(EBC),de la penultima medición en frio.
B= # Días calientes de la última medición
T2= Valor de turbidez de la última medición, en frio

e. NORMAS

Valor de Estabilidad	Clasificación
< 1.0	Bajo
1-0 a 2-0	Regular
de 2.01 a 5.0	Buena
➤ 5.0	Excelente

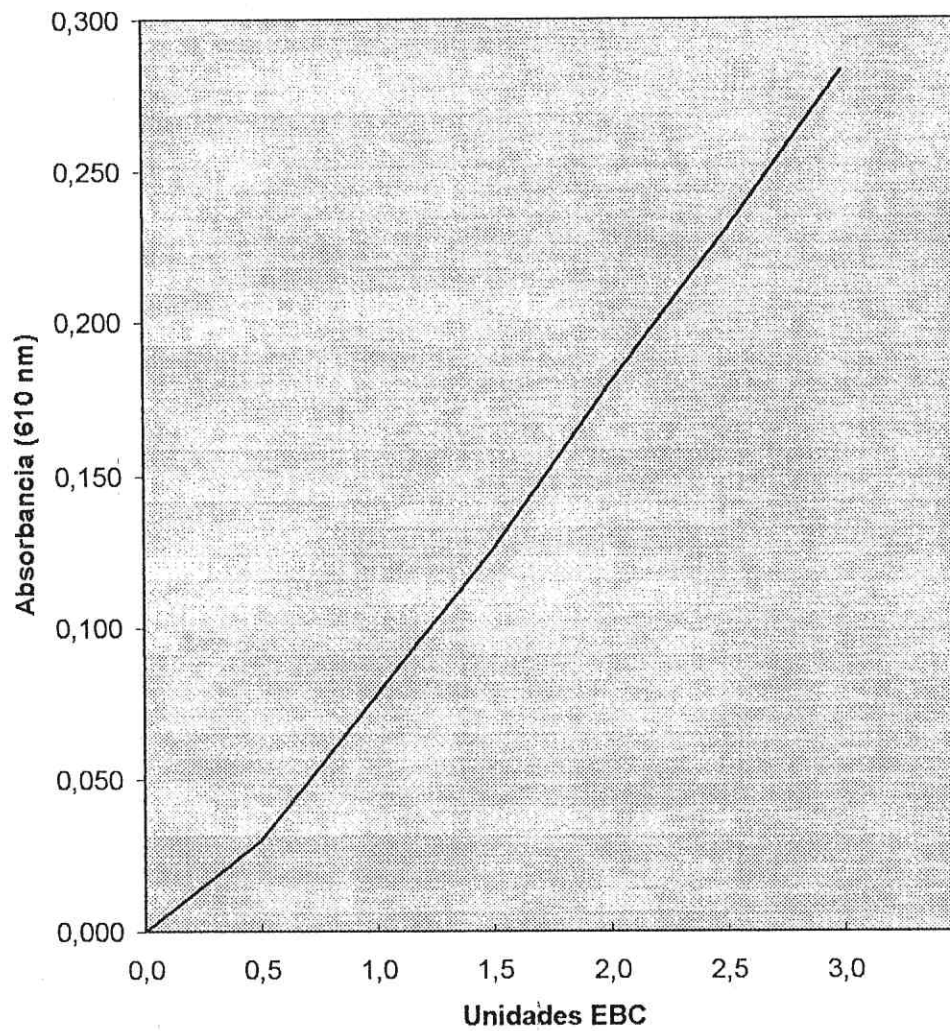
Hacer representacion gráfica

f. Tiempo de análisis:

Tiempo:

g. Referencia: Entregado por Sr.Hausinger en Oct.29,1989

ANEXO 5.
GRÁFICO DE RELACIÓN ENTRE MEDIDAS DE TURBIDEZ EN UNIDADES EBC Y
ABSORBANCIA EN ESPECTRO VISIBLE.



ANEXO 6.
CERTIFICADOS DE ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y REACTIVOS

07/14/99

08:29

MERCK QUIMICOS

001

Quimicos Mesa

▲ 13/07/99 07:08 AM

Destinatarios: Cesar Lopez/MCEN/Merck@MCEN
CC: Juan Fernandez/MCEN/Merck@MCEN
Asunto: CERTIFICADOS DE ANALISIS

Estimado César:

Te agradecería mucho si por favor me envías los certificados de análisis de los siguientes artículos:

CODIGO	ARTICULO	LOTE No.
1.01614.1000	Agar Agar	V199914 824
1.04873.0250	Potasio fosfato monobásico	A9995073 844
1.02382.0500	Calcio cloruro	TA523082 844
1.05833.0250	Magnesio cloruro	TA26203 814
1.04070.0500	Gelatina	V21570 831
1.01252.0250	Almidón soluble	F273852 71
1.02242.0100	Caseína Hammerstein	V255742 841
8.22068.0100	Hidroxietilcelulosa	S26848 906
1.07144.0025	Papaína	F484544 908
1.09414.1000	Acido tricloroacético	13027
1.09956.0001	Titrisol sodio hidróxido 1 N	70253617
1.09970.0001	Titrisol Acido Clorhídrico 1 N	6015674

Te agradezco de antemano tu ayuda. Quedo a la espera de cualquier comentario.

Saludos

Giovanni

Estimado GIOVANNI

*Adjunto los certificados
solicitados*

Saludos

CÉSAR

Entrada fecha: 14 JUL 1999	
<input type="checkbox"/>	Administración
<input checked="" type="checkbox"/>	Quimicos
<input type="checkbox"/>	Farma
<input type="checkbox"/>	Cómputo
<input type="checkbox"/>	Importaciones
<input type="checkbox"/>	Contabilidad
<input type="checkbox"/>	Créditos/Cobros
<input type="checkbox"/>	Archivo
<input type="checkbox"/>	

14. JUL. 1999

07/14/99

08:30

MERCK QUIMICOS

MERCK KGAA 64271 D-64271 DARMSTADT

NR. 577

002
5.2/16

MERCK

Certificate of Analysis

Customer:

Merck Centroamericana S.A.

**KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
Ciudad de Guatemala
Guatemala**

Your contact person:

Myrlam OTT

Telephone:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7591

Customer no.:

179576

Date of print:

14.07.1999

**1.01614.1000 Agar-agar purified and free from inhibitors granulated
for microbiology**

Batch V199914

	Spec. Values	Batch Values
Appearance		
colour	brownish-yellow	brownish-yellow
description	granules	granules
Identity		
Iodine - test	passes test	passes test
Solidification point	passes test	passes test
Turbidity - test	passes test	passes test
Solidification point	32 - 36 °C	35 °C
Gel strength (Gelomat assay)	≥ 50 g	33 g
Ca (Calcium)	≤ 0.5 %	≤ 0.5 %
Mg (Magnesium)	≤ 0.1 %	≤ 0.1 %
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Sulfated ash (600 °C)	≤ 6 %	2 %
Loss on drying (105 °C; 4 h)	≤ 12 %	6 %
Growth		
Escherichia coli ATCC 25922	passes test	passes test
Streptococcus pyogenes ATCC 21059	passes test	passes test
Staphylococcus aureus ATCC 25923	passes test	passes test
Shigella sonnei ATCC 20930	passes test	passes test
Erysipelothrix rhusiopathiae ATCC 19414	passes test	passes test
Streptococcus agalactiae ATCC 19813	passes test	passes test
Streptococcus equinus DSM 20062	passes test	passes test
Streptococcus pneumoniae ATCC 6301	passes test	passes test
Suitability for microbiology	passes test	passes test

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Page 1 of 2

14. JUL. 1999 07:44 07/14/99 08:31 MERCK QUIMICOS
 MERCK KGaA 06151 727091

NR. 577 003
 S.3/16

MERCK

Certificate of Analysis

**1.01614.1000 Agar-agar purified and free from inhibitors granulated
 for microbiology**

Batch V199914

Test date: 05.08.1998
 Expiry date: 30.04.2003

Dr. Metzger

Central Services Analytica

This document has been produced electronically and bears no signature.



Analysenzertifikat

<p>Kunde: Merck Centrosamericana S.A.</p> <p>KM 13 1/2 Carretera Roosevelt Ciudad de Guatemala Guatemala</p>	<p>Ihr Ansprechpartner: Myriam ÖTT Telefon: 06151-72 6198 Telefax: 06151-72 7591 Kundennummer: 179576</p> <p>Druckdatum: 14.07.1999</p>
--	---

1.01252.0250 Stärke löslich zur Analyse ISO
Charge F273852

	Spezifikation	Chargenwerte
Aussehen		
Farbe	weiß	weiß
Beschreibung	feines Pulver	feines Pulver
pH-Wert (2 %; Wasser)	6.0 - 7.5	6.9
Empfindlichkeit	entspricht	entspricht
Reduzierende Anteile (als Maltose)	max 0.7 %	< 0.7 %
Sulfatasche	max 0.5 %	< 0.5 %
Trocknungsverlust (105 °C, 2 std.)	max 10 %	5 %
Eignung als Enzymsubstrat (für Amylasen)	entspricht	entspricht

Iso-Reagenz

Dr. Zwing

Zentrale Dienste Analytik

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

07/14/99

08:37

MERCK QUIMICOS

NR. 077

012

S. 12/16

MERCK**Analysenzertifikat***Kunde:*

Merck Centroamericana S.A.
 KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
 Ciudad de Guatemala
 Guatemala

Ihr Ansprechpartner:

Myriam OTT

Telefon:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7591

Kundennummer:

179576

Druckdatum:

14.07.1998

8.22068.0100 HYDROXYETHYLCELLULOSE ZUR SYNTHESE

Charge S26848

Gehalt [an Celluloseether]
 Identität [IR]

93.9%
 entspricht

Datum der Prüfung:
 mindestens verwendbar bis:

13.11.1998
 10.10.2003

Dr. Beikart Tel. (08102) 802-167
 Qualitätskontrolle Dr. Th. Schuchardt & Co.

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)77-0

W0011-1
 09088

Verantwortlich: Hans-Joachim Langemann (Vob), Harald J. Schröder (stv. Vob.), Wolfgang Hünn,
 Geschäftsführung: Hans-Joachim Langemann (Vob.), Harald J. Schröder (stv. Vob.), Wolfgang Hünn,
 Michael B. ...

Seite 1 / 1

Vorsitzender d. Aufsichtsrats: Heinrich Harner

Apartado Postal 727
Avenida Irazú 166
Colonia Costa Rica
San Salvador, El Salvador
Tel.: 270 -0222 con 5 Troncales
Fax: 270-1501



INFORME DE ANALISIS DE MATERIA PRIMA

NOMBRE GLICERINA No. DE CONTROL 1150
 FECHA INGRESO 08-12-98 FECHA REANALISIS -----
 FECHA ANALISIS 08-12-98 LOTE CQ 981207
 FECHA EMISION 08-12-98 CODIGO -----
 METODO A USAR USP XII USP XXII

DETERMINACIONES	RESULTADOS	ESPECIFICACION
DESCRIPCION	CUMPLE ESPECIFICACION	LIQUIDO CLARO, INCOLORO, SIRUPOSO DE LIGERO OLOR CARACTERISTICO, SABOR DULCE
IDENTIFICACION	CUMPLE ESPECIFICACION	AL CALENTAR VARIAS GOTAS DE GLICEROL CON BISULFITO DE POTASIO OLOR ACRE A LA ACROLEINA.
GRAVEDAD ESPECIFICA	1.2813	NO MENOR DE 1.249
ACROLEINA, GLUCOSA Y COMPUESTO DE AMONIO	CUMPLE ESPECIFICACION	NO SE VUELVE AMARILLO AL CALOR, NI OLOR DE AMONIACO
CLORUROS	CUMPLE ESPECIFICACION	NO MAS DE 0.001%
SULFATOS	CUMPLE ESPECIFICACION	NO MAS DE 0.002%
pH	6.0	NEUTRO AL PAPEL TORNASOL
ENSAYO	98.75%	NO MENOS DEL 95.0% Y NO MAS DE 101.0%

OBSERVACIONES

EL INFORME CORRESPONDE A LA MUESTRA REMITIDA

REFERENCIAS

USP XII USP XXII

DECISION
ANALIZO
AUTORIZO

APROBADO

Ely L. de M.
 LABORATORIOS FALMAR
 CONTROL DE CALIDAD

07/14/99

08:36

MERCK QUIMICOS

NR. 577

011
S. 11/16

MERCK

Analysenzertifikat

Kunde:

Merck Centroamericana S.A.

**KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
Ciudad de Guatemala
Guatemala**

Ihr Ansprechpartner:

Myriam OTT

Telefon:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7591

Kundennummer:

179576

Druckdatum:

14.07.1999

1.02242.0100 Casein nach HAMMARSTEN LAB

Charge V255742

	Spezifikation		Chargenwerte	
Gehalt (aus N, ber. auf getrocknete Substanz)	≥ 95	%	95	%
Freie Säure (als Milchsäure)	≤ 0,1	%	≤ 0,1	%
Wasserlösliche Anteile	≤ 0,2	%	≤ 0,2	%
Fette	≤ 0,1	%	≤ 0,1	%
Glucose (DC)	≤ 0,05	%	≤ 0,05	%
Lactose (DC)	≤ 0,05	%	≤ 0,05	%
Sulfatanteile (800 °C)	≤ 1,5	%	0,1	%
Trocknungsverlust (105 °C)	≤ 6	%	5	%
Mikrobiologische Prüfung	entspricht		entspricht	

Dr. Metzger

Zentrale Diastas Analytik

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Seite 1 von 1

© 1999 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Alle Rechte vorbehalten.
 Geschäftsführung: Klaus-Joachim Langemann (Vors.), Harald J. Mohr (2. Vors.), Wolfgang Kahl,
 Michael Römer, Bernhard Scheubel, Thomas Schmalzgraber, Jan Schmitt

Vorsitzender d. Aufsichtsrats: Manfred Hornet

07/14/99

08:40

MERCK QUIMICOS

NR. 577 015
5.15/16**MERCK****Analysenzertifikat***Kunde:*

Merck Centroamericana S.A.

KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
Ciudad de Guatemala
Guatemala*Ihr Ansprechpartner:*

Myriam OIT

Telefon:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7391

Kundennummer:

179576

Druckdatum:

14.07.1999

**1.09956.0001 Natronlauge für 1 l Maßlösung c(NaOH) = 1 mol/l (1
N) Titrisol®****Charge 70253617***Konzentration nach verdünnen auf 1l: c(NaOH) = 1 mol/l*

Chargenwerte

Titer (20 °C)

0,998 - 1,002

Freigabedatum: 22.10.1997
mindestens verwendbar bis: 31.10.2002

Wolfgang Gernand

Analytisches Labor

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Seite 1 von 1

Zur Anfertigung dieses Zertifikats sind folgende Personen beteiligt:
Geschäftsführung: Hans-Joachim Langmann (Vors.), Harald J. Schürden (stv. Vors.), Wolfgang Mann
Michael Rames, Bernhard Scheible, Thomas Rohrookowach, Jan Romprecht

Vorsitzender d. Aufsichtsrats: Heinrich Hämmer

14. JUL. 1999

07/14/99 9:45

08:31 MERCK KGAA 06151 727591

MERCK QUIMICOS

NR. 577

004 S. 4/16

MERCK

Certificate of Analysis

Customer:

Merck Centroamericana S.A.

**KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
Ciudad de Guatemala
Guatemala**

Your contact person:

Myriam OTT

Telephone:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7591

Customer no.:

179576

Date of print:

14.07.1999

1.04873.0250 Potassium dihydrogen phosphate GR ISO

Batch A995073

	Guaranteed Values		Batch Values	
Assay (acidimetric)	min 99,5	%	100,0	%
pH-value (5 %; water)	4,2 - 4,5		4,3	
Chloride (Cl)	max 0,0005	%	≦ 0,0005	%
Sulphate (SO ₄)	max 0,003	%	≦ 0,003	%
Total nitrogen (N)	max 0,001	%	≦ 0,001	%
Heavy metals (as Pb)	max 0,001	%	≦ 0,001	%
Cu (Copper)	max 0,0003	%	≦ 0,0003	%
Fe (Iron)	max 0,001	%	≦ 0,001	%
Na (Sodium)	max 0,02	%	≦ 0,01	%
Pb (Lead)	max 0,001	%	≦ 0,001	%
Water	max 0,2	%	0,01	%

Test date: 15.12.1997
Minimum shelf life: 31.12.2002

Mond, Renate

Analytical Laboratory

This document has been produced electronically and bears no signature.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Page 1 of 1

07/14/99

08:39

MERCK QUIMICOS

NR. 577 014 S. 14/16

MERCK

Analysenzertifikat

Kunde:

Merck Centroamericana S.A.

**KM 1 1/2 Carretera Roosevelt
Ciudad de Guatemala
Guatemala**

Ihr Ansprechpartner:

Myriam OTT

Telefon: 06151-72 6198

Telefax: 06151-72 7591

Kundennummer: 179376

Druckdatum: 14.07.1999

**1.09414.0001 Trichloressigsäurelösung 300 mmol/l
Enteweißungsmittel für die Glucosebestimmung mit
der GOD-PAP-Methode**

Charge 13027

	Spezifikation	Chargenwerte
Aussehen	klar, farblos	entspricht
Gehalt	4.5 - 5.5 %	4.5 - 5.5 %
Funktionskontrolle (an Humanseren)	entspricht	entspricht

verwendbar bis: 28.2.2002

Dr. Wilz

Zentrale Dienste Analytik

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Seite 1 von 1

Geschäftsbildung: Hans-Joachim Langmann (Vors.), Harald J. Scheider (stv. Vors.), Wolfgang Wirth,
Michael Römer, Bernhard Hohenpfe, Thomas Schreckenbach, Jan Bombroek

Vertriebsleiter: A. Aufhäuser, H. Hoyer

OMYA PERALTA GmbH

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	Citric acid monohydrate gran. DAB/Ph.Eur./BP/USP/NF/FCC/E330
Quantity	300 kg net
Packing	25 kg bags
Batch No.	98-1693-05
Mfg.Date	May 1998
Exp.Dare	May 2001

Description	meets requ. (E.P./USP)
Identification	conforms (E.P./USP)
Assay (anhydr.)	99,5 - 100,5 %
Solution	conforms (E.P.)
Readily carbonisable substances	conforms (E.P./USP)
Sulphated ash	max. 0,05 %
Sulphate	max. 150 ppm
Chloride	max. 50 ppm
Iron	max. 5 ppm
Heavy metals (as Pb)	max. 5 ppm
Arsenic	max. 2 ppm
Oxalate	max. 100 ppm
Calcium	max. 75 ppm
Barium	conforms (E.P.)
Water	7,5 - 8,8 %
Volatile organic impurities	conforms (USP)
Lead	max. 0,5 ppm

Data as received from our supplier/manufacturer

OMYA PERALTA GMBH

14. JUL. 1999 07/14/99 08:32 MERCK QUIMICOS
 0145 PLIKUK KGHH 06151 727391

NR. 577 005
 S. 5/16

MERCK

Certificate of Analysis

Customer:

Merck Centroamericana S.A.

**KM 13 1/2 Carretera Roosevelt
 Ciudad de Guatemala
 Guatemala**

Your contact person:

Myriam OTT

Telephone:

06151-72 6198

Telefax:

06151-72 7391

Customer no.:

179576

Date of print:

14.07.1999

1.02382.0500 Calcium chloride dihydrate cryst. GR for analysis ACS

Batch TA523082

	Guaranteed Values		Batch Values	
Assay (complexometric)	min 99.5	%	100.1	%
Identity	conforms		conforms	
Appearance of solution (10 %; water)	conforms		conforms	
pH-value (5 %; water)	4.5 - 6.5		5.8	
Sulphate (SO ₄)	max 0.005	%	≤ 0.005	%
Total nitrogen (N)	max 0.002	%	≤ 0.002	%
Heavy metals (as Pb)	max 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Ba (Barium)	max 0.003	%	≤ 0.003	%
Cu (Copper)	max 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Fe (Iron)	max 0.0003	%	≤ 0.0003	%
K (Potassium)	max 0.01	%	≤ 0.01	%
Mg (Magnesium)	max 0.005	%	≤ 0.005	%
Na (Sodium)	max 0.01	%	≤ 0.01	%
Sr (Strontium)	max 0.05	%	≤ 0.05	%
Substances precipitated by ammonia (as oxides)	max 0.01	%	≤ 0.01	%
Oxidizing substances (as NO ₂)	max 0.003	%	≤ 0.003	%

Conforms to ACS.

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0

Page 1 of 2

Geschäftsführung: Hans-Joachim Langemann (Vors.), Harald J. Schröder (apl. Vors.), Wolfgang Klein,
 Michael Hamar, Bernhard Scheuble, Thomas Schrockenbach, Jan Remppelt

Vorstandsvorsitz: Helmut Harnagel

07/14/99

08:32

MERCK QUIMICOS

006

NR. 577

S. 6/16

MERCK

Certificate of Analysis

1.02382.0500 Calcium chloride dihydrate cryst. GR for analysis ACS

Batch TA523082

Test date: 19.08.1998
Minimum shelf life: 31.08.2003

Dr. Hans D.J. Müller

Analytical Laboratory Gerneheim

This document has been produced electronically and bears no signature.

ANEXO 7.
ESQUEMA DE CÁLCULO

1. Cálculos de Actividad Relativa

100 % de actividad Relativa = Mayor Magnitud de Actividad Observada.

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = \frac{\text{Magnitud de Actividad Buscada}}{\text{Valor 100\% de Actividad Relativa}} \times 100$$

Ej. Resultados de la enzima libre a pH = 5.5 y 40 °C. (Ver cuadro 4)

Mayor actividad de la enzima soluble (pH 6.0) = 6.832×10^4

Actividad Buscada (pH 5.5) = 5.701×10^4

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = \frac{5.701 \times 10^4}{6.832 \times 10^4} \times 100 = 83.45$$

2. Distribución "t" de student aplicada a los Ensayos de Actividad

Ver los datos fuente en cuadro 5 de los resultados. A partir de estos se obtienen los datos de la media aritmética y la desviación típica de las actividades relativas de la enzima libre e inmovilizada.

Cálculos.

Media Aritmética⁽¹⁵⁾: $\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$

Donde : $\sum X$ = Sumatoria de los valores de actividades relativas

N= Número de actividades relativas.

Media de la Actividad Relativa de la Enzima Libre : $\bar{X}_1 = \frac{338.7}{6} = 56.45$

Media de la Actividad Relativa de la Enzima Inmovilizada : $\bar{X}_2 = \frac{272.2}{6} = 45.37$

Tabla 5. Calculo de la Media Aritmética y Desviación Típica de la Actividad Relativa de la Enzima libre e Inmovilizada frente a los Cambios de pH. (Temperatura 40 °C).

pH del Substrato	Actividad de la Enzima Libre (%)	$(X - \bar{X})^2$	Actividad de la Enzima Inmovilizada (%)	$(\bar{X} - X)^2$
5.5	83.45	729.00	15.83	872.61
6.0	100.00	1896.60	23.70	469.59
7.0	50.04	41.08	100.00	2984.43
7.5	44.28	148.11	70.27	620.01
8.0	37.88	344.84	58.01	159.77
9.0	23.05	115.56	4.39	1679.36
Σ	338.70	4275.19	272.2	6785.77
	$\bar{X} = 56.45$	S=29.24	$\bar{X} = 45.37$	S=36.84

$$\text{Varianza}^{(15)}: S = \sqrt{\frac{\Sigma (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde : X = Actividad relativa individual

\bar{X} = Media de las actividades relativas

n = Tamaño de la muestra

$$\text{Varianza de la Actividad Relativa de la Enzima Libre: } S_1 = \sqrt{\frac{4275.19}{5}} = 29.24$$

Varianza de la Actividad Relativa de la Enzima Inmovilizada: $S_2 = \sqrt{\frac{6785.77}{5}} = 36.84$

Se plantean las siguientes hipótesis :

Hipótesis Nula: H_0 : No existe diferencia significativa entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de pH.

Hipótesis Alternativa: H_1 : Si existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la enzima inmovilizada frente a los cambios de pH.

Bajo la Hipótesis $H_0 = t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\hat{\sigma} \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$ donde $\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$

En estas fórmulas⁽¹⁵⁾:

t : Indica la distribución "t" de student.

\bar{X}_1 y \bar{X}_2 : Medias aritméticas de las series de datos analizadas

n_1 y n_2 : Tamaño de las series de datos analizadas.

S_1 y S_2 : Desviaciones típicas de cada una de las series de datos analizadas.

σ : Desviación típica de las 2 series analizadas.

$$\text{Entonces } \hat{\sigma} = \sqrt{\frac{6(56.45)^2 + 6(45.37)^2}{6 + 6 - 2}} = \sqrt{\frac{19119.615 + 12350.6214}{10}} = 56.09$$

$$t = \frac{56.45 - 45.37}{56.09 \sqrt{1/6 + 1/6}} = \frac{11.08}{32.38} = 0.34$$

Comparando este valor de t obtenido (0.34), con el de la tabla donde t tiene (n - 1 = 6 - 1) grados de libertad, el valor crítico para un nivel de significación de 1 % = 3.36

Y para un nivel de significación de 5 % = 2.02,

se observa que el dato práctico encontrado es menor que estos valores ; por lo que se acepta que : No existen diferencias significativas entre la variación de la actividad de la enzima libre y la inmovilizada frente a los cambios de pH.

ANEXO 8

ENSAYOS DE HIPÓTESIS Y SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICOS.

Muy a menudo en la práctica, se tienen que tomar decisiones sobre poblaciones, partiendo de la información muestral de las mismas. Tales decisiones se llaman Decisiones Estadísticas. Para llegar a la toma de decisiones, conviene hacer determinados supuestos o conjeturas acerca de las poblaciones que se estudian. Tales supuestos que pueden ser o no ciertos se llaman Hipótesis Estadísticas.

Al realizar una prueba de significación comprobamos la veracidad de una hipótesis denominada hipótesis nula. Adoptamos como hipótesis nula aquella mediante la cual un método no se encuentra sujeto a errores sistemáticos. El término nulo se utiliza para indicar que no hay más diferencia, entre lo observado y el valor conocido, que la que puede atribuirse a la variación aleatoria.

Las pruebas o ensayos de significación se realizan relacionando los datos con diferentes distribuciones estadísticas establecidas. En el caso de análisis de muestras una de estas distribuciones es la "t" de student, la cual generalmente es utilizada para probar si: Una media muestral difiere de un valor estándar, las medias de dos muestras independientes difieren o las muestras por parejas difieren; suponiendo que estas muestras provienen de poblaciones normales.

Si al finalizar la prueba de significación los resultados observados en una muestra al azar difieren marcadamente de aquellos que cabría esperar con la

hipótesis nula y con la variación propia del muestreo aleatorio, se dice que son **DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS** y estará en condiciones de rechazarse.

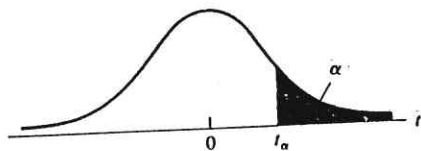
El nivel de significación de una prueba es la probabilidad de rechazar una hipótesis nula que sea verdadera, se denota por α [En la práctica se acostumbra utilizar niveles de significación del 0.05 ó 0.01 (5% ó 1%)].

De acuerdo con lo dicho, se puede formular la siguiente regla de decisión o ensayo de hipótesis y significación.

Ej. Para $n-1 = 5-1$ grados de libertad.

- a. Se rechaza la hipótesis nula al nivel de significación del 5% si la "t" obtenida del estadístico muestral se encuentra fuera de los puntos críticos de -2.13 a +2.13. Esto equivale a decir que el estadístico muestral observado difiere del valor hipotético a un nivel del 5%.
- b. En caso contrario se acepta la hipótesis (o si se desea no se toma decisión alguna) .

Distribución "t" de student con ν Grados de Libertad



La siguiente tabla proporciona los valores de t_α que corresponden a una determinada área α de cola superior y un número especificado de grados de libertad.

Grados de libertad	Area α de cola superior							
	.1	.05	.025	.01	.005	.0025	.001	.0005
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.327	31.598
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.214	12.924
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	1.371	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	1.	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

Fuente: De Ronald A. Fisher: *Statistical Methods for Research Workers*, 14th ed., copyright © 1970, University of Adelaide.