

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS:**

**Actividad enzimática y optimización de parámetros físico - químicos  
de látex de *Carica papaya* L. "papaya"**

Para optar el título profesional de:

**BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

**Bach. Juan HUAMANI MALDONADO**

ASESORA:

**Mg. Sonia Haydeé PALOMINO FELICES**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2025**

Dedico el presente trabajo  
a Rihanna Jazmín, mi hija.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y docentes de la Escuela Profesional de Biología, por sus enseñanzas y sabios conocimientos impartidos durante mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por contribuir de manera significativa en mi formación académica y profesional.

A la especialidad de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología y a todos sus docentes por compartir conmigo sus conocimientos y consejos que me permitieron ampliar mi perspectiva sobre la ciencia de la vida.

A la Mg. Sonia Palomino Felices, por su valioso asesoramiento, respaldo permanente y el seguimiento continuo, aspectos fundamentales para alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Marco conceptual	6
2.2.1 <i>Carica papaya</i> “papaya”	6
2.2.2 Taxonomía de la papaya	6
2.2.3 Látex	7
2.2.4 Proteasas presentes en el látex	8
2.2.5 Enzimas	12
2.2.6 Caseína	14
2.2.7 Actividad enzimática	14
2.2.8 Medición de la actividad enzimática	15
2.3.9 Factores que afectan la actividad proteolítica	16
2.3.10 Cinética enzimática	17
2.3.11 Factores que afectan velocidad de reacción catalizadas por enzimas	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Lugar de ejecución	21
3.2 Materiales	21
3.2.1 Muestra vegetal	21
3.3 Diseño metodológico:	21
3.3.1 Extracción de látex	21
3.3.2 Adición de preservantes	21
3.3.3 Almacenamiento	22
3.3.4 Preparación de solución buffer fosfato	22

3.3.5	Curva patrón o curva de calibración	22
3.3.6	Determinación de la actividad enzimática	23
3.4	Tipo de investigación	23
3.5	Diseño de investigación	24
3.6	Análisis estadístico	24
IV.	RESULTADOS	27
V.	DISCUSIÓN	33
VI.	CONCLUSIONES	39
VII.	RECOMENDACIONES	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXOS:	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de látex de <i>Carica papaya</i> “papaya” varía según grado de madurez	8
Tabla 2. Clasificación de las enzimas en la actualidad	13
Tabla 3. Estructura y características de la caseína	14
Tabla 4. Evaluación de la Actividad Enzimática de Látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína mediante la variación de temperatura, pH y concentración de sustrato, evaluado a los 0 y 60 minutos. Ayacucho, 2024.	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efectos principales en la actividad enzimática de látex de <i>Carica papaya</i> L. bajo las combinaciones de temperatura, pH y concentración de sustrato en la hidrólisis de caseína. Ayacucho, 2024.	30
Figura 2. Comparación de la papaína (enzima comercial TICIFY 100 000U/G) frente a látex de papaya a una temperatura de 50 °C, pH 6,5 y concentración de sustrato de 2 mg/ml evaluado a los 0 y 60 minutos. Ayacucho, 2024.	31

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Esquema de extracción de látex de <i>Carica papaya</i> L. “papaya” procedentes del distrito de Palmapampa provincia La Mar departamento de Ayacucho 2023.	50
Anexo 2. Flujograma para la determinación de la actividad enzimática de <i>Carica papaya</i> L. “papaya” Huamanga, 2024.	51
Anexo 3. Curva de calibración de caseína usando el método de Biuret modificado por Robinson con el espectrofotómetro modelo Thermo- Scientific a una longitud de onda de 545 nm. Ayacucho, 2024.	52
Anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) para los efectos principales y combinaciones de temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L.	52
Anexo 5. Tratamientos y agrupación de medias de actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. por Tukey, según; temperatura, pH y concentración de caseína Ayacucho, 2024.	53
Anexo 6. Desviación estándar de la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en diferentes tratamientos. Huamanga-Ayacucho, 2024.	53
Anexo 7. Agrupación de medias de temperatura utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.	53
Anexo 8. Agrupación de medias de pH utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.	53
Anexo 9. Agrupación de medias de concentración de caseína utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.	54
Anexo 10. Tratamiento 1, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	54
Anexo 11. Tratamiento 2, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	54
Anexo 12. Tratamiento 3, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	55
Anexo 13. Tratamiento 4, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	55
Anexo 14. Tratamiento 5, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	55

Anexo 15.	Tratamiento 6, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	56
Anexo 16.	Tratamiento 7, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	56
Anexo 17.	Tratamiento 8, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	57
Anexo 18.	Tratamiento 9 comparación de enzima comercial, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de <i>Carica papaya</i> L. del tratamiento 02 vs la enzima comercial en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.	57
Anexo 19.	Preparación de buffer fosfato	57
Anexo 20.	Técnica de Biuret Modificada por Robinson: para determinar proteínas.	58
Anexo 21.	Preparación de reactivos en Laboratorio de Biotecnología de la UNSCH, 2023.	59
Anexo 22.	Frutos de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" procedentes del distrito de Palmapampa provincia La Mar departamento de Ayacucho.	59
Anexo 23.	Extracción de látex de papaya desinfectadas con cortes longitudinales.	60
Anexo 24.	Derecha peso de látex en balanza electrónica, izquierda procedimiento a pulverizar los gránulos de látex de papaya en un mortero hasta obtener un polvo fino.	60
Anexo 25.	Látex de <i>Carica papaya</i> L, deshidratada y molida	61
Anexo 26.	Izquierda de preparación de solución buffer a pH 6,5 y 7,0 con pH metro y derecha equipo de baño de maría.	61
Anexo 27.	Curva patrón de caseína usando el método de Biuret modificado por Robinson, a 545 nm.	62
Anexo 28.	Izquierda foto de centrifuga. Derecha foto de espectrofotómetro modelo Thermo Scientific.	62
Anexo 29.	Izquierda foto de caseína, derecha foto de papaín enzime TICIFY, enzima comercial importado de china.	63
Anexo 30.	Esquema del diseño experimental.	64
Anexo 31.	Instrumento de recolección de datos.	65
Anexo 32.	Matriz de consistencia.	66

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la degradación de la caseína mediante la variación de los parámetros físico-químicos sobre la eficiencia catalítica de la enzima. El estudio se desarrolló bajo un enfoque experimental, empleando un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial  $2^3$ , (temperatura, pH y concentración de sustrato) la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los años 2023 y 2024.

Para el estudio se recolectaron 12 unidades de frutos de *Carica papaya* L. “papaya” verdes provenientes del distrito de Palmapampa, provincia de La Mar departamento de Ayacucho. Las muestras frutales fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología donde se procedió a lavar y desinfectar. El látex de papaya extraído fue secado a temperatura ambiente por 24 horas antes de su análisis. La actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. se cuantificó mediante el método de Biuret modificado por Robinson, empleando controles experimentales, un control negativo (sin látex de papaya) y control positivo (enzima comercial papain tificy) durante 60 minutos. Los resultados mostraron que hubo actividad enzimática (AE), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p>0.05$ ), se observaron variaciones numéricas en la actividad enzimática. Los tratamientos 2 (50°C; pH 6,5 y 2 mg/ml de caseína) y 4 (50°C, pH 7,0 y 2 mg/ml de caseína) presentaron la mayor eficacia, con una degradación de 0,154 mg/ml de caseína hidrolizada en ambos casos. El látex de *Carica papaya* L. demostró ser una fuente enzimática termoestable, con potencial biotecnológico, evidenciando actividad proteolítica incluso bajo variaciones fisicoquímicas. Estos hallazgos destacan la necesidad de optimizar condiciones para maximizar su eficiencia, respaldando su uso en industrias farmacéuticas y alimentarias.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, actividad enzimática, proteasas, hidrólisis, optimización.

## I. INTRODUCCIÓN

La investigación se centró en el análisis de enzimas proteolíticas presentes en la *Carica papaya* L., una especie frutal tropical perteneciente a la familia Caricaceae, originaria de México y América Central. Este fruto se distingue por su forma ovoide o aplanada, cáscara de tonalidad verde amarillenta que se torna anaranjada al madurar, pulpa jugosa de color anaranjado o amarillo y la presencia de múltiples semillas negras (Morton, 1987).

El látex de papaya posee enzimas proteolíticas, el látex se extrae de hojas, tallos y fruto de papaya (*Carica papaya* L.), el látex de papaya ha demostrado en diversos estudios su capacidad proteolítica mostrando así su capacidad para hidrolizar proteínas y su versatilidad de uso, las proteasas cisteínicas tienen aplicaciones en el tratamiento de infecciones parasitarias, como las causadas por nematodos; su uso en terapias puede ofrecer alternativas menos tóxicas y más efectivas para el tratamiento de estas infecciones, lo que es crucial para la salud pública, especialmente en regiones donde estas enfermedades son prevalentes, las proteasas cisteínicas tipo papaína han sido identificadas como elementos clave en procesos patológicos asociados a trastornos degenerativos invasivos y alteraciones del sistema inmunológico. en la industria farmacéutica, la papaína, una de las principales proteasas obtenidas del látex de esta planta, en las industrias alimentaria y cosmética, sus propiedades digestivas y exfoliantes son particularmente valoradas. No obstante, a pesar del alto potencial de estas enzimas, su aplicación óptima está limitada por la falta de una información clara sobre las condiciones fisicoquímicas que favorecen al máximo su actividad en diversos entornos industriales. Esta enzima pertenece a la familia de las cisteína proteasas y tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos en proteínas.

La investigación actual tiene como objetivo resolver estas interrogantes mediante la evaluación exhaustiva de la actividad enzimática del látex de papaya bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de sustrato (caseína),

centrándose en su capacidad para degradar caseína. Al identificar las condiciones óptimas para la hidrólisis de proteínas, se espera no sólo mejorar la eficiencia de estas enzimas en diversas aplicaciones industriales, sino también, ofrecer una alternativa sostenible frente a las enzimas comerciales. Además, comparar la actividad del látex de papaya con proteasas comerciales permitirá evaluar su viabilidad en términos económicos y operativos.

En esta investigación, se planteó como objetivo evaluar la actividad enzimática del látex de papaya y explorar la optimización de los parámetros fisicoquímicos relevantes. Siendo los siguientes:

**Objetivo general**

Evaluar la actividad enzimática de látex de *Carica papaya* L. “papaya” en la degradación de la caseína mediante la variación de los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y concentración de sustrato.

**Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de las combinaciones de los niveles de temperatura, pH y concentración de sustrato para la optimización de la hidrólisis de la caseína.
2. Comparar la actividad de las enzimas proteolíticas de látex de *Carica papaya* L. con enzimas comerciales.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

#### Internacional

Babalola et al. (2023) investigaron de manera experimental en Mountain Top University Nigeria, sobre extracción, purificación y caracterización de la papaína y tuvo como objetivo, determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad de la papaína extraída de *Carica papaya*, en la metodología se recolectaron hojas de *Carica papaya* y se extrajo la papaína utilizando un método de homogeneización en un tampón fosfato a pH 5,5. La actividad enzimática se midió variando la temperatura (de 10 °C a 70 °C) y el pH (de 3,0 a 9,0). La actividad proteolítica se determinó mediante un ensayo colorimétrico utilizando un espectrofotómetro a 280 nm para medir la absorbancia de los productos de la reacción. Los resultados indicaron que la papaína alcanzó su actividad óptima a 56,8 °C y un pH de 5,5, corroborando los hallazgos de Babalola et al. (2023). La actividad proteolítica se midió en términos de Km, con un valor óptimo de 0,83 mg/ml para la fracción más activa de la papaína, lo que indica una alta afinidad por el sustrato.

El-Zalaki (2021) en su trabajo de investigación del tipo experimental realizado en Alejandría, Egipto, formuló el objetivo de precipitar la papaína a partir de extractos de látex fresco de frutos de papaya (*Carica papaya*) utilizando diferentes precipitantes y evaluar la actividad proteolítica recuperada, se buscó identificar las condiciones más efectivas para la preparación de papaína, la metodología de la investigación se llevó a cabo mediante los siguientes pasos; se recolectó el látex de frutos de papaya (*Carica papaya*) mediante cortes longitudinales en la superficie de los frutos verdes seguido por la extracción del látex fresco. Se extrajo utilizando una solución de cisteína clorhidrato (0,01 M) en una proporción de 50 g/100 ml, seguido de un proceso de centrifugación a 6 000 xg durante 10 minutos para separar el sobrenadante claro luego la precipitación de papaína; se probaron

diferentes agentes precipitantes, incluyendo etanol y acetona, a concentraciones de 50 %, 67 % y 80 %, manteniendo las soluciones a temperaturas de -15 °C durante la noche antes de centrifugar y la evaluación de la actividad proteolítica, se utilizó caseína como sustrato para medir la actividad proteolítica de la papaína, evaluando su actividad en un rango de pH de 5,1 a 9,9 y a temperaturas de 35 a 100 °C. El análisis de estabilidad se evaluó de las preparaciones de papaína almacenadas a diferentes temperaturas (25 °C y -5 °C) durante un período de tres meses y los resultados mostraron que la papaína presenta su máxima actividad proteolítica a un pH de 7,5 y a temperaturas entre 75 y 85 °C.

Hulikere et al. (2014) llevaron a cabo un estudio experimental en varias ubicaciones en Karnataka, India, evaluaron la actividad proteolítica de la papaína extraída del látex de diferentes variedades de papaya, específicamente *Carica papaya*, *Red Lady*, *Arka Surya* y *Arka Prabhath*. Se buscó determinar la concentración de proteínas y la actividad enzimática bajo diversas condiciones de temperatura y pH. En la metodología se recolectó látex de cuatro variedades de papaya, la papaína fue aislada del látex y se utilizó el método de Lowry para la estimación de proteínas. La actividad proteolítica se evaluó mediante el método de Kunitz (mide la actividad proteolítica mediante la hidrólisis de caseína, utilizando TCA para detener la reacción). Se realizaron ensayos para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de sustrato (caseína) y se analizaron los parámetros de temperatura y pH en la actividad enzimática. Los resultados indicaron que la variedad Arka Surya mostró la mayor actividad proteolítica, seguida de Arka Prabhath, Red Lady y *Carica papaya*. La actividad enzimática fue óptima a temperaturas de 40 °C y en un rango de pH específico de 7,0. Se observó que la concentración de caseína también influía en la actividad proteolítica, con un aumento en la actividad a mayores concentraciones. El estudio concluyó en que la variedad de papaya y las condiciones fisicoquímicas son factores determinantes en la actividad de la papaína. La identificación de la variedad Arka Surya como la más activa sugiere su potencial para aplicaciones industriales en la producción de papaína.

Mahatara y Maskey (2023) realizaron el análisis de optimizar el proceso de purificación de la enzima papaína a partir de látex de *Carica papaya* utilizando la técnica de partición en tres fases (TPP) y determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH para la actividad de la papaína. La metodología consistió en

recolección de muestra que se extrajo de látex fresco de *Carica papaya*, el que fue filtrado para eliminar impurezas.

En el diseño experimental utilizó el de superficie de respuesta (RSM) para optimizar las condiciones de extracción, incluyendo la concentración de sulfato de amonio, la relación de extracto crudo a solvente y el pH. En la técnica de purificación se usó la partición en tres fases, ajustando las condiciones de la fase acuosa y orgánica para maximizar la recuperación de la enzima y se midió la actividad proteolítica de la papaína purificada mediante la liberación de tirosina a partir de caseína, utilizando espectrofotometría. Los resultados mostraron que la temperatura óptima para la actividad de la papaína era de 60°C y el pH óptimo era de 6,0 la técnica de partición en tres fases demostró ser más eficiente que los métodos tradicionales, logrando un aumento significativo en la actividad específica de la enzima. Las conclusiones fueron que la técnica de partición en tres fases es un método efectivo y eficiente para la purificación de papaína a partir de látex de *Carica papaya*.

### **Nacional**

Vite y Pérez (2021) en la investigación determinaron la concentración adecuada del agente microencapsulante, así como el tiempo adecuado de centrifugación y secado, con el fin de obtener papaína con alta actividad proteolítica. El estudio se realizó empleando frutos verdes de papaya de la variedad criolla. El látex se extrajo y se conservó con aditivos para evitar su degradación. Luego, se sometió a microencapsulación, centrifugación y secado. Se utilizaron dos concentraciones de agente microencapsulante (10/90 y 30/70 w/v), dos tiempos de centrifugación (50 y 70 min) y dos tiempos de secado (3 y 4 horas). La actividad proteolítica se evaluó utilizando el método analítico basado en la unidad de tirosina (TU). Los resultados indicaron que las condiciones óptimas correspondieron a una concentración de agente encapsulante de 10/90 w/v, un tiempo de centrifugación de 50 minutos y un tiempo de secado de 4 horas. Bajo estas condiciones, se obtuvo papaína cruda con una actividad proteolítica de 868,36 TU/mg.

En un estudio comparativo, Rivera et al. (2023) evaluaron la actividad enzimática de la papaína extraída de tres especies de *Vasconcellea* en relación con una papaína comercial, optimizando los procesos de extracción y purificación para cada especie, tuvo como objetivo principal obtener y purificar la enzima papaína a partir del látex de tres especies nativas del género *Vasconcellea* (*V. chachapoyensis*, *V. heilbornii* y *V. pubescens*) y evaluar su actividad enzimática

en comparación con la papaína comercial. La metodología consistió en la recolección de látex de las tres especies de *Vasconcellea*. Se utilizó un método de extracción alcohólica en dos pasos, adaptado de Andrade et al. (2011), que incluyó la adición de un buffer de acetato de sodio y EDTA. La actividad enzimática se evaluó utilizando el método de coagulación de leche (Balls y Hoover), donde se midió la formación de coágulos en presencia de papaína, se utilizó caseína comercial como sustrato para determinar la actividad proteolítica. Los análisis fisicoquímicos se realizaron para evaluar el contenido de proteínas, humedad y cenizas. Los resultados mostraron que la actividad enzimática (AE) de las tres especies fue mayor a pH 6,0 en comparación con pH 8,0, *V. chachapoyensis* presentó el promedio más alto de AE (240,97 Upe), seguido de *V. pubescens* (195,80 Upe) y *V. heilbornii* (112,45 Upe). La actividad proteolítica de *V. pubescens* fue significativamente superior a la de las otras especies, así como a la papaína comercial (208,14 Upe) papaína comercial de la marca Merck, específicamente el producto "Emprove - Essential Papain 6000 USP-U/mg.

## **2.2 Marco conceptual**

### **2.2.1 *Carica papaya* “papaya”**

La papaya, que forma parte de la familia Caricaceae y se identifica como *Carica papaya* L., es una planta herbácea originaria de América Central que actualmente se cultiva en casi todos los países con clima cálido alrededor del mundo. Aunque puede mantenerse en producción por varios años, comúnmente su ciclo productivo no supera los tres o cuatro años. Es ampliamente cultivada tanto por su fruto comestible como por ser la fuente industrial de la papaína, una enzima presente en su látex (Kure y Yugcha, 2012). La papaya es una fruta tropical que se caracteriza por su alto contenido de papaína, una enzima que tiene la capacidad de catalizar las proteínas. La papaína tiene una amplia gama de aplicaciones industriales y biotecnológicas, como la producción de alimentos, farmacéutica y cosmética. La actividad enzimática de la papaína depende de varios factores, como la temperatura, el pH, la concentración del sustrato y el tiempo de reacción (Hernández y González, 2012).

### **2.2.2 Taxonomía de la papaya**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Violales

**Familia:** Caricaceae

**Género:** *Carica*

**Especie:** *Carica papaya* L.

Fuente: Linneo, C. (1753). *Especie Plantarum* (Vol. 2, p. 1036). Laurentii Salvii.

### **2.2.3 Látex**

El látex es un fluido de apariencia lechosa formado por un suero líquido que alberga en suspensión o en solución una compleja mezcla de sustancias. Desde el punto de vista botánico, el látex corresponde al citoplasma contenido en los laticíferos, que son células especializadas vivas encargadas de su almacenamiento, por lo tanto, éste presenta una variedad de organelos celulares, como núcleos, mitocondrias, ribosomas, plastidios, vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático y moléculas orgánicas como enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres. Los laticíferos están bajo presión, por lo que al cortarlos el látex se libera rápidamente (Arana y Quijano, 2012).

Una de las características únicas de la papaya es la presencia de un látex rico en enzimas, que se extrae de la fruta verde (Mukhlisah et al., 2017). Este látex, comúnmente conocido como papaína, tiene una amplia gama de aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Varu, 2020).

Para la extracción de látex se hace las incisiones de 2 a 3 mm de profundidad, lo que permite una extracción eficiente sin dañar excesivamente el fruto, lo que afectaría la calidad del látex. Esta técnica también minimiza el daño celular y la oxidación, aspectos críticos para mantener la actividad enzimática del látex a una temperatura de 4 °C (Bermeo, 2020).

Se han descrito plantas que pertenecen a diferentes familias, en las que las enzimas proteolíticas presentes en las cáscaras constituyen más del 50% del total de proteínas presentes y luego de evaluar la actividad de dichas enzimas, es al menos cien veces mayor que la que se encuentran en otros tejidos. La gran cantidad de estas proteasas, excede lo necesario para el crecimiento y desarrollo celular, sugiere que podrían tener un papel especial como sustancias químicas que influyen en otros organismos, conocidas como "aleloquímicos" (Dalling, 1986; Kono et al., 2004).

Las proteasas cisteínicas presentes en el látex de frutos como la papaína y la ficina son conocidas por su capacidad para degradar la cutícula de los nematodos y por tener baja toxicidad. Por esta razón, se han utilizado durante mucho tiempo

en el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por nematodos, tanto en animales como en humanos (Stepenk et al., 2004).

Según un estudio publicado en la revista "*Journal of Food Science*", el látex de papaya contiene entre el 1 y el 2% de enzimas. La papaína es la enzima más abundante, representando entre el 60% y el 80% del total de enzimas presentes en el látex. La quimopapaína, la glicil endopeptidasa y la caricaína son también enzimas importantes que se encuentran en el látex de papaya. Los porcentajes de enzimas presentes en el látex de papaya de diferentes grados de madurez son los siguientes:

**Tabla 1.** Composición de látex de *Carica papaya* "papaya" varía según grado de madurez

Grado de madurez	Papaína (%)	Quimopapaína (%)	Glicil endopeptidasa (%)	Caricaína (%)
Inmadura	60-80	10-20	10-20	1-2
Semimadura	30-50	5-10	5-10	0,5-1
Madura	10-20	2-5	2-5	0,2-0,5

Fuente: Badillo et al. (2000).

#### **2.2.4 Proteasas presentes en el látex**

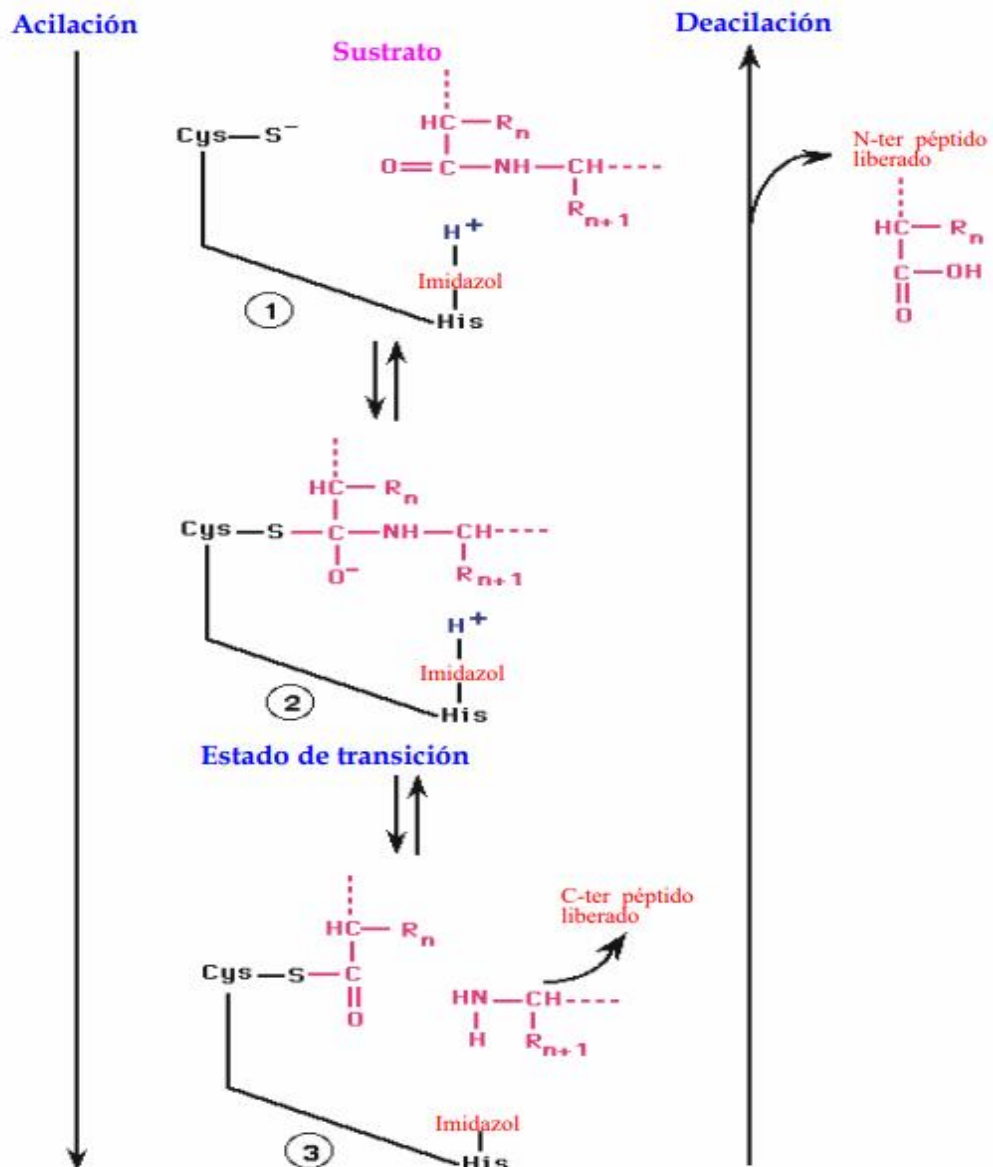
Desde hace décadas se reconoce la presencia de enzimas proteolíticas en el látex, aunque su función específica aún no se ha determinado con claridad. Se cree que podrían estar relacionadas con la degradación de proteínas durante el desarrollo de las células que producen el látex, o bien cumplir un papel defensivo, al favorecer la coagulación del mismo para proteger a la planta frente a posibles infecciones (Liggieri et al., 2004).

Las proteasas, también conocidas peptidasas, son enzimas que se encargan de romper las proteínas al cortar los enlaces que unen los aminoácidos. Esta acción, aunque ocurre de manera muy lenta de forma natural, se vuelve eficiente gracias a la participación de estas enzimas. Dependiendo del tipo de residuo que participa en el proceso catalítico, las proteasas se dividen en cinco grupos principales: aquellas que actúan con serina, treonina, cisteína, ácido aspártico o metales. Por eso, se les conoce como serinproteasas, treoninproteasas, cisteinproteasas, aspartoproteasas y metaloproteasas (Dubey et al., 2007).

El látex extraído de la papaya contiene un coctel de enzimas proteolíticas conocidas como cisteinproteasas (EC 3.4.22), también llamadas proteasas sulfhidrúlicas o tiólicas. Estas enzimas actúan gracias a la presencia de un grupo tiol (-SH) en un residuo de cisteína ubicado en su sitio activo, el cual es esencial

para su función. Entre las proteasas vegetales identificadas en el látex de *Carica papaya*, destaca la papaína, también llamada proteinasa I, por ser la más utilizada en aplicaciones industriales. Además de esta, se han aislado otras enzimas como la quimopapaína (proteínasa II de la papaya), la caricaína (proteínasa III de papaya) y la glycilendopeptidasa (proteínasa IV de papaya); aunque la papaína es la enzima en menor proporción en el látex es la más estudiada ya que es la de más fácil purificación y mayor uso industrial (Alarcón, 2009).

Las proteasas cisteínicas son un grupo de enzimas proteolíticas que utilizan un residuo de cisteína en su sitio activo para catalizar la ruptura de enlaces peptídicos en proteínas, las peptidasas cisteínicas actúan mediante un mecanismo en el que el grupo tiol de la cisteína ataca el carbono carbonílico del enlace peptídico, facilitando su ruptura. Este proceso es fundamental en la digestión de proteínas y en la regulación de diversas funciones biológicas (Freitas, et al, s/f); las peptidasas cisteínicas son enzimas clave en la degradación de proteínas, con importantes aplicaciones en la salud y la industria, y su estudio sigue siendo relevante en la investigación científica.



Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas

**Papaína** (EC 3.4.22.2): También conocida proteínasa I de papaya una enzima proteolítica obtenida de los frutos de *Carica papaya* (Brenda, 2024), posee una amplia gama de aplicaciones nutricionales, médicas y farmacéuticas. Esta enzima de alto peso molecular, compuesta por 212 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro, rompe principalmente los enlaces peptídicos presentes en los aminoácidos básicos, especialmente arginina, lisina y fenilalanina (Amri y Mamboya, 2012). Cabe destacar su estabilidad en un amplio rango de temperaturas y pH (3-9) (Amri y Mamboya, 2012) La papaína pura, una proteína

constituida por 212 residuos aminoacídicos, presenta una estructura compleja con dos partes separadas por un puente que alberga un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre de un residuo de cisteína, lo que la caracteriza como una cisteína proteasa (Cutler y Chaves, 1991). Esta enzima, que guarda similitud con las proteasas humanas, mantiene su estructura estable gracias a la formación de puentes disulfuro, los cuales se originan por la unión de residuos de cisteína en su cadena proteica (Cutler y Chaves, 1991). Gracias a estos puentes disulfuro, la papaína muestra una notable resistencia al calor, manteniéndose estable incluso entre los 60 °C y 90 °C. Su actividad máxima se alcanza aproximadamente a los 65 °C (Cutler y Chaves, 1991).

La papaína es una enzima proteolítica del tipo cisteína endolítica (EC 3.4.22.2), reconocida por su amplia especificidad en la degradación de proteínas y por su notable estabilidad térmica (Islam y Molinar, 2013). La papaína se activa en presencia de compuestos como la cisteína, el tiosulfato y el glutatión, todos ellos relacionados con el azufre. Sin embargo, su actividad puede verse reducida o incluso inhibida por ciertos iones metálicos como el zinc, cadmio, hierro y plomo, así como por sustancias oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y los radicales libres o por compuestos que interfieren con los grupos tiol, como el ácido ascórbico (Chaverri, 1986).

**Quimopapaína** (EC 3.4.22.6) Es conocida también como proteinasa II de papaya, (Brenda, 2024). Se distingue de la papaína por sus propiedades electroforéticas, su solubilidad y la especificidad hacia sus sustratos. Se sabe que tiene una masa molecular de 24 kDa y un punto isoeléctrico que varía entre 10,1 y 10,6. Esta enzima ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de hernias discales, donde se aplica directamente en los discos intervertebrales mediante un procedimiento llamado quimionucleólisis, ya que es capaz de degradar los proteoglicanos que se acumulan durante la degeneración de estos discos (Campos, 2001).

La actividad de la quimopapaína puede verse inhibida por iones de metales pesados como la plata (Ag), el cobre (Cu) y el zinc (Zn). Por el contrario, son activadores la cisteína, el dimercaptopropanol y el ácido tioglicólico (Sinche, 2009). En cuanto a su condición óptima, esta enzima actúa de manera más eficiente al digerir caseína y hemoglobina en un rango de pH cercano a 7,2, alcanzando su máximo alrededor de pH 9 (Sinche, 2009).

**Caricaína** (EC 3.4.22.30), También llamada proteinasa III de la papaya, es una enzima que actúa sobre las proteínas, catalizando sus enlaces peptídicos. En

comparación con otras enzimas presentes en el látex de *Carica papaya*, la caricaína destaca por funcionar en condiciones extremas alcalinas. Además, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y una alta eficacia para descomponer proteínas complejas en aminoácidos más simples (Kaarsholm y Shack, 2005).

**Glicilendopeptidasa** (EC 3.4.22.25) Esta enzima conocida también como proteinasa IV de papaya que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos con preferencia por Gly-XXa en proteínas y de pequeñas moléculas de sustrato. La enzima, miembro de la familia C1 de las peptidasas, es aislada de la planta de papaya, *Carica papaya*. A diferencia de la mayoría de las enzimas similares a la papaína, la caricaína no es inhibida por la cistatina de pollo, un inhibidor natural de las proteasas cisteínicas (Buttle y Barrett, 1984).

### **2.2.5 Enzimas**

Las enzimas son un tipo especial de proteínas formadas por largas cadenas de aminoácidos unidas entre sí. Una de sus funciones más importantes es acelerar muchas de las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos. Para cumplir esta tarea, necesitan mantener su forma tridimensional, ya que en esa estructura se ubican los llamados sitios activos. Estos sitios tienen la capacidad de reconocer y unirse a ciertas moléculas llamadas sustratos, que luego son transformadas en productos. Esta transformación ocurre gracias a la interacción específica entre partes de la enzima y del sustrato, lo que facilita el proceso (Ramírez y Ayala, 2014).

Las enzimas son biomoléculas catalíticas que aceleran las reacciones bioquímicas en los sistemas biológicos. Según los "Principios de bioquímica de Leininger" (7ª edición), las enzimas son esenciales para la regulación y ejecución de la mayoría de los procesos metabólicos que ocurren dentro de las células. Estas proteínas especiales funcionan reduciendo la energía de activación necesaria para una reacción, lo que permite que los procesos bioquímicos se produzcan de forma más rápida y eficiente (Lehninger, 2021).

Por otro lado, "Bioquímica ilustrada de Harper" enfatiza que las enzimas no sólo aceleran las reacciones, sino que también proporcionan especificidad a las vías metabólicas, esta especificidad se atribuye a la estructura tridimensional única de cada enzima, que determina su afinidad por ciertos sustratos. Además, las enzimas pueden regularse mediante una variedad de mecanismos, como la inhibición competitiva, modificaciones alostéricas y covalentes, lo que les permite responder dinámicamente a las necesidades de la célula (Harper, 2020).

Como las enzimas sólo actúan sobre ciertos compuestos y aceleran únicamente reacciones específicas, el tipo de metabolismo de cada célula depende de las enzimas que esta es capaz de reaccionar (Gacesa, 1990).

### Tipos de Enzimas

Generalmente, el nombre de una enzima se forma a partir del sustrato sobre el que actúa o del tipo de reacción que acelera, y termina con el sufijo “-asa”. Por ejemplo, la enzima lactasa recibe su nombre porque actúa sobre la lactosa; alcohol deshidrogenasa proviene de la reacción que cataliza que consiste en "deshidrogenar" el alcohol; ADN polimerasa proviene también de la reacción que cataliza que consiste en polimerizar el ADN (Berg, 2012). La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha desarrollado una nomenclatura para identificar a las enzimas basadas en los denominados Números EC. De este modo, cada enzima queda registrada por una secuencia de cuatro números precedidos por las letras "EC". El primer número clasifica a la enzima según su mecanismo de acción.

**Tabla 2.** Clasificación de las enzimas en la actualidad.

Grupo	Acción	Ejemplos
<b>EC 1. Oxidorreductasas</b>	Catalizan reacciones de oxidación-reducción. Incluyen deshidrogenasas y oxidasa.	Alcohol deshidrogenasa, Catalasa
<b>EC 2. Transferasas</b>	Transfieren grupos funcionales (como metil o fosforil) de una molécula a otra.	Hexoquinasa, Transaminasas
<b>EC 3. Hidrolasas</b>	Catalizan la ruptura de enlaces mediante la adición de agua.	Lipasa, Amilasa
<b>EC 4. Liasas</b>	Rompen enlaces C-C, C-O, C-N u otros enlaces mediante mecanismos distintos a la hidrólisis y la oxidación.	Piruvato descarboxilasa
<b>EC 5. Isomerasas</b>	Catalizan la isomerización de una molécula, transformando un isómero en otro.	Trifosfato isomerasa, Racemasa
<b>EC 6. Ligasas</b>	Forman enlaces C-C, C-O, C-S, C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.	ADN ligasa, Piruvato carboxilasa

Fuente: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2024). Enzyme Nomenclature.*

### 2.2.6 Caseína

Son las principales proteínas que se encuentran en la leche y se producen únicamente en la glándula mamaria. En su forma natural, se agrupan formando estructuras complejas llamadas micelas de caseína. En el caso de la leche de vaca, estas proteínas representan cerca del 80 % del contenido proteico total, lo que equivale a unos 25 a 28 gramos por litro. En cambio, la leche materna contiene una mayor proporción de proteínas del suero, por lo que las caseínas constituyen solo aproximadamente la mitad del total, entre 5 y 8 gramos por litro (Calvo, 2017).

**Tabla 3.** Estructura y características de la caseína.

Tipo de Caseína	Estructura y Características
$\alpha 1$	Mayoritaria en leche de vaca. Posee regiones hidrofóbicas y zonas con carga neta negativa. Contiene 17 residuos de prolina. Asociación con otras caseínas a través de interacciones hidrofóbicas.
$\alpha 2$	Presenta puentes disulfuro y tres regiones de carga neta negativa. Más hidrofílica que $\alpha 1$ .
$\beta$	La más hidrofóbica, con dos zonas diferenciadas: hidrofóbica en el extremo C-terminal e hidrofílica en el extremo N-terminal.
$\kappa$	Más pequeña, con menor fosforilación y menos interacción con el calcio. Posee una zona con carga neta positiva y grupos de cisteína. Se rompe fácilmente por proteólisis en un punto específico, lo que desestabiliza la micela.
$\gamma$	Son fragmentos de caseína $\beta$ formados por la acción de la plasmina. Representa alrededor del 3% del total de caseínas.

Fuente: (Calvo, 2017).

### 2.2.7 Actividad enzimática

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y su nivel de actividad. La actividad enzimática generalmente se expresa en miligramos por mililitro (mg/ml) de sustrato convertido en producto por minuto en condiciones de prueba específicas. La actividad específica de un sistema enzimático se define como el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$  o U/mg proteína) (Arana y Quijano, 2012).

El término "actividad enzimática" se refiere a la velocidad con que se produce una reacción catalizada por una enzima. Nótese que excluimos cualquier otro significado del término "actividad"; en el presente estudio, una enzima muy activa significa que está catalizando una reacción muy rápidamente. La actividad es una medida de la concentración de enzima porque la velocidad de una reacción enzimática es siempre directamente proporcional a la concentración de enzima.

Las unidades de velocidad se utilizan para representar la actividad enzimática. En un principio, se usaban unidades arbitrarias que se derivaban del método de ensayo, y se le daba un nombre al autor del método. Así se hablaba de las unidades Bodansky, Karmen, Rosalki, etc. Posteriormente, se estableció una norma para medir la actividad enzimática tanto en la Unidad Internacional como en el katal (Battaner, 2013).

### **2.2.8 Medición de la actividad enzimática**

Uno de los principales indicadores para evaluar la calidad de la papaína es su actividad proteolítica. Esta se determina observando qué tanto acelera la enzima la conversión de un sustrato en producto. Además, la capacidad catalítica de la papaína puede medirse mediante su eficacia al degradar una proteína o un péptido, y el grado de esta degradación se evalúa a través de distintos métodos existen dos:

- Métodos que miden los grupos amino liberados en la catálisis.
- Métodos que miden la concentración del sustrato degradado en una unidad de tiempo. El método Biuret es una reacción bioquímica que permite detectar la presencia de compuestos con dos o más enlaces peptídicos, como proteínas y péptidos cortos, en una muestra. Este método se basa en la reacción del reactivo de Biuret con los enlaces peptídicos, lo que produce un cambio de color en función de la cantidad de proteína presente. El reactivo de Biuret utilizado en este método consiste en una solución alcalina de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) complejado con tartrato de sodio y potasio. Cuando el reactivo de Biuret entra en contacto con los enlaces peptídicos, se forma un complejo de cobre-proteína que cambia de color. El color característico varía según el tipo de proteína presente y la intensidad del color está relacionado con la cantidad de proteína en la muestra. En resumen, el método Biuret se basa en la capacidad del reactivo de Biuret para formar un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas, lo que produce un cambio de color que permite detectar y estimar la presencia de proteínas y péptidos cortos en una muestra (Fujimoto et al., 1985).

El método de Biuret se basa en la reacción química entre el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y los enlaces peptídicos de las proteínas en presencia de un agente alcalino. Cuando las proteínas se mezclan con el reactivo de Biuret, se produce la formación de un complejo coloreado de color violeta intenso. Este complejo se genera debido a la presencia de dos o más enlaces peptídicos contiguos en la

estructura de la proteína, lo que provoca la reducción del ion cúprico a ion cuproso (Cu<sup>+</sup>), generando el cambio de color característico (Fujimoto et al., 1985).

La intensidad del color violeta formado está directamente relacionada con la concentración de proteínas presentes en la muestra, lo que permite cuantificar la cantidad de proteínas mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda específica, generalmente a 545 nm. Por lo tanto, el fundamento del método de Biuret radica en la capacidad de las proteínas para reaccionar con el reactivo de Biuret y formar un complejo coloreado que puede ser cuantificado espectrofotométricamente para determinar la concentración de proteínas en una muestra (Cerdeira, 2016).

El método de Biuret modificado por Robinson se basa en una mejora del método original de Biuret para la cuantificación de proteínas. En este método modificado, se añaden reactivos adicionales que aumentan la sensibilidad y precisión de la determinación de proteínas, especialmente en muestras con concentraciones bajas de proteínas. Estos reactivos adicionales permiten una mayor estabilidad del complejo coloreado formado, lo que facilita la medición precisa de la absorbancia y, por lo tanto, la cuantificación de proteínas con mayor exactitud (Berg et al., 2012).

### **2.3.9 Factores que afectan la actividad proteolítica**

#### **Oxidación química**

La actividad de la enzima puede verse afectada negativamente por la presencia de agentes oxidantes como el yodo, bromo, peróxido de hidrógeno, oxígeno e incluso algunos metales pesados, ya que tienden a desactivarla. Esto ocurre porque el mecanismo catalítico de la enzima depende de grupos sulfhidrilo (-SH), los cuales deben mantenerse en estado reducido para que la enzima funcione correctamente. Al oxidarse, estos grupos pierden su capacidad de participar en la reacción, lo que provoca la inactivación de la enzima (Chaverri, 1986). La papaína se inactiva por oxidación química mediante agentes como yodo, bromo, peróxido de hidrógeno, oxígeno y metales pesados (Chávez et al., 2011).

#### **Coagulación**

El látex fresco de papaya tiende a coagular poco tiempo después de ser extraído. Esto se debe a su composición rica en proteínas, como peptonas y compuestos albuminoides, que favorecen este proceso natural (Chaverri, 1986).

La coagulación del látex ocurre cuando su sistema coloidal se desestabiliza, provocando que las partículas dispersas se agrupen y se separen del medio en el que estaban suspendidas (Cahueque, 2008).

#### **Cambios de pH**

Una característica destacada de la papaína es su capacidad para conservar la actividad proteolítica en un rango amplio de pH, que va desde 3 hasta 12, mostrando su máxima eficacia entre pH 6 y 7. Además, el pH óptimo para que esta enzima funcione correctamente varía según el tipo de sustrato, ya que suele coincidir con el punto isoeléctrico del sustrato (Chaverri, 1986).

#### **Oxidación por luz**

Pierde su actividad al exponerse a la luz ultravioleta, ya que se oxida rápidamente cuando está bajo la acción de los rayos solares y el oxígeno. (Chaverri, 1986).

#### **Crecimiento microbiano**

Por ser un material proteico y debido a las condiciones en que se recolecta, el látex es vulnerable a la contaminación por microorganismos (Chaverri, 1986).

#### **Hora de recolección**

Hay varios criterios para la recolección, pero el más común es hacerlo en las primeras horas del día para evitar la intensa exposición a los rayos del sol. (Chaverri, 1986).

#### **Métodos de secado**

Dado que la papaína es una enzima sensible que puede dañarse fácilmente por el oxígeno, la luz solar y las altas temperaturas, el método de secado empleado influye mucho en la calidad final de la enzima, el secado al sol produce un producto con poca actividad proteolítica, por lo que no es recomendable utilizarlo. (Chaverri, 1986). El secado por corrientes de aire caliente, rinde un producto de mejor calidad que el método anterior, más claro y con mayor actividad proteolítica. El secado al vacío, rinde un producto de alta actividad proteolítica, blanco, cremoso. Su actividad es mayor debido a que durante el proceso de secado, el producto no está en contacto con el aire (Chaverri, 1986).

#### **2.3.10 Cinética enzimática**

La cinética enzimática es el estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Las enzimas son proteínas que aceleran la velocidad de las reacciones químicas en las células vivas. (Lehninger, 2021). La catálisis tiene lugar específico en el sitio activo una idea importante sobre la catálisis enzimática a principios del siglo XX surgió de la observación de que la presencia de un

sustrato hacía que las enzimas fueran más resistentes a los efectos desnaturizantes de las altas temperaturas. Esta observación llevó a Emil Fischer a proponer que las enzimas y sus sustratos interactúan para formar un complejo enzima-sustrato que es térmicamente más estable que la propia enzima; esta idea ha tenido un impacto significativo en nuestra comprensión de las propiedades químicas y el comportamiento cinético de la catálisis enzimática (Rodwell et al., 2019). Las reacciones químicas son descritas utilizando ecuaciones equilibradas una ecuación química balanceada muestra las sustancias químicas. Las iniciales de las sustancias químicas existentes (sustratos) y nuevas formas para una reacción química particular (productos) se encuentran debajo. Proporciones relevantes o estequiometría, por ejemplo, la ecuación balanceada (1) representa esto en cada molécula, los sustratos A y B reaccionan para formar una sola molécula (Rodwell et al., 2019). Productos P y Q:  $A + B \rightleftharpoons P + Q$  (1).

### **2.3.11 Factores que afectan la velocidad de reacción catalizadas por enzimas**

#### **Temperatura**

El aumento de la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y no catalizadas al aumentar la energía cinética de las moléculas y la frecuencia de las colisiones que reaccionan, sin embargo, la energía térmica también puede aumentar la curvatura conformacional de la enzima hasta un punto que cruzar la barrera energética para romper la interacción no significa covalentes que conservan su estructura tridimensional, la cadena del polipéptido comienza a plegarse o desnaturizarse pérdida asociada de actividad catalítica. El rango de temperatura en el que la enzima mantiene una forma estable y catalíticamente competente depende de su extensión moderado la temperatura normal de las células en las que vive (Rodwell et al., 2019).

La actividad de las enzimas es muy sensible a la temperatura. Si se exponen a temperaturas demasiado altas, pueden perder su estructura y función debido a la desnaturización. Aunque las altas temperaturas inicialmente aumentan la velocidad de reacción, a largo plazo dañan la enzima. Por el contrario, las bajas temperaturas ralentizan las reacciones, pero prolongan la vida útil de la enzima al mantener su estructura estable. Es importante tener en cuenta que la temperatura óptima para una reacción enzimática también influye en la concentración ideal de otros componentes, como el pH (Labandera y Malarczuk 2019).

### **Concentración de iones de hidrógeno**

Las enzimas requieren un ambiente con un pH particular para desempeñarse eficazmente. Este valor, conocido como pH óptimo, es esencial para que la proteína conserve su estructura tridimensional, lo cual le facilita realizar su función de catalizador. Cuando el pH se cambia excesivamente, ya sea hacia niveles más ácidos o más alcalinos, las interacciones internas de la enzima se alteran. Esto puede modificar su forma, particularmente el sitio activo, que es la zona responsable de conectarse al sustrato. Por lo tanto, lo que reduce o incluso elimina su actividad. (Timberlake 2013).

Las enzimas tienen grupos químicos ionizables (carboxilos COOH; amino-NH<sub>2</sub>; tiol-SH; imidazol, etc.) se encuentra en la cadena lateral de su aminoácido. Dependiendo del pH del medio, estos grupos pueden tener carga positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas, depende en parte de su carga, existe un pH en el que la conformación es más estable. Es adecuado para actividad catalítica, a esto se le llama pH óptimo (Labandera y Malarczuk 2019).

### **Concentración del sustrato**

La concentración del sustrato tiene un impacto directo en la actividad de la enzima, puesto que establece la rapidez con la que se produce la reacción catalizada por esta. En concentraciones reducidas de sustrato, el aumento en su cantidad influye un incremento correspondiente en la rapidez de la reacción, ya que existen más moléculas capaces de interactuar con los sitios activos de las enzimas. En otras palabras, bajo condiciones de pseudoprimer orden el comportamiento de una enzima multisustrato imitará a uno que tiene un sustrato único. En este caso, la constante de velocidad observada será una función de la constante de velocidad  $k_1$  para la reacción y de la concentración del sustrato fijo (Rodwell et al., 2019).

Conforme la cantidad de sustrato disponible se incrementa, las enzimas comienzan a operar con mayor rapidez, dado que sus sitios activos se van llenando. No obstante, se produce un instante en el que todas las enzimas se encuentran ocupadas y no pueden procesar más sustrato simultáneamente. En ese momento, la velocidad de la reacción se estabiliza y llega a su máximo nivel, independientemente de cuánto más sustrato se adicione. Este fenómeno se ha descrito a través del modelo sugerido por Michaelis y Menten, que ilustra cómo cambia la rapidez de una reacción dependiendo de la concentración del sustrato. (Rodwell et al., 2019).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de ejecución**

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga departamento de Ayacucho, provincia Huamanga, distrito Ayacucho; en los meses de octubre del 2023 a marzo del 2024. Ubicado en la Av. Independencia s/n. y con altitud de 2788 m s.n.m.

#### **3.2 Materiales**

##### **3.2.1 Muestra vegetal**

12 unidades de frutos de *Carica papaya* L. "papaya" inmaduras provenientes del distrito de Palmapampa, provincia La Mar departamento de Ayacucho. Los frutos recolectados fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología, donde se procedió a lavar y desinfectar.

#### **3.3 Diseño metodológico:**

##### **3.3.1 Extracción de látex**

Los frutos de color verde oscuro inmaduros fueron lavados y luego desinfectados con alcohol al 70 % y secados con papel toalla para evitar contaminar las muestras de látex extraídos, se manipuló con guantes; una medida preventiva esencial para evitar la contaminación microbiana, para minimizar los riesgos de contaminantes que podrían afectar los hallazgos de la investigación.

Después de la desinfección, se secaron los frutos con papel toalla que elimina cualquier resto de la superficie de la fruta que pueda afectar las propiedades del látex. El uso de guantes durante la manipulación y la realización de incisiones con materiales no corrosivos es otra práctica fundamental que se ha adoptado para evitar la introducción de impurezas y asegurar la integridad química del látex.

##### **3.3.2 Adición de preservantes**

Se pesó la muestra de látex de papaya obtenida y se adicionó 0,4 % de bisulfito de sodio (agente antioxidante o retardante de la oxidación química y agente

antimicrobiano) a temperatura ambiente, procurando no dejar la muestra expuesta por mucho tiempo para prevenir posibles contaminaciones. (Luna, 2017).

### **3.3.3 Almacenamiento**

El látex se ha almacenado en envase oscuro a 4 °C para mantener su estabilidad. La luz y la temperatura tienen el potencial de acelerar la degradación de las enzimas proteolíticas, lo que reduce su eficacia en análisis posteriores.

### **3.3.4 Preparación de solución buffer fosfato**

Su principal función es mantener un pH estable, lo que resulta esencial para que muchas reacciones bioquímicas ocurran de manera eficiente y se prepararon dos soluciones que son:

Solución A: Solución monobásica de fosfato de sodio 0,2 mol/l (27,8 g en 1000 mL) y Solución B: Solución dibásica de fosfato de sodio 0,2 mol/l (53,65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o sino 71,7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL))

### **3.3.5 Curva patrón o curva de calibración**

En la obtención de la curva patrón se ha usado el método de Biuret modificado por Robinson que fue una elección apropiada y bien fundamentada para la cuantificación de proteínas en este estudio. Este método es muy reconocido por su precisión y confiabilidad en la medición de concentraciones proteicas, lo cual es esencial para una interpretación precisa de la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L.

Se preparó soluciones estándar de caseína a concentraciones de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2,0 mg/ml que garantiza un rango adecuado para crear una curva de calibración sólida y lineal. La inclusión de un blanco reactivo (agua destilada) permite establecer una línea base que corrige cualquier absorbancia debida a los reactivos o al medio, asegurando que las lecturas obtenidas sean exclusivamente atribuibles a la proteína presente en las muestras.

Se utilizó el método de Biuret modificado por Robinson.

- Se colocaron en una gradilla 6 tubos de ensayo de 10x100 mm, se prepararon soluciones estándar de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2,0 mg/ml, de caseína, por dilución a partir de una solución concentrada de 2,0 mg/ml de caseína. Se usó 0,5 ml de cada concentración.
- Luego se añadieron 2 ml de reactivo de Biuret modificado por Robinson y se agitó.
- Se utilizaron 0,5 ml agua destilada, como blanco reactivo.
- Se ajustaron los valores obtenidos, por el método de regresión lineal.

La ecuación que describe la relación entre la concentración de caseína y la absorbancia medida se crea utilizando la técnica de regresión lineal para ajustar los valores obtenidos. Dado que proporciona una herramienta matemática para extrapolar las concentraciones desconocidas a partir de las absorbancias medidas, esta ecuación es fundamental para la cuantificación precisa de las proteínas en las muestras de látex de papaya.

### **3.3.6 Determinación de la actividad enzimática**

1. Se colocó 0,5 ml de solución de caseína y 0,5 ml de solución de enzima en tubos de 13 x 100 mm y se dejaron reaccionar durante 60 minutos, a 50 °C y 60 °C (de acuerdo al tratamiento). A estos tubos se denominó Problema.
2. Se detuvo la reacción con 1,0 ml de ácido tricloroacético (ATA) y se dejó reposar el precipitado formado, por 5 minutos.
3. Para el tubo Control, se mezclaron 0,5 ml de enzima y se añadieron 0,5 ml de sustrato y 1,0 ml de ATA. y se dejó reposar por 5 minutos.
4. Se centrifugaron los tubos problema y control. Se eliminaron el sobrenadante.
5. Al precipitado se aplicó por el Método de Biuret modificado por Robinson y se leyó la absorbancia a 545 nm.

**Control negativo:** Un control en un experimento de determinación de actividad enzimática es una muestra que se utiliza como punto de referencia para comparar los resultados obtenidos en las muestras experimentales. Sirve para asegurar que los cambios observados en las muestras experimentales se deben a la variable que estamos estudiando (en este caso, la actividad enzimática) y no a otros factores externos o a errores en el procedimiento.

**Concentración final:** Después de la incubación y tratamiento con el látex, la cantidad de caseína no hidrolizada se midió mediante la absorbancia a 545 nm. La diferencia entre la concentración inicial y final de caseína representaba la cantidad de proteína hidrolizada por el látex de papaya. Esta reducción fue una medida de la actividad enzimática del látex: Caseína hidrolizada (mg/ml) = Concentración inicial - Concentración final.

### **3.4 Tipo de investigación**

Básica-experimental, pues aquí se controla y manipula las variables claves, esto permite observar directamente los efectos que produce la variable independiente sobre la variable dependiente, siguiendo el enfoque planteado por Hernández et al. (2021).

### 3.5 Diseño de investigación

Experimental, en el trabajo de investigación se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial  $2^3$ , siendo las variables de estudio: temperatura (50 y 60 °C), pH (6,5 y 7,0) y concentración de sustrato (1 y 2 mg/ml). La combinación de los niveles de cada variable originó ocho tratamientos. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Tratamientos	Temperatura	pH	Concentración de caseína
T1	50 °C	6,5	1 mg/ml
T2	50 °C	6,5	2 mg/ml
T3	50 °C	7,0	1 mg/ml
T4	50 °C	7,0	2 mg/ml
T5	60 °C	6,5	1 mg/ml
T6	60 °C	6,5	2 mg/ml
T7	60 °C	7,0	1 mg/ml
T8	60 °C	7,0	2 mg/ml

### Justificación metodológica

Estas variables y sus niveles fueron seleccionados en base a antecedentes científicos previos que reportan rangos de actividad óptima para proteasas de *Carica papaya*, particularmente papaína. Según Vite y Pérez (2021), valores de pH cercanos a la neutralidad (6,5 y 7,0) favorecen la estabilidad estructural y catalítica de estas enzimas, mientras que Babalola et al. (2023) y Mahatara y Maskey observaron máxima actividad enzimática en temperaturas entre 56,8 °C y 60 °C respectivamente. La elección de estos rangos se fundamenta además en las recomendaciones metodológicas de Hernández et al. (2021), quienes proponen que los diseños experimentales deben contemplar niveles controlados, pertinentes y con fundamento teórico, lo que permite mejorar la validez interna de los resultados experimentales.

### Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo que contenía 20 µg/ml de látex de papaya al que se le asignó aleatoriamente a uno de los ocho tratamientos. En total se requirió 24 unidades experimentales.

### 3.6 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se empleó Microsoft Excel y con el apoyo del software estadístico Minitab se llevaron a cabo los análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey según propuesto por Wayne (2011).

ANOVA: Para analizar el efecto individual de cada tratamiento y variable independiente y sus interacciones sobre la actividad enzimática.

Prueba de Tukey: Para realizar comparaciones múltiples y determinar si existen diferencias significativas entre las combinaciones de tratamientos.

Regresión lineal: para ajustar la curva patrón, y para modelar cómo la actividad enzimática varía con los parámetros fisicoquímicos.

#### **IV. RESULTADOS**

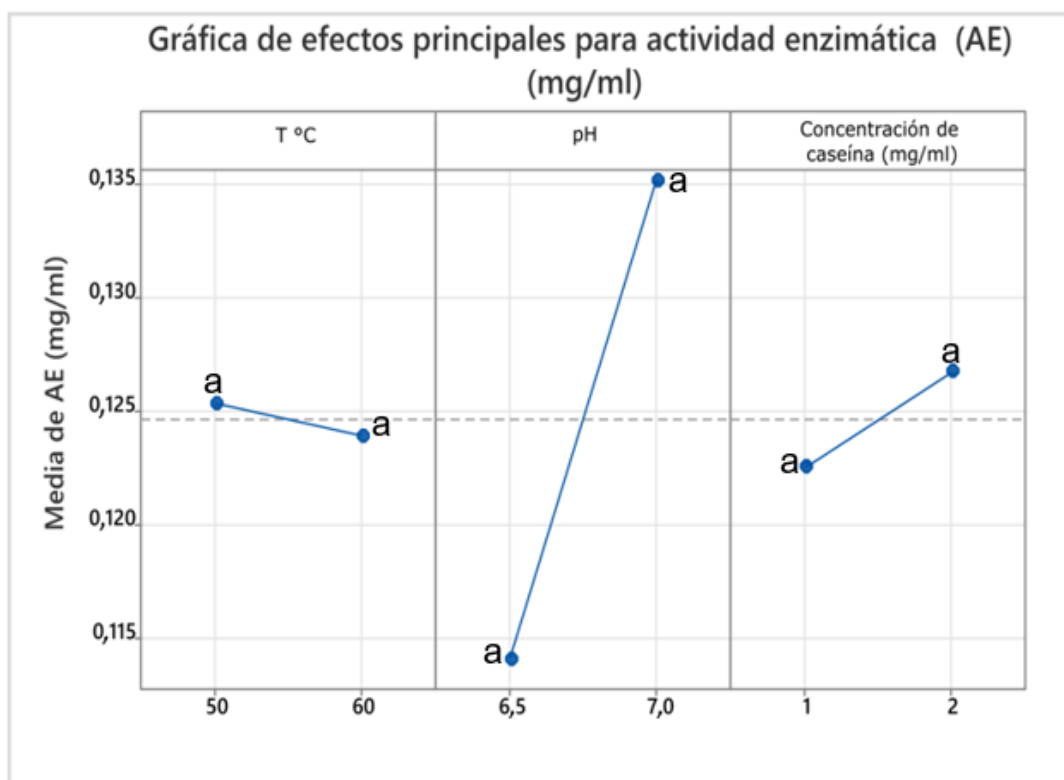
**Tabla 4.** Evaluación de la Actividad Enzimática de Látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína mediante la variación de temperatura, pH y concentración de sustrato, evaluado a los 0 y 60 minutos. Ayacucho, 2024.

Tratamiento	Tiempo (min)	Promedio de caseína (mg/ml)	Desv. Est.	Actividad enzimática (AE) Diferencia	Valor T	Valor P																																																																												
T1	0	0,464	0,103	0,113	1,25	0,3																																																																												
	60	0,351	0,117				T2	0	0,571	0,085	0,152	3	0,030*	60	0,419	0,055	T3	0	0,284	0,055	0,085	2,61	0,059	60	0,199	0,034	T4	0	0,639	0,115	0,152	2,38	0,078	60	0,487	0,055	T5	0	0,351	0,068	0,090	2	0,139	60	0,261	0,039	T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069	60	0,537	0,065	T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38
T2	0	0,571	0,085	0,152	3	0,030*																																																																												
	60	0,419	0,055				T3	0	0,284	0,055	0,085	2,61	0,059	60	0,199	0,034	T4	0	0,639	0,115	0,152	2,38	0,078	60	0,487	0,055	T5	0	0,351	0,068	0,090	2	0,139	60	0,261	0,039	T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069	60	0,537	0,065	T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078						
T3	0	0,284	0,055	0,085	2,61	0,059																																																																												
	60	0,199	0,034				T4	0	0,639	0,115	0,152	2,38	0,078	60	0,487	0,055	T5	0	0,351	0,068	0,090	2	0,139	60	0,261	0,039	T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069	60	0,537	0,065	T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																
T4	0	0,639	0,115	0,152	2,38	0,078																																																																												
	60	0,487	0,055				T5	0	0,351	0,068	0,090	2	0,139	60	0,261	0,039	T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069	60	0,537	0,065	T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																										
T5	0	0,351	0,068	0,090	2	0,139																																																																												
	60	0,261	0,039				T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069	60	0,537	0,065	T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																																				
T6	0	0,639	0,065	0,101	2,22	0,069																																																																												
	60	0,537	0,065				T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656	60	0,351	0,191	T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																																														
T7	0	0,453	0,143	0,102	0,6	0,656																																																																												
	60	0,351	0,191				T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8	60	0,486	0,287	Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																																																								
T8	0	0,588	0,334	0,102	0,33	0,8																																																																												
	60	0,486	0,287				Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731	60	0,464	0,078																																																																		
Tc	0	0,487	0,068	0,023	0,38	0,731																																																																												
	60	0,464	0,078																																																																															

(-) significativo para  $\alpha=0.10$ ; (\*) significativo para  $\alpha=0.05$

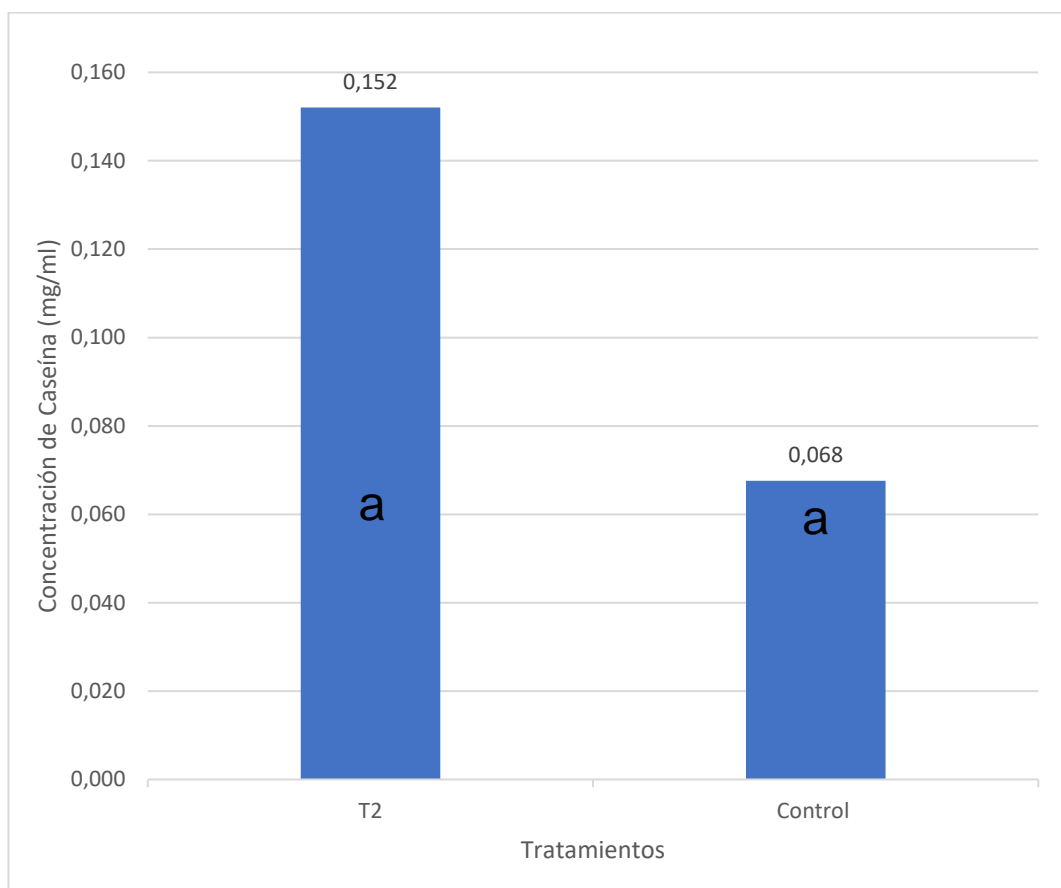
Tratamientos	Temperatura °C	pH	Concentración de caseína mg/ml
T1	50	6,5	1 mg/ml
*T2	50	6,5	2 mg/ml
*T3	50	7,0	1 mg/ml
*T4	50	7,0	2 mg/ml
T5	60	6,5	1 mg/ml
*T6	60	6,5	2 mg/ml
T7	60	7,0	1 mg/ml
T8	60	7,0	2 mg/ml
Tc	50	7,0	2 mg/ml

**Figura 1.** Efectos principales en la actividad enzimática de látex de *Carica papaya* L. bajo las combinaciones de los niveles de temperatura, pH, y concentración de sustrato en la hidrólisis de caseína. Ayacucho, 2024.



Prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras iguales no difieren significativamente.

**Figura 2.** Comparación de la papaína (enzima comercial TICIFY 100 000U/G) frente a látex de papaya a una temperatura de 50 °C, pH 6,5 y concentración de sustrato de 2 mg/ml evaluado a los 0 y 60 minutos. Ayacucho, 2024.



Prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. "papaya" y la optimización de los parámetros fisicoquímicos, como temperatura, pH y la concentración de caseína en la hidrólisis de la caseína, Los hallazgos obtenidos confirman la notable capacidad catalítica del látex sobre el sustrato proteico estudiado.

En esta investigación, el látex de *Carica papaya* L. se extrae siguiendo un protocolo riguroso y detallado, esto garantizó la obtención de un látex de alta calidad y libre de contaminantes, dado que se esperó una mayor concentración de enzimas proteolíticas, especialmente papaína, durante esta etapa de desarrollo, fue esencial seleccionar frutos inmaduros, este criterio se basa en estudios previos que han demostrado que el contenido enzimático del látex de los frutos de papaya varía significativamente con la madurez del fruto (Vite y Pérez, 2021).

En la tabla 4 se pudo observar los parámetros fisicoquímicos evaluados del tiempo en la hidrólisis de caseína que todos los tratamientos analizados desde el tratamiento 1 al 8, se observó una reducción progresiva en la concentración de caseína transcurrido los 60 minutos de reacción, este comportamiento demuestra que el látex de *Carica papaya* L. posee enzimas con actividad proteolítica capaces de hidrolizar la caseína, aunque la eficiencia de este proceso depende de las condiciones específicas de cada tratamiento. En el caso del tratamiento control negativo (Tc), no se detectan cambios significativos en la concentración de caseína, lo que confirma que la disminución observada en los demás tratamientos es atribuible a las enzimas presentes en el látex; Los hallazgos coinciden con los reportados por Hulikere et al. (2014), quienes observaron que la degradación del sustrato aumenta con el tiempo debido a la actividad proteolítica de las enzimas presentes en el látex.

En la tabla 4 el efecto de la concentración de caseína en los tratamientos con una mayor concentración de caseína (2 mg/ml), como T2 y T4, mostraron una mayor reducción del sustrato en comparación con los de menor concentración. Esto sugiere que una mayor disponibilidad de sustrato mejora la actividad enzimática, probablemente debido a una saturación más efectiva de las enzimas proteolíticas. Este hallazgo coincide con investigaciones previas que destacan la influencia de la relación enzima-sustrato en la eficiencia del proceso, este hallazgo respalda la hipótesis de que la actividad enzimática aumenta con la concentración de sustrato, además respaldando la cinética de Michaelis-Menten, donde la velocidad de reacción aumenta con la concentración de sustrato hasta un punto de saturación. La relación directa entre la concentración de caseína y la actividad enzimática, como se observa en los tratamientos con 2 mg/ml (T2 y T4), está alineada con lo informado por Babalola et al. (2023) y Mahatara y Maskey (2023). Estos autores destacaron que la saturación enzimática mejora la eficiencia catalítica hasta un punto, lo que respalda el uso de concentraciones relativamente altas de sustrato. Sin embargo, el presente trabajo identifica que este comportamiento no siempre resulta en diferencias significativas, subrayando la necesidad de evaluar esta interacción en mayor detalle.

En la tabla 4 la influencia del pH, se evaluaron dos rangos de pH: 6,5 y 7,0, ambos cercanos al intervalo óptimo para enzimas proteolíticas como la papaína. Los tratamientos realizados a pH 6,5 particularmente T2, lograron mejores resultados en comparación con aquellos a pH 7,0. Esto podría indicar que un pH ligeramente ácido favorece la actividad catalítica de las enzimas presentes en el látex, lo cual es consistente con las propiedades de las proteasas de látex de papaya. Este comportamiento refuerza las observaciones de Vite y Pérez (2021), quienes indicaron que valores ligeramente ácidos optimizan la actividad enzimática en sistemas similares.

En la tabla 4 el efecto de la temperatura fue otro factor en la actividad enzimática; los tratamientos realizados a 50°C (T1-T4) mostraron mejores resultados en general, siendo T2 el más destacado, con una diferencia significativa en la concentración de caseína (valor  $p=0,30$ ). Por otro lado, los tratamientos a 60°C (T5-T8) mostraron menor actividad, posiblemente debido a una desnaturalización parcial de las enzimas a temperaturas más altas o un desequilibrio entre su estabilidad y actividad catalítica. Es consistente con los estudios de Babalola et al.

(2023) y Mahatara y Maskey (2023), quienes observaron que las proteasas de *Carica papaya* muestran mayor actividad en un rango de 56°C y 60°C.

La relevancia estadística del tratamiento T2 fue el único que mostró una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de caseína tras 60 minutos ( $P < 0,05$ ), lo que lo posiciona como el entorno óptimo para la actividad enzimática bajo las condiciones evaluadas (50°C, pH 6,5 y 2 mg/ml). Otros tratamientos, como T3, T4 y T6, muestran tendencias prometedoras ( $P < 0,10$ ) que justifican su exploración en investigaciones futuras con un rango más amplio de condiciones experimentales.

En la figura 1. la evaluación de los efectos principales de la temperatura, el pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática (AE) del látex de *Carica papaya L.* en la hidrólisis de caseína nos permitió identificar las condiciones óptimas para maximizar la eficiencia de las enzimas proteolíticas.

La influencia de la temperatura y los niveles evaluados (50°C y 60°C) no mostraron diferencias significativas, estos resultados indican que las enzimas de látex de papaya son estables a temperaturas estudiadas, aunque los resultados indican una ligera ventaja a los 50°C a diferencia de 60°C en la actividad enzimática promedio, la media de actividad enzimática es de aproximadamente 0,125 mg/ml, mientras que a 60°C baja ligeramente por debajo de ese valor; temperaturas más altas, como los 60°C, pueden inducir desnaturalización parcial o pérdida de actividad estructural enzimática, afectando negativamente su funcionalidad. Esto está alineado con estudios previos como los de Mahatara y Maskey (2023) y Babalola et al. (2023), quienes encontraron que las proteasas de papaya presentan una actividad óptima cercana a 60°C y 56°C. Es importante señalar que estudios previos, como el de Vite y Pérez (2021), también encontraron variaciones en la actividad enzimática para proteasas de látex de papaya a diferentes temperaturas. Estudios como los de Hulikere et al. (2014) encontró temperatura óptima a 40 °C.

En la figura 1. el pH, los resultados mostraron que no hubo variaciones significativas en la actividad enzimática (AE) entre los tratamientos con pH 6,5 y 7,0; esto indica que la enzima mantiene su actividad en un rango cercano a la neutralidad, lo que coincide con los hallazgos de Vite y Pérez (2021) y El-Zalaki (2021), quienes determinan que el pH óptimo para la actividad de la papaína es 7,0 y 7,5 respectivamente. El incremento sustancial de la actividad enzimática al pH 7,0 concuerda con otros estudios que indican que la papaína, una de las

enzimas principales del látex de *Carica papaya* L., tiene una actividad óptima en pH neutro o ligeramente alcalino. Vite y Pérez (2021) y El-Zalaki (2021) también reportaron que la actividad enzimática es mayor en un pH cercano a la neutralidad se observa un incremento significativo, en la actividad enzimática cuando se aumenta de un pH de 6,5 a 7,0; la media ajustada sube de 0,114 mg/ml a más de 0,135 mg/ml, lo que indica que el pH 7,0 favorece claramente la acción enzimática. Las variaciones en el pH afectan directamente la ionización de los residuos catalíticos y, por ende, la interacción enzima-sustrato. Este parámetro se posiciona como un factor crítico para garantizar la eficacia del sistema enzimático. Estudios como los de Hulikere et al. (2014) y Rivera et al. (2023) sugieren que las condiciones son óptimas ligeramente ácidas a neutras 6,0 a 7,0. Este efecto es el más pronunciado entre los tres tratamientos estudiados.

El efecto de la concentración de sustrato (caseína) se observa un aumento en la actividad enzimática cuando la concentración de caseína aumenta de 1 a 2 mg/ml. La pendiente positiva sugiere que hay una relación directa entre la concentración del sustrato y la actividad enzimática en el rango estudiado.

El análisis estadístico mediante el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% no mostró diferencias significativas, los tratamientos con caseína a 2 mg/ml (tratamientos 2, 4, 6 y 8) mostraron una mayor actividad enzimática que se traduce en la hidrólisis del sustrato (caseína) en 60 minutos con: 0,152 mg/ml, 0,152 mg/ml 0,101 mg/ml, 0,101 mg/ml respectivamente en comparación con los tratamientos cuando la concentración de sustrato (caseína) es 1 mg/ml (tratamientos 1, 3, 5 y 7), que mostraron actividades de hidrólisis del sustrato (caseína) en 60 minutos de: 0,113 mg/ml, 0,084 mg/ml, 0,090 mg/ml, y 0,101 mg/ml respectivamente. Este hallazgo respalda la hipótesis de que la actividad enzimática aumenta con la concentración de sustrato, respaldando la cinética de Michaelis-Menten, donde la velocidad de reacción aumenta con la concentración de sustrato hasta un punto de saturación.

Se observó que un aumento en la concentración del sustrato favorecía la actividad hasta un punto, corroborando los informes de Hulikere et al. (2014). Este hallazgo es crucial, ya que implica que ajustar la concentración del sustrato puede ser una estrategia efectiva para optimizar procesos en los que se utilice papaína, facilitando su aplicación en la industria alimentaria, en especial en la ablandación de carne, que es una de las aplicaciones más comunes de esta enzima.

La Figura 2 muestra la comparación de la actividad proteolítica del tratamiento T2 (látex de *Carica papaya* L. a 50 °C, pH 6,5 y 2 mg/ml de caseína) frente a una enzima comercial (papaína TICIFY 100 000 U/G) bajo las mismas condiciones experimentales; aunque no se observaron diferencias significativas en la concentración de caseína hidrolizada entre ambos tratamientos según la prueba t ( $\alpha = 0.05$ ), esta comparación aporta información valiosa para evaluar el potencial del látex de papaya como una alternativa a las enzimas comerciales. El látex de papaya (T2) mostró una concentración promedio de caseína hidrolizada de 0,152 mg/ml, superando al control (papaína comercial) con un promedio de 0,068 mg/ml. Este resultado indica que el látex crudo contiene enzimas proteolíticas activas que pueden igualar o incluso superar el desempeño de una enzima comercial cuando se optimizan las condiciones fisicoquímicas. Esta ventaja puede atribuirse a la presencia de un conjunto diverso de proteasas en el látex de papaya, como la papaína, la quimopapaína, caricaína y glicilendopeptidasa.

En el artículo de Rivera et al. (2023), se reporta que la papaína extraída de *Vasconcellea chachapoyensis* mostró una actividad enzimática significativamente superior a la papaína comercial de la marca Merck, específicamente el producto "Empove - Essential Papain 6000 USP-U/mg".

A pesar de los resultados positivos y que no se haya encontrado diferencias significativas, es fundamental señalar las fortalezas y debilidades de la metodología utilizada en este estudio. Entre las fortalezas, se destaca el uso del método de Biuret modificado por Robinson para la cuantificación de proteínas, que permitió una estimación precisa de la actividad proteolítica de las muestras (Fernández y Galván, s.f.). Se ha elegido el método de Biuret, según Fernández y Galván por las ventajas que es muy específico para las proteínas, hay poca interferencia y es un método económico y las debilidades incluyen poca sensibilidad y puede no funcionar para muestras con pocas proteínas.

Es importante reconocer ciertas limitaciones que podrían haber influido en los resultados y que merecen consideración; en primer lugar, el rango de temperaturas utilizadas en el estudio, de 50 °C a 60 °C, se encuentra en un rango cercano a las temperaturas óptimas reportadas por Babalola et al. (2023) y Mahatara y Maskey (2023), lo que señala que estas condiciones fueron adecuadas para evaluar la actividad proteolítica del látex de papaya, sin embargo, es recomendable explorar rangos de temperatura más bajas a 40 °C reportado por Hulikere et al. (2014) y altos, como los 75 °C reportados por El-Zalaki (2021),

que podrían proporcionar información adicional sobre el comportamiento de la enzima bajo condiciones térmicas más extremas. Esto permitiría evaluar el potencial del látex de papaya en aplicaciones industriales que requieren temperaturas elevadas.

Otra debilidad que debe señalarse es la diversidad limitada de las fuentes del látex utilizadas en este estudio. Aunque se trabajó exclusivamente con látex de *Carica papaya* L. de una procedencia geográfica específica, es posible que los resultados varíen significativamente si se utiliza látex proveniente de otras regiones o variedades de papaya Vite y Pérez (2021), por ejemplo, observaron que las condiciones de cultivo y procedencia del látex pueden influir en la actividad enzimática, lo que sugiere que estudios futuros podrían beneficiarse de incluir diversas fuentes geográficas para ampliar la generalización de los resultados. La variabilidad en factores como el clima, el suelo y las prácticas agrícolas podría afectar la composición y concentración de las enzimas en el látex, lo que impactaría en su rendimiento en aplicaciones proteolíticas.

La elección de los niveles de temperatura y pH se sustentó en antecedentes que señalan condiciones óptimas para enzimas del látex de *Carica papaya*. A pesar de no haberse encontrado diferencias significativas en los tratamientos, esta selección permitió observar tendencias consistentes con estudios previos y validar la estabilidad enzimática bajo condiciones cercanas a las óptimas.

## VI. CONCLUSIONES

1. La investigación demostró la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la degradación de la caseína está significativamente influenciada por la variación de los parámetros fisicoquímicos evaluados (temperatura, pH y concentración de sustrato). Los resultados obtenidos demuestran que existen condiciones específicas dentro de estos parámetros que favorecen una mayor eficiencia en la hidrólisis de la caseína, destacando la importancia de optimizar dichos factores para maximizar el rendimiento enzimático que fue el tratamiento 2 temperatura 50°C, pH 6,5 y una concentración de 2mg/ml de caseína.
2. Se concluyó que el tratamiento 2 (50°C, pH 6,5 y concentración de caseína 2 mg/ml) y el tratamiento 4 (50°C, pH 7,0 y la concentración de caseína de 2 mg/ml) son las que presentaron mayor actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de la caseína. Sin embargo, al aplicar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en la investigación.
3. Se comparó la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. con la enzima comercial TIFICY PAPAINE. Aunque ambos mostraron actividad proteolítica efectiva en la hidrólisis de la caseína, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos fuentes enzimáticas. Estos resultados sugieren que el látex de *Carica papaya* tiene un potencial comparable al de las enzimas comerciales para aplicaciones industriales, lo que lo convierte en una alternativa viable y natural.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos de investigación con rango más amplio de valores para cada parámetro de investigación fisicoquímico (como temperatura, pH y concentración de sustrato). Esto no sólo permitiría identificar el punto óptimo de actividad enzimática, sino también determinar los márgenes o límites en los que las enzimas proteolíticas del látex de *Carica papaya* L. mantienen su funcionalidad, lo que es crucial para aplicaciones industriales donde las condiciones pueden variar considerablemente.
2. Emplear otras técnicas analíticas de alta precisión y sensibles para la cuantificación confiable de las proteínas, tanto en su estado nativo como en los productos generados en la hidrólisis enzimática.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, Karina. “Estudios de separación de las proteasas del cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A. DC.) (Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, México, 2009).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2013). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science, New York, NY. pp. 322-327.
- Amri, M., y Mamboya, F. (2012). Papain: A review of its properties and applications. *African Journal of Biotechnology*, 11(22), 14492-14499.
- Arana, P. y Quijano, M. (2012) Extracción, caracterización y comparación de látex obtenido, en secado por aspersión, de tres variedades de papaya (*Carica papaya* L.). Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del litoral. Recuperado en <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31016>
- Babalola, B. A., Akinwande, A. I., Gboyega, A. E., y et al. (2023). Characterization and optimization of papain extracted from *Carica papaya*. *Scientific African*, 19, e01538. Recuperado en <https://bit.ly/3X3lxvt>
- Badillo, J. J., González, E., y González, M. J. (2000). Characterization of the latex of papaya (*Carica papaya* L.) fruits from different varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 137-144.
- Battaner Arias, E. (2013). Compendio de enzimología. Ediciones Universidad de Salamanca. (pp. 51-52)
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2012). *Análisis Bioquímico* (8va ed.). Barcelona, España: Editorial Reverté.
- Bermeo Berrones, J. G. (2020). Evaluación de la actividad de enzimas proteolíticas mediante su aplicación en la industria quesera. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/15501>
- Bolívar, G. (2023). Actividad enzimática. Salvavidas. <https://www.lifeder.com/actividad-enzimatica/>
- Buttle David, Barrett Alan. Chymopapain: Chromatographic purification and immunological characterization. *Biochemical Journal*, Volume 223. Gran Bretaña. 1984. Pág.81.
- Cahueque, Roberto. “Evaluación de dos agentes coagulantes para látex natural, en la fabricación por inmersión de guante tipo doméstico” (Tesis para la

- obtención de Ingeniero Químico, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2008).
- Calvo M. Caseínas. Curso de Química Bioquímica de los alimentos. Universidad de Zaragoza, España 2017. <https://bit.ly/4fsdgbR>
- Campos, G. (2001). *Efectos de la atmósfera iónica en la estabilidad cinética de la quimopapaína* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México.  
<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=4267&docs=UAM4267.PDF>
- Carrera, C. A., Bermeo, J. C., y Ortiz, E. (2020). Enzimas proteolíticas de *Carica papaya*: extracción, caracterización y aplicaciones. *Ciencia & Progreso*, 3(2.1), 162-176.
- Caseína. (sin fecha). Scbt.com. Recuperado el 21 de julio de 2024, de <https://www.scbt.com/es/p/casein-9000-71-9>
- Chaverri, Alejandra. "Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos" (Tesis presentada para optar el grado de Licenciada en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 1986).
- Chávez-Campos, J., Estrada-Reyes, R., y López-Miranda, J. (2011). Papain: A promising tool for biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 9129-9135.
- Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>
- Cornejo Castro, D. A. (2023). Comparación de los métodos de purificación de la papaína, utilizadas en diferentes industrias. Arequipa, 2022. [bit.ly/4cQ9XJB](http://bit.ly/4cQ9XJB)
- Cuchupoma, L. y Orozco, A. (2020) Efecto de la concentración del etanol en el rendimiento de extracción de papaína a partir de gualacongo (*Vasconcellea pubescens*). Lambayeque. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/8957>
- Cutler, R. C., y Chaves, A. C. (1991). Papain: Mechanism of action and applications. *Journal of Molecular Catalysis*, 62(1-3), 207-218.
- Dalling, M.J. (1986) Plant proteolytic enzymes, Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Dubey V., Pande M., Singh B., Jagannadham M. "Papain-like proteases: Applications of their inhibitors". *Afr. J. Biotechnol.* 2007. Pág.6: 1077-1086

- El-Zalaki, E. M. (2021). Preparation and properties of papain precipitated from fresh latex of papaya fruits (*Carica papaya*). *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 18(1), 27-32. <https://bit.ly/3T1fTYn>
- Fernández Reyes, E., y Galván Cejudo, A. (sin año). 27 métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.
- Fernández, J. (2005) Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región. Chile. Universidad de Talca.  
<http://dspace.uta.cl/retrieve/2978/JFernandezD.pdf>
- Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85)
- Gacesa, P., Hubble, J., Tecnología de las Enzimas. Acribia. Zaragoza- España, 1990.
- Harel, A., Bromberg, Y., Falkowski, P. G., & Bhattacharya, D. (2014). Evolutionary history of redox metal-binding domains across the tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201403676.
- Harper, D. G., Raymond, M., y Kelley, W. N. (2012). *Bioquímica Ilustrada* (29ª ed.). Elsevier.
- Harper. *Bioquímica ilustrada*, 32e. (Dakota del Norte). Mhmedical.com. Obtenido el 22 de julio de 2024 de <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3284>
- Hernández-Guzmán, G., y González-Aguilar, G. (2012). Papaína: una enzima versátil con aplicaciones biotecnológicas y alimentarias. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 61(1), 131-146.
- Hernández-Muñoz, M. J., y González-Gómez, R. (2012). Effect of temperature and pH on the activity of papain and bromelain. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 33(4), 621-626.
- Hernández Sampieri, R., Mendoza Torres, C., y Baptista Lucio, MP (2021). *Metodología de la investigación* (7ª ed.) McGraw-Hill.
- Hulikere, M., Radhakrishnan, V., y otros. (2014). Comparative analysis of papain from different varieties of papaya plant latex. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 4(4), 123-127. <https://bit.ly/3T0hIEN>

- Información sobre EC 3.4.22.2 - papaína. (sin fecha). Brenda-enzymes.org.  
Consultado el 22 de julio de 2024 en <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.22.2>
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2024). Enzyme Nomenclature. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>
- Islam, M. y Molinar, E. (2013). Development of a meat tenderizer based on lechosa peel. *RIDTEC* 8(9), 24-29.
- Kaarsholm M., Shack P. Characterization of papaya peptidase A as an enzyme of extreme basicity. Publicación de U.S National Institutes of Health. 2005.
- Kimmel, R. y Smith, G. (1954) Papaína cristalina: I Preparación, especificidad y activación. Utah: Universidad de Utah.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818656698>
- Kono, T., Ueda, K., y Kato, A. (2004). Distribution and characterization of proteases in the latex and fruits of *Carica papaya* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3265-3270.
- Kure, J.L. y Yugcha, A. (2012) Estudio del proceso de secado del látex de papaya (*Carica papaya* L.), deshidratado por aspersion. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del litoral. <https://bit.ly/3W9fAeO>
- Labandera, N. R., y Malarczuk, E. C. (2019). Universidad Nacional de Misiones. ISBN 978-950-766-144-0. Recuperado en Guía de Estudio. Trabajo Práctico ([unam.edu.ar](http://unam.edu.ar))
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2021). *Bioquímica* (7ª ed.). Elsevier.
- Liggieri C., Arribére C., Trejo s., Canals f., Avilés y Priolo N. "Purification and Biochemical Characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L.". *The Protein Journal*. 2004. Pág.23:403-411.
- Luna Molero, H. R. (2017). Inmovilización de papaína a partir de *Carica papaya* "papaya" sobre tierra de diatomeas.  
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16963>
- Mahadevan, S., y Adams, P. (2010). Papaína (EC 3.4.22.2). En BRENDA: Comprehensive Enzyme Information System. Recuperado el 10 de mayo de 2024, de <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.22.2>
- Mahatara, S. C., y Maskey, B. (2023). Optimization of three phase partitioning purification of papain from *Carica papaya* latex by response surface

- methodology. *Tribhuvan University Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 32-41. <https://doi.org/10.3126/tujfst.v2i2.66459>
- Mejía, R. y Vega, C. (2010) Medición de la actividad proteolítica de la enzima papaína natural extraída del látex de papayo (*Carica papaya*) e inmovilizada en el gel de agar. San Salvador: Universidad de El Salvador. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2516>
- Morton, J. F. (1987). Papaya. En *Fruits of warm climates* (pp. 336-340). Miami, FL: J.F. Morton.
- Mukhlisah, A. N., Arief, I. I., y Taufik, E. (2017). Physical, microbial, and chemical qualities of dangke produced by different temperatures and papain concentrations. *Media Peternakan*, 40(1), 63–70. <https://doi.org/10.5398/medpet.2017.40.1.63>
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). W. H. Freeman, New York, NY.
- Palomino S, Mujica F, García Godos P. *Tecnología enzimática. Manual de Laboratorio*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2018.
- Pérez Sánchez, L. E., Bermeo, J. C., y Ortiz, E. (2020). Enzimas proteolíticas: una revisión. *Ciencia y Progreso*, 3(2.2), 177-192.
- Quino Favero, J., Bernal Portilla, N., y Yácono Llanos, JC (2008). Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada. *Ingeniería Industrial*, (26),201-229. *Revista de Ciencias Sociales y Humanidades* (1998). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337428492011>
- Ramírez, J. y Ayala, M. 2014 *Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?* <https://ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2274>
- Rivera-Botonares, R. S., Oliva-Cruz, S. M., y Tineo Flores, D. (2023). Extracción y purificación de la papaína de tres especies nativas del género *Vasconcellea*. *Revista de Investigaciones Altoandinas – Journal of High Andean Research*, 25(2), 109-116. Doi: <https://bit.ly/3yStOsW>
- Robinson, S. L. (1995). A modified biuret assay for the quantitative determination of protein. *Journal of Biochemistry*, 104(3), 453-463.
- Rodríguez (2019) Inmovilización enzimática de papaína en soporte esferular de quitosano y determinación comparativa de su actividad enzimática sobre la caseína. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/10824>

- Rodríguez (2019) Inmovilización enzimática de papaína en soporte esferular de quitosano y determinación comparativa de su actividad enzimática sobre la caseína. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/10824>
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., y Weil, P. (Eds.). (2019). Harper's Illustrated Biochemistry (31st ed.). McGraw-Hill Education.
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Yan, B., y Weil, P. A. (2012). Enzimas. En D. G. Harper, M. Raymond, y W. N. Kelley (Eds.), Bioquímica Ilustrada (29ª ed., Vol. 1, pp. 319-405). Elsevier.
- Rodwell, V., Murray, R., Bioquímica de Harper. 13ª Ed. 2006.
- Saldaña Balmori, Y. (2010). CRUCIBIOQ ENZIMAS: HIDROLASAS. Revista de Educación Bioquímica, 29(1), 19-20-21.
- Sinche Serra, M. V. (2009). Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1661>
- Stepek, G., J.M. Behnke, D.J. Buttle y I.R. Duce (2004) "Natural plant cysteine proteinases asanthelmintics" Trends Parasit., 20 (7): 322-327
- Timberlake, K. (2013). Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida. México: Pearson Educación.
- Todas las enzimas - Base de datos de enzimas BRENDA. (sin fecha). Brenda-enzymes.org. Consultado el 22 de julio de 2024 en [https://www.brenda-enzymes.org/all\\_enzymes.php](https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php)
- Vite Codarlupo, A. M., y Pérez Díaz, J. (2021). Determinación de las variables óptimas para la obtención de la papaína cruda a partir del látex de papaya (*Carica papaya* L.). <http://hdl.handle.net/20.500.12952/6255>
- Wayne, D. (2011) Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa Wiley.
- Yanza, E. (2010). Utilización del látex de las hojas, tallos y fruto de la papaya (tipo hawaiana) como coagulante natural en la elaboración de queso fresco. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. [http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/811#:~:text=\(2010\).,Riobamba](http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/811#:~:text=(2010).,Riobamba).
- Yogiraj, V., Goyal, P. K., Chauhan, C. S., Goyal, A., y Vyas, B. (2014). *Carica papaya* Linn: An Overview. International Journal of Herbal Medicine, 2(5), 01-08. <https://www.florajournal.com/archives/2014/vol2issue5/PartA/2-4-12.1.pdf>

## **ANEXOS:**

**Anexo 1.** Esquema de extracción de látex de *Carica papaya* L. “papaya” procedentes del distrito de Palmapampa provincia La Mar departamento de Ayacucho 2023.

*Carica papaya* L. se lavó con alcohol al 70% y se enjuagó con agua destilada



Se realizó incisiones verticales con una profundidad entre 2 y 3 mm. Con materiales no corrosivo (bisturí)

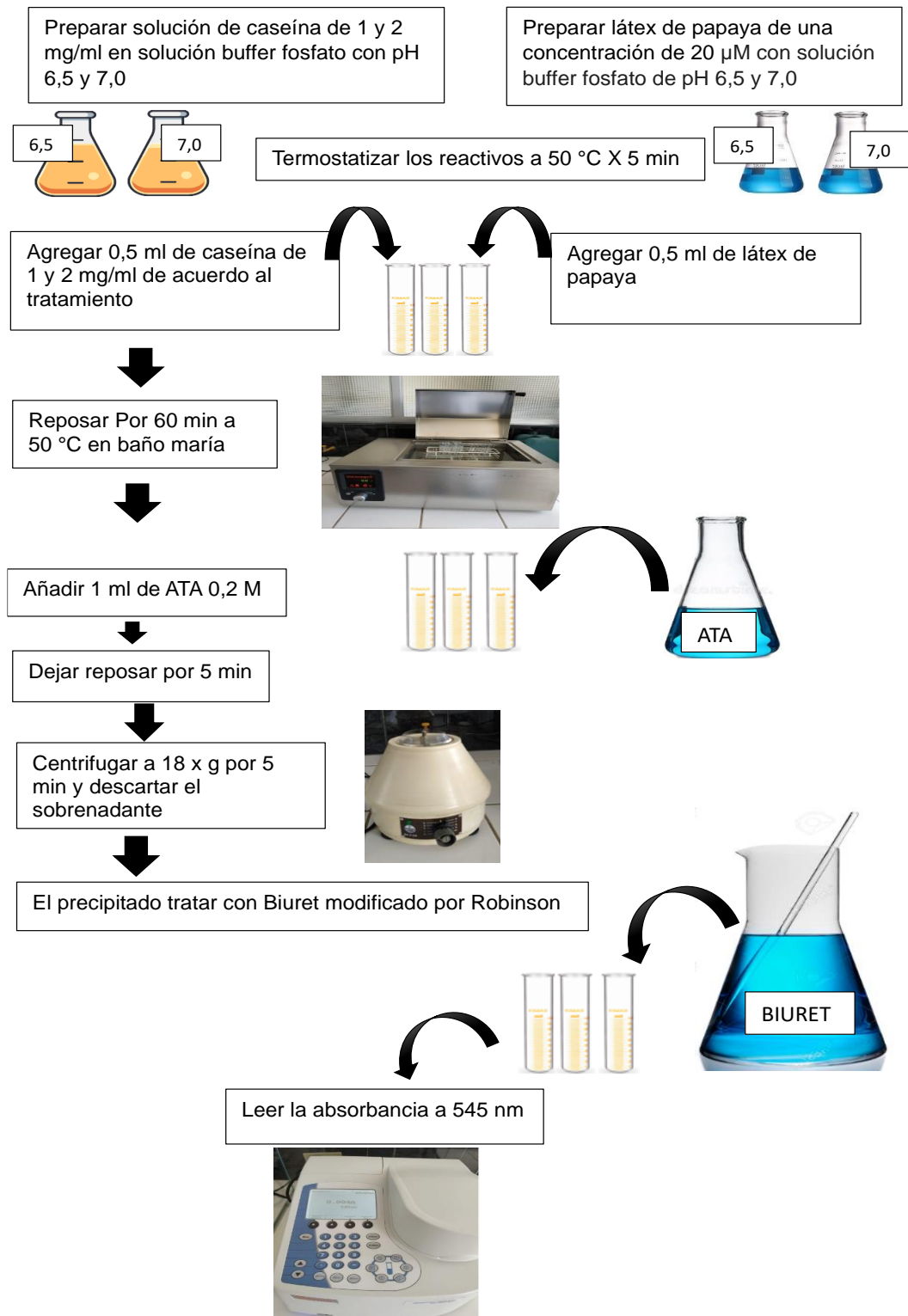


Se pesó la muestra de látex de papaya obtenida y se adicionó 0,4 % de bisulfito de sodio



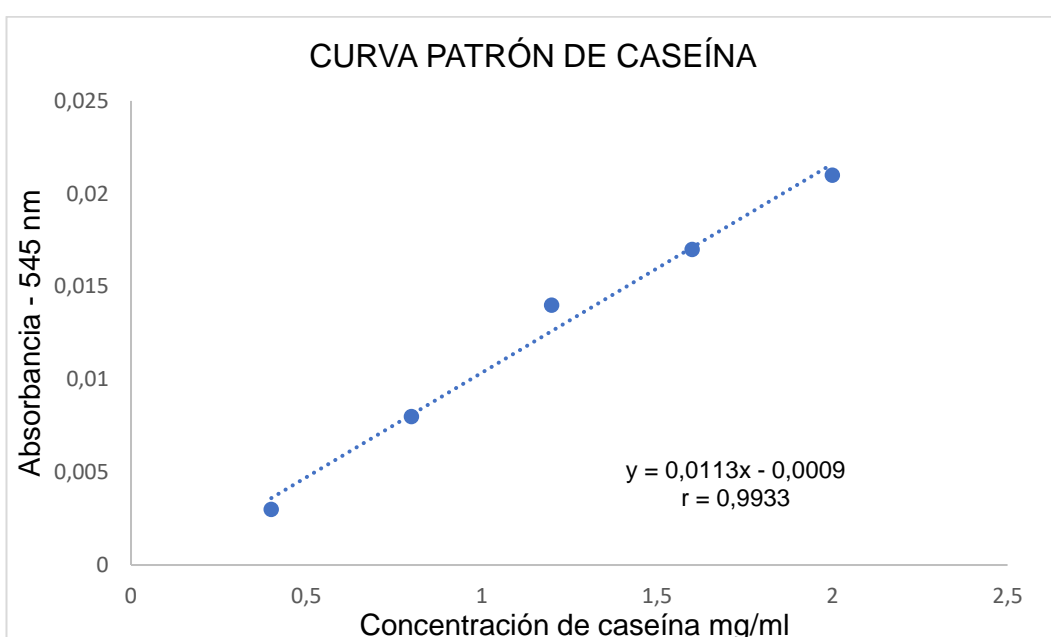
Se conservó a temperatura de 4 °C en un recipiente oscuro totalmente cerrado para evitar la oxidación y preservar.

**Anexo 2.** Flujograma para la determinación de la actividad enzimática de *Carica papaya* L. “papaya” Huamanga, 2024.



**Anexo 3.** Curva de calibración de caseína usando el método de Biuret modificado por Robinson con el espectrofotómetro modelo Thermo- Scientific a una longitud de onda de 545 nm. Ayacucho, 2024.

Concentración de caseína mg/ml	Absorbancia
0,4	0,003
0,8	0,008
1,2	0,014
1,6	0,017
2	0,021



**Anexo 4.** Análisis de varianza (ANOVA) para los efectos principales y combinaciones de temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
T °C	1	0,000012	0,000012	0,00	0,959
pH	1	0,002675	0,002675	0,62	0,442
Concentración	1	0,000107	0,000107	0,02	0,877
T °C*pH	1	0,007431	0,007431	1,71	0,207
T °C*Concentración	1	0,014564	0,014564	3,36	0,083
pH*Concentración	1	0,002675	0,002675	0,62	0,442
T °C*pH*Concentración	1	0,007431	0,007431	1,71	0,207
Error	18	0,077992	0,004333		
Total	25	0,109745			

**Anexo 5.** Tratamientos y agrupación de medias de actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. por Tukey, según; temperatura, pH y concentración de caseína Ayacucho, 2024.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
T °C*pH*Concentración de caseína	N	Media	Agrupación
50 6,5 2	4	0,152	A
50 7,0 2	4	0,152	A
50 6,5 1	3	0,113	A
60 6,5 2	4	0,101	A
60 7,0 1	2	0,101	A
60 7,0 2	2	0,101	A
60 6,5 1	3	0,090	A
50 7,0 1	4	0,084	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes*

**Anexo 6.** Desviación estándar de la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en diferentes tratamientos. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Tratamientos	Promedio mg/ml
T2	0,15202±0,0338
T4	0,15202±0,0647
T1	0,11261±0,0780
T6	0,10135±0,0390
T7	0,10135±0,0478
T8	0,10135±0,0478
T5	0,09009±0,0390
T3	0,08445±0,0338

**Anexo 7.** Agrupación de medias de temperatura utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

T °C	N	Media	Agrupación
50	15	0,125282	A
60	11	0,123874	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 8.** Agrupación de medias de pH utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

pH	N	Media	Agrupación
7,0	12	0,135135	A
6,5	14	0,114020	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 9.** Agrupación de medias de concentración de caseína utilizando el método de comparaciones Múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

**Concentración N Media Agrupación**

2	14	0,126689	A
1	12	0,122466	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 10.** Tratamiento 1, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

1,25 3 0,300 >0.05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	3	0,464	0,103	0,06
60	mg/ml 60	3	0,351	0,117	0,068

**Anexo 11.** Tratamiento 2, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

3 5 0,030 <0,05 Significativo

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	4	0,571	0,085	0,043
60	mg/ml 60	4	0,419	0,0552	0,028

**Anexo 12.** Tratamiento 3, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

2,61 4 0,059 >0.05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	4	0,284	0,0552	0,028
60	mg/ml 60	4	0,199	0,0338	0,017

**Anexo 13.** Tratamiento 4, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

2,38 4 0,076 >0,05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	4	0,639	0,115	0,058
60	mg/ml 60	4	0,487	0,0552	0,028

**Anexo 14.** Tratamiento 5, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

3 5 0,030 <0,05 Significativo

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	3	0,351	0,0676	0,039
60	mg/ml 60	3	0,261	0,039	0,023

**Anexo 15.** Tratamiento 6, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

0,6 1 0,656 >0,05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	2	0,453	0,143	0,1
60	mg/ml 60	2	0,351	0,191	0,14

**Anexo 16.** Tratamiento 7, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

0,6 1 0,656 >0,05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	2	0,453	0,143	0,1
60	mg/ml 60	2	0,351	0,191	0,14

**Anexo 17.** Tratamiento 8, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

0,33 1 0,800 >0,05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	2	0,588	0,334	0,24
60	mg/ml 60	2	0,486	0,287	0,2

**Anexo 18.** Tratamiento 9 comparación de enzima comercial, evaluación del efecto de la concentración de caseína en la actividad enzimática del látex de *Carica papaya* L. del tratamiento 02 vs la enzima comercial en la hidrólisis de caseína. Huamanga-Ayacucho, 2024.

Prueba

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Valor T GL Valor p

0,38 3 0,731 >0,05 n.s.

	Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
0	mg/ml 0	3	0,487	0,0676	0,039
60	mg/ml 60	3	0,464	0,078	0,045

**Anexo 19.** Preparación de buffer fosfato  
SOLUCIONES STOCK

Solución A: Solución monobásica de fosfato de sodio 0,2 mol/l (27.8 g en 1000 mL)

Solución B: Solución dibásica de fosfato de sodio 0,2 mol/l (53,65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o sino 71,7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000 mL))

Para obtener el pH deseado, mezclar volumen de solución A + volúmenes de solución B y diluir con agua hasta 200 ml.

<b>Sol A</b>	<b>Sol B</b>	<b>pH</b>	<b>Sol A</b>	<b>Sol B</b>	<b>pH</b>
93,5	6,5	5,7	45,0	55,0	6,9
92,0	8,0	5,8	39,0	61,0	7,0
90,0	10,0	5,9	33,0	33,0	7,1
87,7	12,3	6,0	28,0	28,0	7,2
85,0	15,0	6,1	23,0	23,0	7,3
81,5	18,5	6,2	19,0	19,0	7,4
77,5	22,5	6,3	16,0	16,0	7,5
73,5	26,5	6,4	13,0	13,0	7,6
68,5	31,5	6,5	10,5	10,5	7,7
62,5	37,5	6,6	8,5	8,5	7,8
56,5	43,5	6,7	7,0	7,0	7,9
51,0	49,0	6,8	5,3	5,3	8,0

**Anexo 20.** Técnica de Biuret Modificada por Robinson: para determinar proteínas

Reactivos:

Sulfato de Cobre Pentahidratado ( $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1,5 g

Tartrato de Sodio y Potasio 6,0 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y añadir 300 ml de NaOH al 10%

Mezclar y agregar 1 g de Yoduro de Potasio y enrazar hasta 1000 ml.

Procedimiento:

1. Tomar 0,5 ml de la muestra en un tubo de prueba de 13 x 100 mm y añadir 2 ml del reactivo de Biuret modificado.
2. Usar 0,5 ml agua destilada, como blanco.
3. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm

**Anexo 21.** Preparación de reactivos en laboratorio de Biotecnología de la UNSCH 2023.



**Anexo 22.** Frutos de *Carica papaya* L. "papaya" procedentes del distrito de Palmapampa provincia La Mar departamento de Ayacucho.



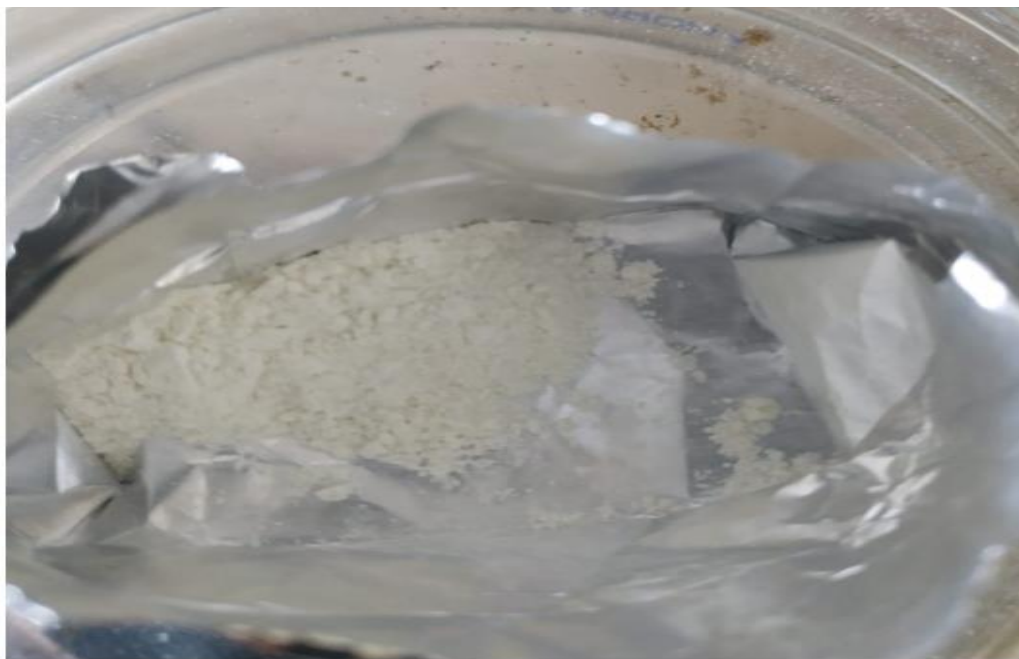
**Anexo 23.** Extracción de látex de papaya desinfectadas con cortes longitudinales.



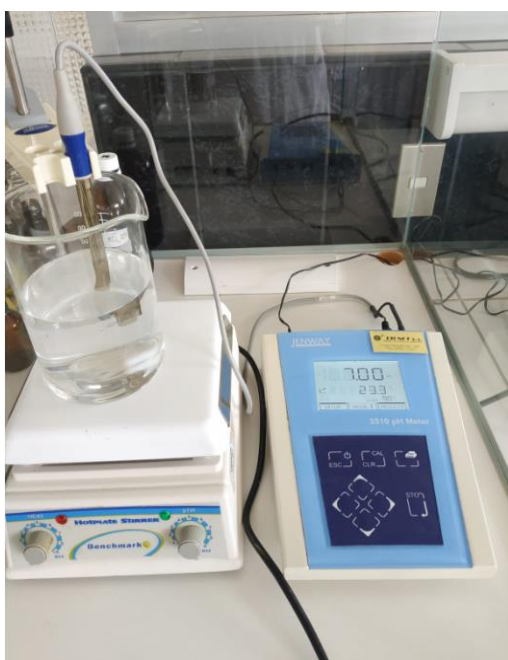
**Anexo 24.** Derecha peso de látex en balanza electrónica, izquierda procedimiento a pulverizar los gránulos de látex de papaya en un mortero hasta obtener un polvo fino.



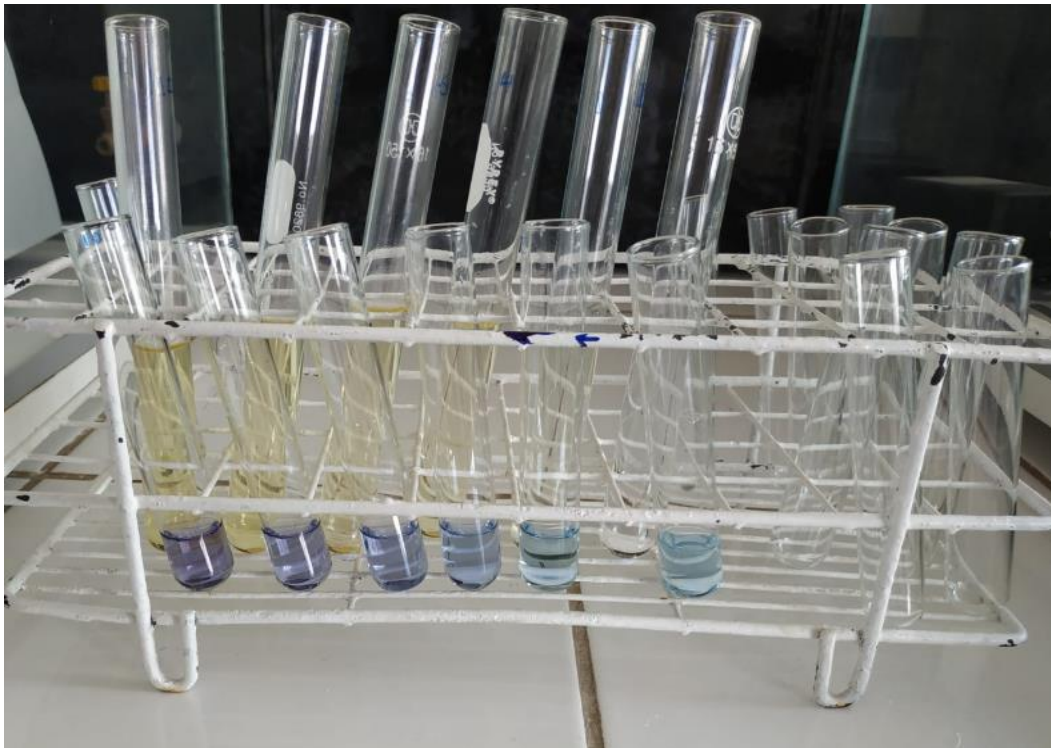
**Anexo 25.** Látex de *Carica papaya* L, deshidratada y molida.



**Anexo 26.** Izquierda de preparación de solución buffer a pH 6,5 y 7,0 con pH metro y derecha equipo de baño de maría.



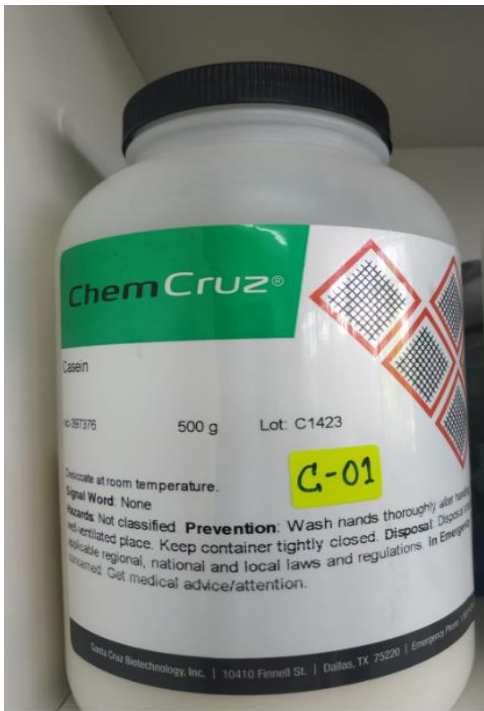
**Anexo 27.** Curva patrón de caseína usando el método Biuret modificado por Robinson, a 545 nm.



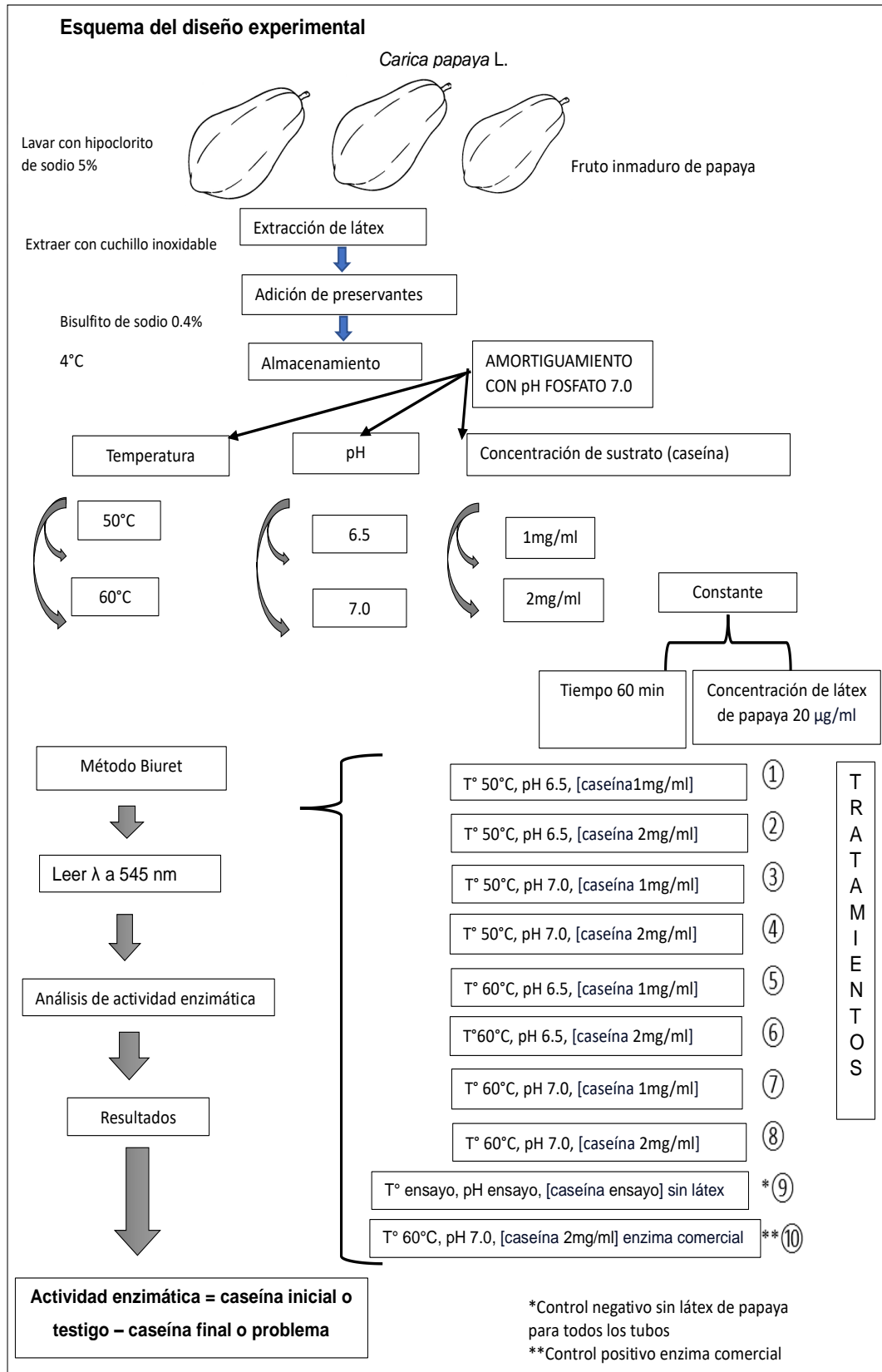
**Anexo 28.** Izquierda foto de centrifuga. Derecha foto de espectrofotómetro modelo Thermo Scientific.



**Anexo 29.** Izquierda foto de caseína, derecha foto de papaín enzyme TICIFY, enzima comercial importado de china.



**Anexo 30. Esquema del diseño experimental**



**Anexo 31.** Instrumento de recolección de datos

---

Tratamiento	Repetición	Leer $\lambda$ a 545 nm	Concentración caseína inicial	Concentración caseína inicial	Actividad enzimática AE
T1	1				
	2				
	3				
T2	1				
	2				
	3				
T3	1				
	2				
	3				
T4	1				
	2				
	3				
T5	1				
	2				
	3				
T6	1				
	2				
	3				
T7	1				
	2				
	3				
T8	1				
	2				
	3				

---

**Anexo 32.** Matriz de consistencia

**Título:** Actividad enzimática y optimización de parámetros físico-químicos de látex de *Carica papaya* L “papaya”

Autor: Bach. Juan HUAMANI MALDONADO

Asesora: Mg Sonia H. PALOMINO FELICES

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p><b>Problema general</b></p> <p>¿Cuáles son los parámetros físico-químicos que afectan la actividad enzimática del látex de papaya en la hidrólisis de caseína?</p> <p><b>Problemas específicos:</b></p> <p>1. ¿Cuál será el efecto optimo de las combinaciones de los niveles de temperatura, pH y concentración de sustrato en la optimización de hidrolisis de la caseína?</p> <p>2. ¿Cuál será la actividad de las enzimas proteolíticas de látex de <i>Carica papaya</i> L. en comparación con enzimas comerciales?</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar la actividad enzimática de látex de <i>Carica papaya</i> L. “papaya” en la degradación de la caseína mediante la variación de los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y concentración de sustrato.</li> </ul> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p>1. Evaluar el efecto de las combinaciones de los niveles de temperatura, pH y concentración de sustrato para la optimización de la hidrolisis de la caseína.</p> <p>2. Comparar la actividad de las enzimas proteolíticas de látex de <i>Carica papaya</i> L. con enzimas comerciales.</p>	<p><b>Hipótesis general:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La actividad enzimática del látex de papaya para la degradación de caseína se ve afectada por los parámetros físico-químicos, como el pH, la temperatura y la concentración de caseína.</li> </ul> <p><b>Hipótesis específico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La actividad enzimática del látex de papaya será mayor a temperatura de 60 °C que a 50 °C.</li> <li>• La actividad enzimática del látex de papaya será mayor a pH de 7.0 que a 6.5 °C.</li> <li>• La actividad enzimática del látex de papaya será mayor a concentración de 2 mg/ml que a 1 mg/ml.</li> </ul>	<p><b>Variable independiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH.</li> <li>• Temperatura.</li> <li>• Concentración de caseína 100% químicamente pura.</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad enzimática</li> </ul> <p><b>Constante:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración de látex de papaya (20 µL/mg).</li> <li>• Tiempo de 60 min.</li> </ul> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrólisis de caseína en mg/ml.</li> <li>• Velocidad de hidrólisis de caseína mg/ml* h<sup>-1</sup></li> </ul>	<p><b>Tipo:</b></p> <p>Básica- Experimental</p> <p><b>Diseño:</b> Experimental</p> <p><b>Técnica de medición:</b> Observación - experimentación</p> <p><b>Enfoque:</b> Cuantitativo</p> <p><b>Análisis:</b> EL análisis estadístico se realizará con el software R.</p> <p>Los datos obtenidos se analizarán con un ANOVA de tres vías (temperatura, pH, y concentración de sustrato) con un nivel de significación igual a 0.05 la comparación de medias se realizará mediante la prueba de Tukey con nivel de significación igual a 0.05.</p>

**UNSCH**FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS  
Bach. Juan HUAMANI MALDONADO  
RESOLUCIÓN DECANAL N° 129-2025-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cinco de la tarde del día jueves ocho de mayo del año dos mil veinticinco; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, la Dra. Roberta Brita Anaya González (Miembro – Jurado), el Dr. Aurelio Carrasco Venegas (Miembro – Jurado), el Mg. Reynán Cóndor Alarcón (Miembro – Jurado) y la Mg. Sonia Haydeé Palomino Felices (Miembro – Asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel Moscoso García; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Actividad enzimática y optimización de parámetros físico-químicos de látex de *Carica papaya* L. “papaya”**, presentado por el Bach. Juan HUAMANI MALDONADO; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los miembros del jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dra. Roberta Brita Anaya González	15	15	15
Dr. Aurelio Carrasco Venegas	16	16	16
Mg. Reynán Cóndor Alarcón	17	17	17
PROMEDIO			16

El sustentante alcanzó el promedio de 16 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público asistente al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las siete de la noche con veinte minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista  
Presidente

Dra. Roberta Brita Anaya González  
Miembro - Jurado

Dr. Aurelio Carrasco Venegas  
Miembro – Jurado

Mg. Reynán Cóndor Alarcón  
Miembro – Jurado

Mg. Sonia Haydeé Palomino Felices  
Miembro – Asesor

Mg. Luis Uriel Moscoso García  
Secretario- Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

N° 025-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Actividad enzimática y optimización de parámetros físico-químicos de látex de *Carica papaya* L. "papaya"**, por JUAN HUAMANI MALDONADO; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 18%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 02 de junio de 2025.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Escuela Profesional de Biología  
Dr. Fidel R. Mujica Lengua  
DIRECTOR

# Actividad enzimática y optimización de parámetros físico-químicos de látex de Carica papaya L. “papaya”

*por* JUAN HUAMANI MALDONADO

---

**Fecha de entrega:** 31-may-2025 10:40a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2689109622

**Nombre del archivo:** 1D-HUAMANI-MALDONADO-Juan-pregrado-2025-Turnitin-doc.pdf.pdf (616.81K)

**Total de palabras:** 10932

**Total de caracteres:** 57348

# Actividad enzimática y optimización de parámetros físico-químicos de látex de Carica papaya L. "papaya"

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.dspace.espol.edu.ec">www.dspace.espol.edu.ec</a> Fuente de Internet	4%
2	<a href="http://repositorio.unac.edu.pe">repositorio.unac.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://vsip.info">vsip.info</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://www.scielo.org.pe">www.scielo.org.pe</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://repositorio.upec.edu.ec">repositorio.upec.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
9	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	1%
10	<a href="http://idoc.pub">idoc.pub</a> Fuente de Internet	1%
11	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%

12	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Fuente de Internet	1 %
13	<a href="http://qdoc.tips">qdoc.tips</a> Fuente de Internet	<1 %
14	Submitted to Universidad Internacional Isabel I de Castilla Trabajo del estudiante	<1 %
15	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD Trabajo del estudiante	<1 %
16	Submitted to ITESM: Instituto Tecnologico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	<1 %
17	<a href="http://www.buenastareas.com">www.buenastareas.com</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="http://bdigital.ula.ve">bdigital.ula.ve</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://patents.google.com">patents.google.com</a> Fuente de Internet	<1 %
20	<a href="http://www.clubensayos.com">www.clubensayos.com</a> Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo