

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

EXTRACCIÓN DE BROMELINA OBTENIDA A PARTIR DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE PIÑA (*Ananas comosus*)

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

KARLA ALEJANDRA VEGA CAÑIZARES

karla.vega@epn.edu.ec

DIRECTOR: ING. EDWIN VERA CALLE, Ph. D.

edwin.vera@epn.edu.ec

Quito, octubre 2017

© Escuela Politécnica Nacional (2017)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Karla Alejandra Vega Cañizares, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Karla Alejandra Vega Cañizares

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Karla Alejandra Vega Cañizares, bajo mi supervisión.

Ing. Edwin Vera Calle Ph.D
DIRECTOR DEL PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es la culminación de una hermosa etapa en mi vida y el inicio de una nueva aventura. No hubiese llegado hasta aquí sin la presencia de Dios y el apoyo incondicional de toda mi familia, sin el hombro amigo de mi hermana, mi madre y mi tía, el apoyo de mis amigos de la Facultad Elvy, Daisy, Iván, Chino y muchas más personas con las que tuve el placer de conocer y convivir durante la carrera universitaria.

Gracias a mis amigos Linda, Edwin, Tato, Nelly y Karen con quienes pasamos muy buenos momentos y me ayudaron de forma incondicional.

Al Ing. Edwin Vera Calle Ph.D, por su paciencia, conocimientos y dedicación para llevar adelante este Proyecto de Investigación.

A la empresa ENVAGRIF y al Ing. Miguel Valencia por darme la materia prima necesaria para la realización del trabajo de titulación

A mi novio, Pablo, gracias por tu cariño, comprensión, por no permitir que me rinda y acompañarme durante más de 5 años de mi vida.

A todas las personas que pusieron un granito de arena para que esta meta se haga realidad.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Carlos Vega, mi padre y mi ángel de la guarda, Maribel Cañizares, mi madre, mi hermana, Erika Vega y Eva Vega, mi tía, quienes con su paciencia, sabios consejos y enseñanzas me han hecho ir siempre por el camino del bien.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		PÁGINA
	RESUMEN	xvi
	INTRODUCCIÓN	xviii
1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1	Procesamiento de piña y uso de residuos	1
1.2	Extracción y purificación de proteínas	6
	1.2.1 Métodos mecánicos y no mecánicos	6
	1.2.2 Métodos de purificación de proteínas	9
1.3	Características y aplicación de enzimas proteolíticas	17
	1.3.1 Obtención de enzimas proteolíticas	19
	1.3.2 Aplicación de enzimas proteolíticas	20
	1.3.3 Métodos para la conservación de enzimas	22
2	PARTE EXPERIMENTAL	27
2.1	Evaluación del porcentaje de proteína y actividad enzimática en residuos de piña	27
2.2	Comparación de diferentes metodologías de extracción de enzimas	32
2.3	Evaluación de la purificación de enzimas	35
2.4	Análisis del efecto de secado sobre la actividad enzimática	37
2.5	Evaluación de la bromelina extraída de diferentes residuos de piña	41
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1	Caracterización de los residuos de piña	43
3.2	Aplicación de diferentes metodologías de extracción de enzimas	46
	3.2.1 Efecto de los pretratamientos en la extracción de bromelina	46
	3.2.2 Cantidad de proteína y actividad enzimática	48
3.3	Purificación de la bromelina	54
	3.3.1 Microfiltración	54
	3.3.2 Precipitación de proteínas con etanol potable	56
3.4	Secado	61
	3.4.1 Atomización	61
	3.4.2 Liofilización	63

3.5	Extracción de bromelina de diferentes fracciones de residuos del procesamiento de piña	66
3.6	Cantidad de proteína experimental y teórica en cada proceso	71
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
4.1	Conclusiones	74
4.2	Recomendaciones	75
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXOS	89

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Porcentaje de cada una de las fracciones de piña variedad cayena lisa o hawaiana	5
Tabla 1.2.	Ventajas y desventajas de los tipos de purificación de proteínas	16
Tabla 2.1.	Soluciones y cantidades empleadas en las mezclas a 30 °C	29
Tabla 2.2.	Procesos de extracción usados y pretratamientos empleados en la extracción de enzimas	33
Tabla 2.3.	Condiciones de operación del proceso de microfiltración	35
Tabla 2.4.	Condiciones de operación del secado por atomización	38
Tabla 3.1.	Caracterización de cáscara, bagazo y corazón de piña	43
Tabla 3.2.	Cantidad de proteína y actividad enzimática de los residuos obtenidos del procesamiento de piña	44
Tabla 3.3.	Rendimiento de jugo obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción	46
Tabla 3.4.	Caracterización de los tratamientos variando el método de prensado y el uso de enzima	48
Tabla 3.5.	Actividad enzimática a 30 °C de jugo obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción	49
Tabla 3.6.	Cantidad de proteína del extracto obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción	51
Tabla 3.7.	Cantidad de proteína de la fibra obtenida del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción	52
Tabla 3.8.	Rendimiento del permeado y retenido del jugo de piña microfiltrado a 25 °C y 4 psi	55

Tabla 3.9.	Cantidad de proteína y actividad enzimática del permeado y retenido del jugo de bagazo de piña microfiltrado a 25 °C y 4 psi	55
Tabla 3.10.	Rendimiento de la precipitación de bromelina a pH 5,3 y pH isoelectrico (8,5) con NaOH 3N a 4 °C durante 7 días	58
Tabla 3.11.	Actividad enzimática de las soluciones de bromelina con agua y agua con etanol	59
Tabla 3.12.	Cantidad de proteína y actividad enzimática de las muestras precipitadas con etanol	59
Tabla 3.13.	Humedad y rendimiento de las muestras secadas por atomización de la solución concentrada de bromelina a 100 y 130 °C con dos diferentes proporciones de encapsulante	61
Tabla 3.14.	Cantidad de proteína y actividad enzimática de las muestras secadas por atomización de la solución concentrada de bromelina a 100 y 130 °C con dos diferentes proporciones de agente encapsulante	62
Tabla 3.15.	Cantidad de proteína, actividad enzimática y rendimiento de la muestra secada por liofilización de la solución concentrada de bromelina a 40 °C con una proporción de encapsulante	64
Tabla 3.16.	Condiciones de operación seleccionadas para la obtención de bromelina	67
Tabla 3.17.	Resumen del porcentaje de proteína y actividad enzimática del bagazo de piña con el mejor tratamiento	67
Tabla 3.18.	Cantidad de proteína y actividad enzimática del corazón de piña con el mejor tratamiento	68
Tabla 3.19.	Cantidad de proteína y actividad enzimática de la cáscara de piña con el mejor tratamiento	68
Tabla 3.20.	Cantidad de proteína experimental y teórica en cada uno de los procedimientos para la obtención de bromelina a partir del bagazo de piña	72
Tabla 3.21.	Cantidad de proteína experimental y teórica en cada uno de los procedimientos para la obtención de bromelina a partir de cáscara de piña	72
Tabla 3.22.	Cantidad de proteína experimental y teórica en cada uno de los procedimientos para la obtención de bromelina a partir del corazón de piña	73

Tabla AI.1.	Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica del bagazo de piña	105
Tabla AI.2.	Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica del corazón de piña	106
Tabla AI.3.	Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica de la cáscara de piña	106
Tabla AIII.1.	Cantidad de encapsulante y solución concentrada usada para realizar las emulsiones	109
Tabla AIV.1.	Variación de la absorbancia y actividad enzimática total de las muestras de bromelina seca con agua y agua: etanol	111

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Principales países importadores de piña en el año 2015	1
Figura 1.2.	Principales países exportadores de piña en el año 2015	2
Figura 1.3.	Producción de piña en el Ecuador por provincias entre el año 2008 y 2010	3
Figura 1.4.	Principales productos mundialmente producidos a partir del procesamiento de piña	4
Figura 1.5.	Hidrólisis de materiales lignocelulósicos mediante el uso de cocteles enzimáticos	9
Figura 1.6.	Ilustración de la extracción de proteínas mediante el sistema acuoso de dos fases	14
Figura 1.7.	Estructura de extracción por micelas inversas	15
Figura 1.8.	Sitio de acción para la hidrólisis de las endoproteasas	17
Figura 1.9.	Sitio de acción para la hidrólisis de las exopeptidasas	18
Figura 1.10.	Esquema del atomizador (spray dryer)	24
Figura 1.11.	Esquema del liofilizador	26
Figura 2.1.	Proceso de obtención de residuos a partir del procesamiento de piña	27
Figura 2.2.	Proceso de obtención de los jugos de cada tipo de fracción de piña	28
Figura 2.3.	Proceso de obtención de los extractos de cada tipo de proceso de extracción y pretratamiento enzimático	34
Figura 2.4.	Proceso de obtención de las soluciones concentradas de bromelina mediante precipitación	35
Figura 2.5.	Condiciones de las muestras secadas por atomización	39
Figura 2.6.	Condiciones de las muestras secadas por liofilización	40
Figura 3.1.	Gráfico de medias para la actividad enzimática a 30 °C de cada uno de los residuos del procesamiento de piña	45
Figura 3.2.	Gráfico de medias para el porcentaje de proteína por el método Kjeldahl de cada uno de los residuos del procesamiento de piña	45

Figura 3.3.	Gráfico de medias para determinar el efecto del tipo de extracción sobre la actividad enzimática	50
Figura 3.4.	Gráfico de medias para determinar el efecto del uso o no de un coctel enzimático sobre la actividad enzimática	51
Figura 3.5.	Gráfico de medias determinar el efecto del tipo de extracción sobre el porcentaje de proteína	53
Figura 3.6.	Gráfico de medias para determinar el efecto del uso o no de un coctel enzimático sobre el porcentaje de proteína	53
Figura 3.7	Precipitación del permeado del bagazo de piña a pH 5,3 (A) y pH 8,5 (B)	57
Figura 3.8	Análisis ANOVA de la actividad enzimática a pH 5,3 y 8,5 para el precipitado de piña	60
Figura 3.9	Análisis ANOVA de la actividad enzimática en función del tipo de secado para el bagazo de piña	65
Figura 3.10	Análisis ANOVA del porcentaje de proteína en función del tipo de secado para el bagazo de piña	66
Figura 3.11	Análisis ANOVA de la actividad enzimática de las muestras secas en función de la fracción de piña	70
Figura 3.12	Análisis ANOVA del porcentaje de proteína de las muestras secas en función de la fracción de piña	71
Figura AI.1.	Gráfico absorbancia vs tiempo para el bagazo de piña	90
Figura AI.2.	Gráfico absorbancia vs tiempo para el corazón de piña	91
Figura AI.3.	Gráfico absorbancia vs tiempo para la cáscara de piña	91
Figura AI.4	Gráfico absorbancia vs tiempo para prensa con enzima del bagazo de piña	92
Figura AI.5	Gráfico absorbancia vs tiempo para prensa sin enzima del bagazo de piña	92
Figura AI.6	Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal con enzima del bagazo de piña	93
Figura AI.7	Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima del bagazo de piña	93
Figura AI.8	Gráfico absorbancia vs tiempo para baño ultrasónico con enzima del bagazo de piña	94

Figura AI.9	Gráfico absorbancia vs tiempo para baño ultrasónico sin enzima del bagazo de piña	94
Figura AI.10	Gráfico absorbancia vs tiempo para punta ultrasónico con enzima del bagazo de piña	95
Figura AI.11	Gráfico absorbancia vs tiempo para baño ultrasónico punta sin enzima del bagazo de piña	95
Figura AI.12	Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima del corazón de piña	96
Figura AI.13	Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima de la cáscara de piña	96
Figura AI.14	Gráfico absorbancia vs tiempo para la microfiltración del bagazo de piña	97
Figura AI.15	Gráfico absorbancia vs tiempo para la microfiltración del corazón de piña	97
Figura AI.16	Gráfico absorbancia vs tiempo para la microfiltración de la cáscara de piña	98
Figura AI.17	Gráfico absorbancia vs tiempo para la precipitación del bagazo de piña con etanol a pH 5,3	98
Figura AI.18	Gráfico absorbancia vs tiempo para la precipitación del bagazo de piña con etanol a pH isoelectrico (8,5)	99
Figura AI.19	Gráfico absorbancia vs tiempo para la precipitación del corazón de piña con etanol a pH isoelectrico (8,5)	99
Figura AI.20	Gráfico absorbancia vs tiempo para la precipitación de la cáscara de piña con etanol a pH isoelectrico (8,5)	100
Figura AI.21	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 100 °C y proporción MD: GA 70:30	100
Figura AI.22	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 70:30	101
Figura AI.23	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 30:70	101
Figura AI.24	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de corazón a 130 °C y proporción MD: GA 70:30	102

Figura AI.25	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de la cáscara 130 °C y proporción MD: GA 70:30	102
Figura AI.26	Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por liofilización de la solución concentrada de bromelina del bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 70:30	103
Figura AIV.1	Gráfico Absorbancia vs Tiempo para la solución de bromelina seca y agua	110
Figura AIV.2	Gráfico Absorbancia vs Tiempo para la solución de bromelina seca y agua: etanol	110

ÌNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I Gráficas Absorbancia vs Tiempo (horas), para determinar la variación de absorbancia / tiempo y cálculo de la actividad enzimática total y actividad enzimática específica en cada una de las etapas de la extracción de bromelina.	90
ANEXO II Ecuaciones para obtener el porcentaje de recuperación de actividad enzimática, porcentaje de recuperación de proteína, rendimiento del secado y del extracto.	107
ANEXO III Preparación de las emulsiones usadas para el secado por atomización y liofilización	109
ANEXO IV Ensayo de la actividad enzimática de las soluciones de bromelina con agua y etanol: agua	110
ANEXO V Proceso teórico de secado por atomización del bagazo, corazón y cáscara de piña a 130 °C, proporción MD: GA 70:30	112

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue extraer bromelina a partir de cáscaras, bagazo y corazones de piña obtenidos a partir del procesamiento de piña en la empresa ENVAGRIF y determinar la fracción de residuos que presentó mayor cantidad de proteína y actividad enzimática.

Se extrajo jugo de cada una de las fracciones y se determinó cuál presentaba el mayor valor. La fracción con mayor cantidad de proteína y actividad enzimática fue el bagazo. Para comparar las diferentes metodologías de extracción, se realizó un diseño experimental 2x3 donde las variables fueron: el uso o no de un pretratamiento de un coctel enzimático de celulasas y pectinasas y 3 procesos de extracción (prensa, coloidal, equipo de ultrasonido).

El proceso que permitió obtener la mayor actividad enzimática fue usar un molino coloidal sin pretratamiento enzimático, para el cual la actividad enzimática aumentó en 296,8 % respecto a la actividad enzimática medida en el residuo fresco.

Para purificar las enzimas del jugo, la muestra fue filtrada usando una membrana de 0,2 μm en el microfiltrador tangencial a 25 °C, 4 bar de presión y flujo de alimentación de 5 mL/min, el retenido fue desechado y el permeado obtenido fue precipitado con etanol en proporción másica 1:2 a dos valores diferentes de pH: 5,3 y 8,5 adicionando NaOH 1N. Se dejaron ambas muestras en reposo durante 7 días a 4 °C, pasado este tiempo el sobrenadante se eliminó y la solución concentrada (el líquido que queda luego de eliminar la mayor parte del sobrenadante) fue almacenado. Se calculó el porcentaje de proteína y actividad enzimática. El tratamiento elegido fue la precipitación a pH isoelectrico (8,5).

Para secar la muestra se eligieron dos métodos de secado, atomización y liofilización. Ambos secados se realizaron con el uso de agentes encapsulantes que fueron maltodextrina (MD): goma arábica (GA) en una solución al 25 % de sólidos. Para el secado por atomización se utilizaron dos proporciones de encapsulantes y dos temperaturas de secado: 70:30 w:w a 100 °C y 130 °C y 30: 70 w:w a 130 °C.,

mientras que para el secado por liofilización se utilizó solamente la proporción 70:30 w:w. La proporción entre el precipitado y el agente encapsulante fue 1:1 w:w.

Se eligió como el mejor tratamiento de secado la atomización a 130 °C, con proporción del agente encapsulante MD: GA 70:30 w:w.

Se replicaron los mejores tratamientos en cada uno de los procesos de extracción, purificación y secado para el corazón y cáscara de la piña y se realizó un análisis comparativo entre las 3 muestras secas obtenidas a partir de cada fracción de piña.

La fracción que presentó el mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática fue el bagazo (0,70 % y 194,38 $\mu\text{mol/ min mL}$), seguido de la cáscara (0,60 % y 183,90 $\mu\text{mol/ min mL}$), y el corazón (0,60 % y 169,91 $\mu\text{mol/ min mL}$).

En cada uno de los procesos de extracción el porcentaje de proteína y actividad enzimática de los residuos del procesamiento de piña se evaluaron mediante el método Kjeldahl y el método Anson modificado, respectivamente. Además se determinó si existió o no diferencia significativa mediante un análisis de varianza en el programa Statgraphics Centurion.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el manejo de los residuos sólidos representa un problema debido, entre otras cosas, a los altos volúmenes generados por las personas e industrias. Cuando el manejo no es el adecuado, pueden afectar a la salud de los ciudadanos y al medio ambiente. Aproximadamente el 70 % de los residuos generados son de origen orgánico, encontrándose en este grupo los productos hortofrutícolas (Sáenz, Urdaneta y Joheni, 2014, p. 128).

Los residuos del procesamiento de productos hortofrutícolas son usados para la elaboración de abonos y humus, sin embargo, en su composición química presentan varios compuestos de interés como proteínas, vitaminas, carotenoides, entre otros, que no son aprovechados a pesar de tener un alto valor económico (Ramírez y Pacheco, 2011, p. 71).

Así como a nivel mundial, en el Ecuador existe una amplia variedad de productos hortofrutícolas que generan residuos a partir de su procesamiento. Una de las principales frutas procesadas es la piña, a partir de la que se genera de un 45 % a 50 % de residuos (Ketnawa, Chaiwut y Rawdkuen, 2012, p. 386). Estos presentan enzimas con actividad proteolítica y no proteolítica, destacando en el primer grupo la bromelina, definida como una glicoproteína perteneciente al grupo de las cisteín proteasas. (Upadhyay, Lama y Tawata 2010, p. 3). La bromelina se utiliza en la elaboración de productos en las industrias alimentaria, de cosméticos y farmacéutica (Li, Yang, Yang, Shu y Wong, 2012, p. 5). Por las amplias aplicaciones que tiene la bromelina en la industria se ha generado gran interés en su extracción, purificación y estabilización (Corzo, Walisewski y Welti-Chanes, 2012, p. 632).

Esta investigación buscó aprovechar y reducir los residuos sólidos generados por empresas dedicadas al procesamiento de piña mediante la obtención de bromelina.

Los objetivos específicos fueron: evaluación del porcentaje de proteína y actividad enzimática de cada una de las fracciones de residuos del procesamiento de piña (cáscara, corazón y bagazo), comparación de diferentes metodologías de

extracción de enzimas, purificación mediante el uso de tecnología de membranas y precipitación, análisis del efecto del secado sobre la actividad enzimática de la bromelina y evaluación de la bromelina extraída de los diferentes residuos de piña.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROCESAMIENTO DE PIÑA Y USO DE RESIDUOS

La piña (*Ananas comosus*), es una planta de la familia Bromeliaceae, originaria de América del Sur, concretamente de Brasil. Su fruto está compuesto por una cáscara dura y gruesa con escamas de color marrón con un conjunto de hojas vistosas de color verde en sus extremos (INEN, 2015, p. 1). La pulpa es de color amarillo, olor aromático y sabor dulce.

Según el MAGAP, la producción mundial de piña en el año 2015 se incrementó 3.81 % respecto al año 2013. Sin embargo, a pesar de este comportamiento, el nivel de importaciones decreció en 9,70 % en relación al año 2014, y las exportaciones también decayeron en un 13,7 % con respecto al mismo año (2014, p. 4).

Los principales importadores de piña ecuatoriana son Estados Unidos, Holanda, Japón, Reino Unido y Alemania como se observa en la Figura 1.1.

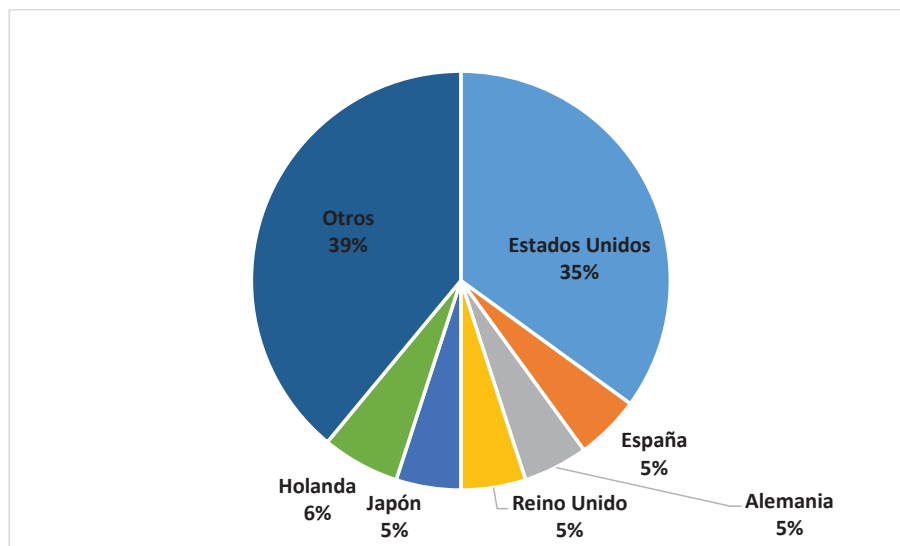


Figura 1.1. Principales países importadores de piña en el año 2015 (Agrocalidad, 2015, p. 5)

Los principales exportadores a nivel mundial son Costa Rica, Filipinas, Holanda, Bélgica, Estados Unidos, México y Ecuador como se observa en la Figura 1.2.

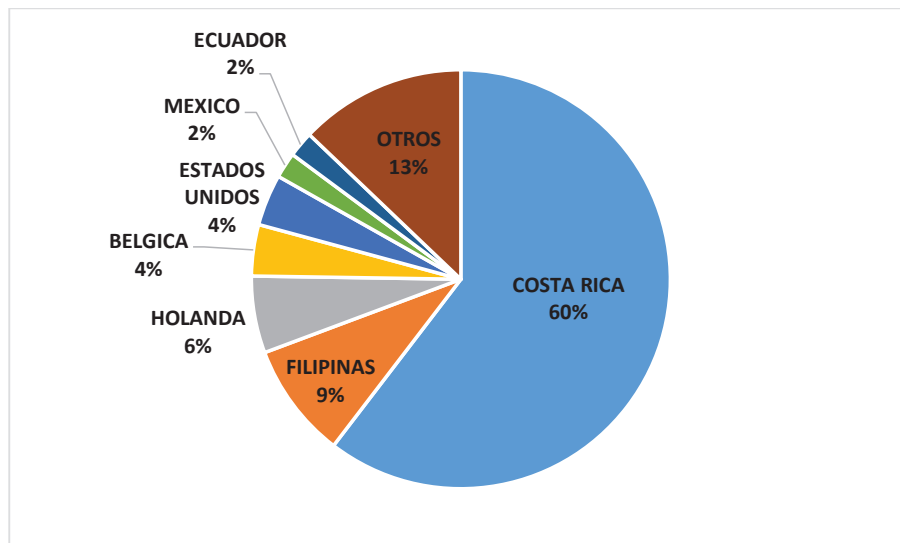


Figura 1.2. Principales países exportadores de piña en el año 2015
(Agrocalidad, 2015, p. 7)

Según el MAGAP, en el Ecuador, la producción de piña en el año 2015 se estimó en 263 521 toneladas, siendo las dos variedades de piña mayormente producidas para ser exportadas e industrializadas:

- a) **Cayena Lisa o Hawaiana:** También conocida como Champaca, utilizada mayormente en la agroindustria debido a que tiene forma cilíndrica, pulpa amarilla y corazón fino (Agrocalidad, 2015, p. 3)
- b) **Golden Sweet o MD2:** Se caracteriza por el color dorado de la cáscara, sabor extra dulce, alto contenido de vitamina C, sabor tropical exótico y bajo nivel de acidez. Es la variedad más exportada en Ecuador. (Agrocalidad, 2015, p. 4).

Las principales zonas de cultivo de piña se encuentran en la Costa en las provincias de Guayas, Los Ríos, Manabí, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas, como se observa en la Figura 1.3. Las tres primeras provincias

indicadas son las que poseen mejores condiciones climáticas para la producción de piña. (MAGAP, 2015, p. 4)

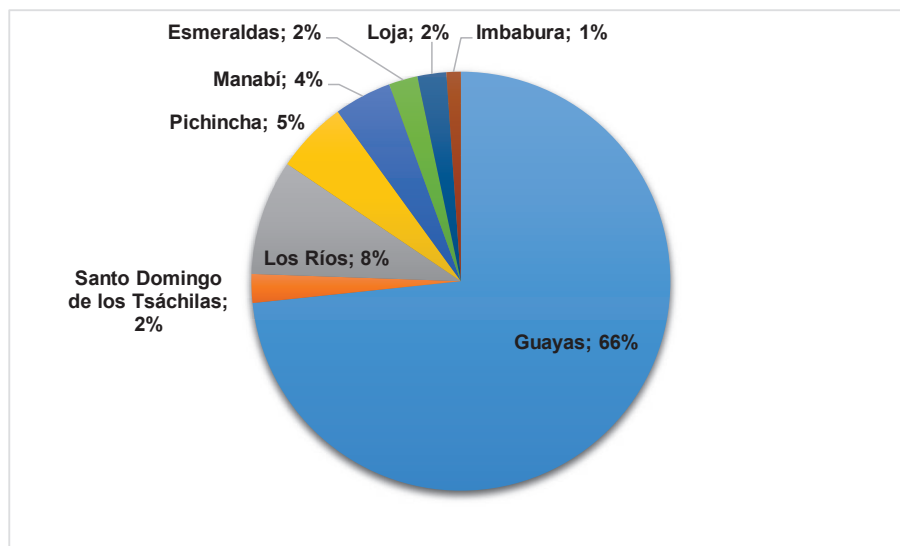


Figura 1.3. Producción de piña en el Ecuador por provincias entre el año 2008 y 2010 (Agrocalidad, 2015, p. 6)

La planta contiene bromelina en su estructura química, definida como una enzima de acción proteolítica capaz de romper proteínas y liberar los aminoácidos que conforman su estructura (Murillo, 2008, pp. 1-3).

- **Procesamiento de piña**

A nivel mundial, la piña se comercializa como fruta fresca y procesada, como se observa en la Figura 1.4. Los productos finales que se pueden obtener son piña envasada, deshidratada, jugo, néctar, pulpa, mermelada, vinagre, entre otros (Ketnawa et al., 2012, p. 386).

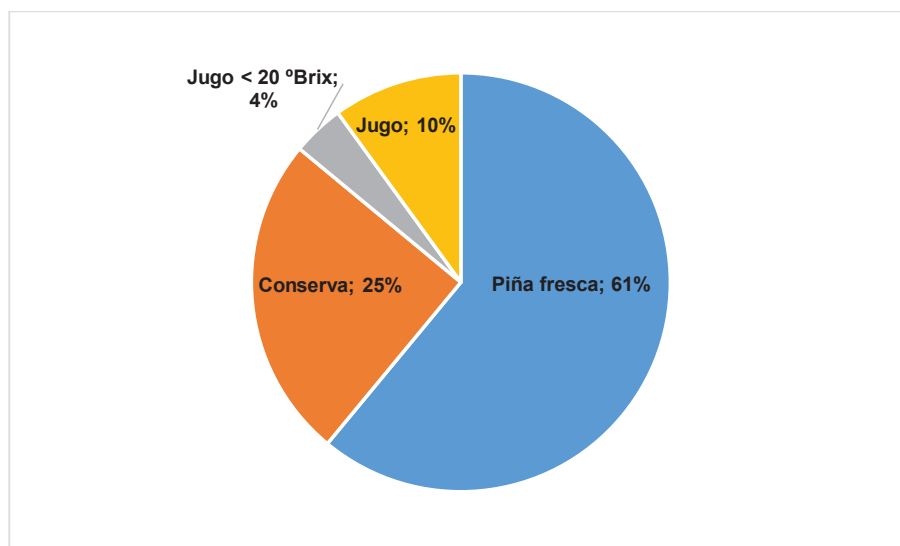


Figura 1.4. Principales productos mundialmente producidos a partir del procesamiento de piña
(Murillo, 2008, p. 4)

- **Uso de residuos**

Según la Norma INEN NTE 2841 (2014) la palabra residuo se define como cualquier material, sustancia o elemento sólido o semisólido, que resulta del consumo o uso de un bien tanto en actividades domésticas, industriales, comerciales, institucionales o de servicios, que no tiene valor para quien lo genera, pero que es susceptible de aprovechamiento y transformación en un nuevo bien con un valor económico agregado (p. 2).

Los residuos orgánicos representan más del 50 % de los desechos generados en las ciudades, muchos de los cuales son destinados a botaderos a cielo abierto, generando serios problemas ambientales como la transmisión de enfermedades bacterianas y parasitarias por agentes patógenos y vectores que se alimentan y se reproducen en los residuos. Por estas razones los residuos deben ser depositados en rellenos sanitarios (Sáenz et al., 2014. p. 130).

Sin embargo, se conoce que estos residuos tienen en su composición química componentes de interés como vitaminas, carbohidratos, proteínas, carotenos, entre otros, los cuales son productos de alto valor económico, incluso superior al

de la materia prima, por lo que es importante conocer el porcentaje generada y la composición de los residuos sólidos.

De los residuos orgánicos generados, apenas el 1,6 % son recuperados para ser utilizados en abono, compostaje e incineración (Sáenz et al., 2014, pp. 130- 135). En la actualidad, se están realizando investigaciones para extraer compuestos intracelulares de interés mediante el uso de cocteles enzimáticos (Puri, Sharma y Barrow, 2012, p. 38).

Con respecto a la piña, el porcentaje de residuos que se genera es de un 45 % a un 55 % y es el segundo cultivo tropical de importancia mundial después del plátano. A partir del procesamiento de piña se obtiene la cáscara, corazón, corona y rastrojo o bagazo (Ketnawa, Chaiwut y Radwkuen, 2010, pp. 395-400). El porcentaje de cada tipo de residuo se encuentra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Porcentaje de cada una de las fracciones de piña variedad cayena lisa o hawaiana

Partes del fruto	Rendimiento (%)
Cáscara	41
Corazón	6
Corona	20
Pulpa	33

(Ketnawa et al., 2012, p. 387)

La cáscara es una fuente de celulosa, hemicelulosa y lignina y otros carbohidratos que pueden ser usados para producir papel y tela. Los residuos provenientes del corazón y bagazo son usados para la elaboración de jugos concentrados, bebidas alcohólicas o vinagre (Ketnawa et al., 2012, p. 385).

Además, los residuos del procesamiento de piña han sido usados como sustratos para la producción de etanol, ácido cítrico y compuestos bioactivos, especialmente enzimas proteolíticas como la bromelina (Iffah, Arshad, Amid y Yusof, 2014, pp. 83-85).

1.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas presentes en los residuos de procesamiento de frutas y vegetales son de tipo intracelular, por lo que es necesario la aplicación de técnicas para la ruptura de las paredes celulares y así recuperar la mayor cantidad de los compuestos de interés (Balasundaram, Harrison y Bracewell, 2009, p. 477).

1.2.1 MÉTODOS MECÁNICOS Y NO MECÁNICOS

- **Métodos mecánicos**

Son métodos basados en el uso de la fricción y de fuerzas de corte cuyo objetivo es deformar la célula hasta su ruptura (De Lencastre, De Carvalho, Faustino y Gava p. 5). Dentro de los principales métodos se encuentran el uso de molinos y equipos de ultrasonido. Estos métodos resultan ser agresivos con las proteínas de interés, debido a la generación de calor (Robles y Ochoa, 2012, p. 112).

- a. Molienda**

Método basado en la reducción del tamaño de partícula mediante el uso de cuchillas, discos, bolas o martillos. (Bedolla, Dueñas, Esquivel y Favela, 2004, p 25-35). Se han realizado trabajos con el uso de molinos de bolas con el objetivo de aumentar las fuerzas de corte, reduciendo el tamaño de partícula y aumentando el rendimiento de la extracción a partir del prensado de la muestra obtenida (Nienaber y Shellhammer, 2001, p. 333).

Dos de los tipos de molinos usados en la industria de alimentos son descritos a continuación:

Molino de cuchillas: Equipo formado por una cámara de molienda y cuchillas afiladas que realizan un movimiento rotatorio y por el efecto de corte se usa para

la trituración y homogeneización de alimentos blandos y semiduros (Nor, Ramchandran, Duke y Vasiljevic, 2015, p. 7 105).

Molino coloidal: Equipo formado por una superficie estacionaria (estator) y una rotativa (rotor) entre las cuales existe una separación ajustable. Por esta cavidad una solución es forzada a ingresar generando una fuerza centrífuga que la somete a fuerzas de cizalla y turbulencia produciéndose la molienda y homogeneización de la solución (Nor, Norsyalieza e Illias, 2016, p. 20).

b. Equipo Ultrasónico

Equipo cuyo principio de funcionamiento es el uso de ondas acústicas de una frecuencia generalmente superior a los 20 kHz (Ozuna y Ochoa, 2012, p. 110). Cuando las ondas pasa a través de un medio líquido, la interacción entre el líquido y el gas disuelto conducen a un fenómeno de excitación conocido como cavitación acústica, caracterizado por la generación de microburbujas en el medio líquido.

Las microburbujas alcanzan un tamaño crítico e implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original, la cual libera toda la energía acumulada. La energía liberada y el choque mecánico afectan la estructura celular, lo que provoca la ruptura de la pared celular y permite la salida de los compuestos intracelulares (Vilkhu, Mawson, Simons y Bates 2008, p. 160). Se han realizado estudios acerca del uso de equipos de ultrasonido con el objetivo de aumentar el rendimiento en la extracción de compuestos de interés como proteínas, compuestos aromáticos, entre otros (Jutamongkon y Sanguansri, 2010, p. 945). Mediante la variación de la frecuencia de las ondas acústicas desde los 20 hasta 300 kHz existe un aumento de la extracción de proteínas de un 5 % con respecto a las muestras molidas (Vilkhu et al., 2008, p. 163)

- **Métodos no mecánicos**

Se basan en tratamientos de separación de componentes e hidrólisis de las paredes celulares mediante el uso de métodos químicos o enzimáticos. Por lo general, son menos severos comparados con los métodos mecánicos, lo que facilita la purificación del producto de interés (Puri et al., p. 40).

a. Métodos químicos: Implican el uso de solventes orgánicos, álcalis y detergentes que modifican las características de la pared celular. Estos componentes afectan la estructura de las membranas celulares primarias y secundarias (Gautam, Mishra, Dash, Goyal y Rath, 2010, p. 69).

Los solventes orgánicos atacan los compuestos hidrofóbicos de las membranas celulares, y las hacen permeables; al realizar un tratamiento con álcalis se saponifican los lípidos presentes en la membrana celular. El uso de este tipo de solventes se da cuando el compuesto de interés es resistente al pH; el uso de detergentes forma micelas con los lípidos de las membranas celulares (Aguilar, 2012, p. 7).

Cosgrove (2000) extrajo proteínas mediante la aplicación de diferentes agentes de origen químico. El resultado mostró que el uso de solventes no produce daños en toda la estructura de la membrana, por lo que debe complementarse con el uso de métodos mecánicos (pp. 112-115).

b. Métodos enzimáticos: Implica el uso de cocteles enzimáticos compuestos de celulasas, pectinasas y alfa – amilasas, es una alternativa potencial al uso de métodos de extracción tradicionales. Este método se basa en la capacidad inherente de las enzimas para catalizar reacciones mediante la degradación o alteración de las paredes celulares permitiendo así una mejor liberación y extracción de compuestos intracelulares con una alta especificidad y selectividad (Puri et al., 2012, p. 38), como se observa en la Figura 1.5.

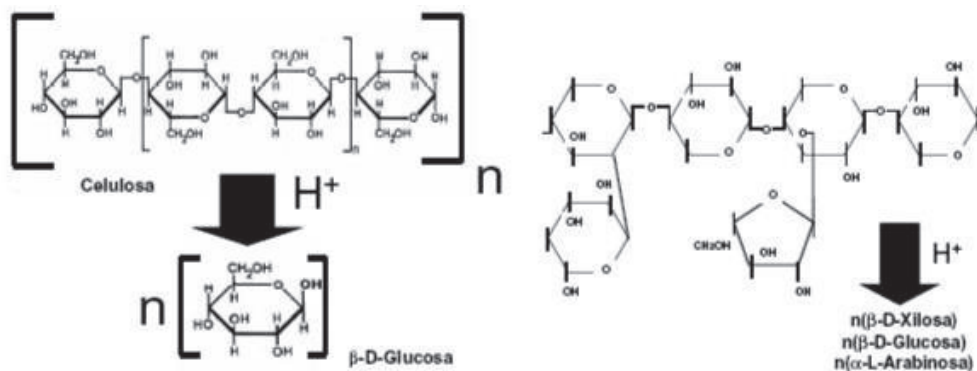


Figura 1.5. Hidrólisis de materiales lignocelulósicos mediante el uso de cocteles enzimáticos
(Aguilar, 2012, p. 5)

Este procedimiento permite la generación de métodos de extracción amigables con el medio ambiente, ya que el uso de enzimas reduce el porcentaje de solvente utilizada, y aumenta el rendimiento de extracción en comparación con los métodos no enzimáticos (Coelho et al., 2012, p. 1 825).

El uso de tratamientos enzimáticos no solo se da en la industria alimentaria, sino también en la industria de pulpa y papel, curtiembre, farmacéutica, de aceites y otras (Hernandez, Carvajal, Marquez y Chávez, 2004, p. 100).

Es necesario complementar la extracción enzimática con métodos mecánicos para la separación del compuesto de interés (Demir, Acar, Saroo y Mutlu, 2001, p. 277).

1.2.2 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El continuo interés de las proteínas en varias aplicaciones ha hecho que se desarrollen nuevas metodologías acerca de la obtención y purificación de estos componentes, tanto en las frutas como en los residuos del procesamiento. La selección del método es importante y está dada en función del tipo de proteína que se desea obtener y su aplicación (De Lencastre et al., 2015, pp. 15-20).

Algunas proteínas precipitan en condiciones en que otras todavía se encuentran solubilizadas. Este efecto se utiliza como base para la aplicación de diferentes métodos de extracción y purificación proteica (Stepankova et al., 2013, p. 2 825).

Los parámetros más importantes para elegir el mejor método son maximizar la eficiencia de extracción, minimizar la oxidación, evitar la denaturación e incrementar el porcentaje de proteína recuperada (Devakate, Patil, Waje y Thorat, 2009, pp. 260-261). Los métodos comúnmente usados son:

- **Microfiltración y Ultrafiltración**

La microfiltración es el proceso de separación de partículas de tamaño inferior a 10 μm en un fluido mediante el uso de membranas poliméricas, termoplásticas o tipo tamiz. La presión de trabajo se encuentra en el rango de 0,5 a 4 atm (Nadzirah, Zainal, Noriham y Normah, 2013, p. 44).

Antes de realizar el proceso de microfiltración se deben tomar en cuenta las características del flujo de alimentación, tamaño de partícula a separar y temperatura para a partir de estas características elegir el diámetro de poro de la membrana, velocidad de flujo y presión de trabajo.

- **Selección del diámetro de poro:** Para una suspensión y un tipo de membrana dada, existe un diámetro de poro óptimo que conserva la calidad de filtración deseada (Nadzirah et al., 2013, p. 45).
- **Influencia de la velocidad de flujo:** La influencia de la velocidad de flujo se debe al aumento del gradiente de velocidad en la capa límite, que aumenta el cizallamiento, y mantiene el filtro "limpio" (Nadzirah et al., 2013, p. 45).
- **Influencia de la presión:** El caudal de filtrado aumenta con la presión hasta un cierto valor límite, a partir del cual el caudal se estabiliza o disminuye (Nadzirah et al., 2013, p. 46).

La microfiltración se basa en impulsar el flujo a una velocidad relativa de la suspensión, bien sea en movimiento lineal o rotativo respecto a la superficie del medio filtrante. En este proceso, se alcanzan grandes velocidades de fluido en flujo cruzado a través de la superficie del filtro, mientras que la velocidad perpendicular a la superficie es relativamente pequeña. De esta manera se evita la formación de la torta filtrante y los problemas debido a la elevada resistencia de la torta (Guizard, 2007, p. 12).

Pese a que no se produce una torta filtrante, la membrana sufre un fenómeno denominado mecanismo de colmatación o ensuciamiento de la membrana que ocurre debido al taponamiento o bloqueo de los poros de la membrana. Los tres fenómenos que ocurren para que se dé el ensuciamiento de la membrana son:

- Polarización de la concentración de la solución
- Formación coloidal de la capa de sólidos en la membrana
- Formación de agregados que crean resistencia a la filtración y por lo tanto reducen la permeabilidad de la membrana disminuyendo el flujo de permeado (Guizard, 2007, p. 14).

El objetivo de este proceso es la eliminación de sólidos en suspensión, sin embargo, no retiene el paso de sales disueltas. La microfiltración no altera las propiedades químicas de la solución (Gallego, 2011, pp. 196-198).

La ultrafiltración es la continuación de la microfiltración, se utiliza cuando se quiere detener fragmentos de materia con tamaño menor a $0,1 \mu\text{m}$. Las diferencias principales con la microfiltración son las siguientes: la presión de trabajo es más elevada, típicamente entre 4 y 8 atm, por el hecho de que el tamaño de poros de la membrana de ultrafiltración es más pequeño; las especies a separar no son en realidad partículas en suspensión sino compuestos de tipo macromolecular o coloidal susceptibles de poseer fuertes interacciones fisicoquímicas con el material de la membrana (Le Ngoc y Van Viet, 2009, p. 275). Al aplicar estos dos procedimientos se espera separar las especies en función de sus tamaños.

- **Precipitación de proteínas**

La precipitación de proteínas involucra la adición de sales, solventes polares, no polares o la variación de la temperatura y pH. Si en una disolución de proteínas intervienen estos factores, la solubilidad de las proteínas puede verse reducida hasta el punto de producirse su precipitación (Voet y Voet 2004, p. 139).

Esto se debe a que los enlaces que mantienen la conformación globular se rompen y la proteína adopta una conformación filamentosa, produciéndose la denaturación, fenómeno que no afecta a los enlaces peptídicos por lo que la proteína puede volver a su conformación inicial (Voet, y Voet 2004, p. 142).

- **Adición de sales:** La solubilidad de una proteína en una solución acuosa es sensible a la concentración de sales disueltas; esta concentración se traduce como la fuerza iónica. A fuerzas iónicas elevadas se reduce la solubilidad de las proteínas, produciéndose un efecto conocido como “salting out” (reducción de la solubilidad por sales) (Mohd y Amir, 2014, pp. 7-9)

A concentraciones salinas elevadas las interacciones entre solutos se vuelven más fuertes que las que se producen entre los solutos y el solvente, lo que conduce a la precipitación del soluto. El sulfato de amonio es el reactivo más usado en este proceso (Soares et al., 2013, pp. 3-4).

- **Adición de solventes polares:** Los solventes solubles en agua como la acetona y el etanol son buenos precipitantes de las proteínas porque sus constantes dieléctricas bajas reducen el poder de solvatación de las soluciones hacia los iones disueltos, como las proteínas, produciendo su precipitación. Este procedimiento suele llevarse a cabo a temperaturas cercanas a los 4 °C, ya que a temperaturas más elevadas, los solventes orgánicos tienden a denaturar las proteínas (Martins et al., 2014, p. 784).

- **Efecto de la variación del pH:** Por lo general, las proteínas contienen numerosos grupos ionizables con distintos valores de pK. A un pH

característico para la proteína de interés las cargas positivas y negativas se equilibran con exactitud, este punto es denominado como isoeléctrico, donde la molécula proteica no tiene carga neta y es inmóvil en un campo eléctrico (Hebbar, Sumana y Raghavarao, 2008, p. 4897).

En este punto, el fenómeno conocido como “salting in” (aumento en la solubilidad de la proteína por la concentración de sal) no tiene influencia; a medida que la muestra varía su pH, la proteína se ve más influenciada por este fenómeno, por lo que se espera que la solubilidad de la proteína sea menor en el punto isoeléctrico (Martins et al., 2014, p. 785).

La presencia de sales o solventes orgánicos en las muestras con proteína pueden influir en la actividad enzimática. La presencia de estos componentes denatura la bromelina mediante la ruptura de los enlaces intramoleculares de las cadenas de hidrógeno. A medida que el porcentaje de sales o alcohol en las muestras de proteína aumenta, la actividad enzimática disminuye significativamente (Benucci et al., 2011, p. 1351).

- **Sistema acuoso de dos fases**

El sistema acuoso de dos fases (ATP) es un sistema de extracción comúnmente usado para la separación y purificación de biomoléculas en soluciones cuyas fases presentan de un 70 a un 80 % de agua. Esta extracción remueve componentes no deseados como polisacáridos no identificados, pigmentos y proteínas que interfieren con la actividad enzimática de la proteína de interés. Al no usar solventes orgánicos se reduce la denaturación enzimática (Voet y Voet 2004, p. 143).

El ATP se basa en la transferencia de masa entre dos fases líquidas inmiscibles que ocurre cuando dos polímeros o dos polímeros y una sal son añadidos y resulta en la partición de un específico grupo de moléculas formando dos fases inmiscibles. El proceso seguido se observa en la Figura 1.6 Las sustancias

comúnmente usadas para la formación de estas dos fases son polietilenglicol (PEG) y sulfato de amonio (Li et al., 2012, p. 3).

La ubicación del compuesto de interés en las muestras está influenciada por los enlaces iónicos, pH, temperatura, peso molecular del polímero y tipo de sal. Al existir las mejores condiciones de estos factores se separa en dos fases, situando el compuesto de interés en la parte superior de la muestra para posteriormente ser separada mediante centrifugación (Bala, Ismail, Mel y Jami, 2012, p. 389).

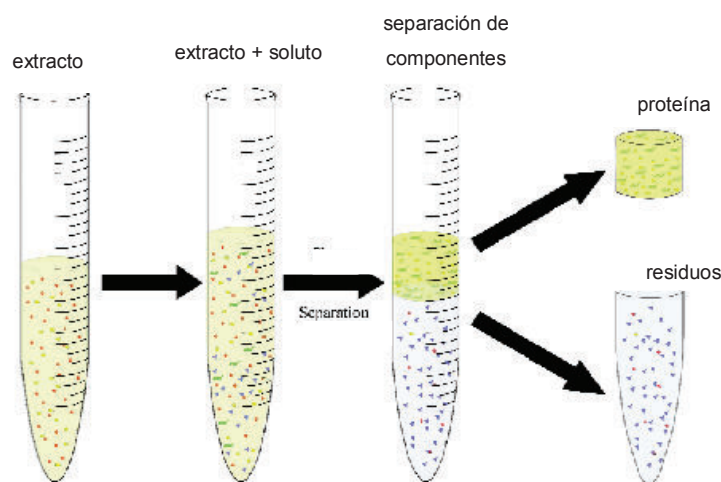


Figura 1.6. Ilustración de la extracción de proteínas mediante el sistema acuoso de dos fases
(Bala et al., 2012, p. 388)

- **Cromatografía**

La cromatografía es un conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de cada componente en otra sustancia (Voet y Voet 2004, p. 139). En general, consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto de interés) a través de una fase estacionaria fija sólida (papel, gelatina, alúmina o sílice). La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo (Voet y Voet 2004, p. 142).

Para la separación de los componentes existen dos tipos de mecanismos, el primero es la adsorción en la que se usa cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y de afinidad; el segundo mecanismo es la nanoadsorción que usa geles de filtración (Silveira y Tambourgi, 2014, p. 885). Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado tiempo de retención (Devakate et al., 2009, p. 261).

- **Extracción de micelas inversas**

Es una técnica de extracción líquido – líquido que ocurre por la solubilización de proteínas hacia los núcleos micelares internos. Normalmente este método es modificado para realizar la extracción y concentración selectiva de las proteínas y enzimas (Hebbar et al., 2007, p. 4 898).

Consiste en el goteo del compuesto de interés de la fase acuosa separada desde un solvente orgánico, con la presencia de surfactantes en la interfase. Se compone básicamente de dos pasos: extracción directa y reextracción. En el proceso de extracción directa, las biomoléculas se transfieren desde la fase acuosa inicial a las micelas invertidas. En el proceso de re-extracción, las biomoléculas se transfieren de las micelas invertidas formando una nueva solución. El surfactante posee zonas hidrofóbicas (fuera de la micela) e hidrofílicas (dentro de la micela) como se observa en la Figura 1.7. Después se centrifuga la mezcla y se separan las dos fases (Voet y Voet, 2004, p. 143).

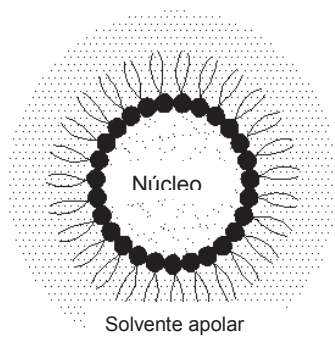


Figura 1.7. Estructura de extracción por micelas inversas
(Hebbar et al., 2008, p. 4 897)

La re-extracción de proteínas se ve afectada por el valor de pH y por la concentración de sal en la solución de alimentación y en la solución acuosa utilizada. El rendimiento de la extracción aumenta cuando el pH es similar al punto isoeléctrico de la proteína a purificar y la fuerza iónica es baja (Hebbar et al., 2008, p. 4901).

En la Tabla 1.2, se observan las ventajas y las desventajas de cada una de las estrategias para la purificación de enzimas, enumeradas anteriormente.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de los tipos de purificación de proteínas

Tipo de Purificación	Ventajas	Desventajas
Microfiltración / Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none"> • Permite concentrar la proteína • Eficiente para remover contaminantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Muchas horas de trabajo
Precipitación	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de baja energía 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita proceso de diálisis para eliminar la sal presente
Sistema acuoso de dos fases	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de procesamiento bajo 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad de remover la proteína presente en la fase que contiene el polímero
Extracción de micelas inversas	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ser operado en un modo continuo • Escasa pérdida de proteína y su actividad 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad de remover la proteína presente en el agente surfactante
Cromatografía	<ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad de las proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiples pasos • Rendimientos bajos

(Hale, Greer, Trinh y James, 2005 pp. 785-790)

1.3 CARACTERÍSTICAS Y APLICACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las proteasas dominan el mercado de enzimas con el 70 al 80 % de la producción mundial, siendo los mayores productores en el mundo Industrias Novo, Laboratorios Miles y Genecor Internacional (Coelho et al., 2014, p. 885).

Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis proteolítica de los enlaces peptídicos, que consiste en un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces que se da mediante tres reacciones consecutivas. Primero la formación de un complejo enzima – sustrato, después la ruptura de un enlace dando como resultado la liberación de un péptido y finalmente la separación de la enzima después del ataque nucleofílico de una molécula de agua.

Las enzimas proteolíticas se clasifican en función de su acción catalítica en endoproteasas, exoproteasas y en función de su sitio catalítico en serinoproteasas, cisteinoproteasas y aspartoproteasas (Rocha et al., 2013, p. 974).

Por su acción catalítica, las endoproteasas hidrolizan los enlaces amídicos dentro de la proteína (tripsina y quimotripsina), mientras que las exoproteasas, actúan sobre los enlaces terminales dentro de una proteína (aminopeptidasas y carboxipeptidasas), basándose en su sitio de acción sea un nitrógeno o un carbono terminal, como se puede observar en las Figuras 1.8 y 1.9.

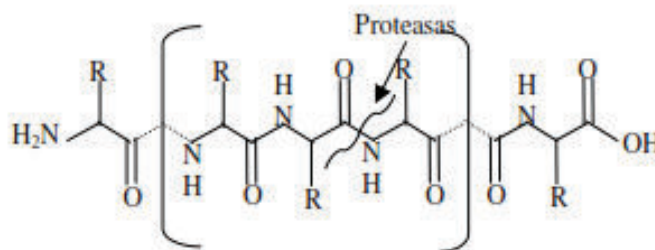


Figura 1.8. Sitio de acción para la hidrólisis de las endoproteasas (Corzo, Waliszewski y Welti- Chanes, 2012, p. 632)

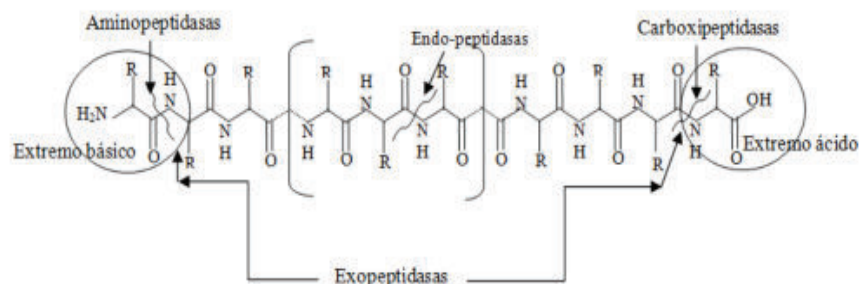


Figura 1.9. Sitio de acción para la hidrólisis de las exopeptidasas
(Corzo, Waliszewski y Welti-Chanes, 2012, p. 633)

Por la naturaleza del sitio catalítico, las serinoproteasas, cisteinoproteasas y aspartatoproteasas difieren una de la otra del tipo de aminoácidos y ligandos que se obtienen cuando ocurre la formación del complejo enzima – sustrato, ya que el centro activo contiene aminoácidos que promueven la catálisis en función del aminoácido presente siendo serina, cisteína o ácido aspártico, respectivamente (Pinto, Silvestre, Carreira y Silva, 2012, pp. 1 826-1 828).

La serinoproteasas tienen su máxima actividad a pH alcalino, su centro catalítico es el grupo OH, pertenecen a este grupo la tripsina, quimiotripsina y subtilisina (Lago, Varela y Merino, 2009, p. 19).

Las cisteinoproteasas están estrechamente relacionadas con las anteriores, tienen su máxima actividad a pH entre 6 y 8, siendo su grupo catalítico el grupo SH. Estas proteasas son sensibles al oxígeno y son características de las plantas y microorganismos, pertenecen a este grupo la papaína, la bromelina y la ficina (Bertoluzzo, Bertoluzzo y Rigatusso, 2000, p. 243).

Las aspartoproteasas tienen su máxima actividad a pH ácido, tienen un grupo carboxilo procedente de un residuo de ácido aspártico en el centro activo, pertenecen a este grupo la pepsina y quimosina (Cosgrove, 2000, p. 111).

1.3.1 OBTENCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria eran proteasas pancreáticas de origen animal. Actualmente, se está dando la investigación de proteasas de origen bacteriano, vegetal y fúngico (Elizondo y Campos, 2014, p. 2 218).

Desde el punto de vista comercial, la producción de enzimas industriales en el año 2015 generó ganancias de alrededor de 1 600 millones de dólares al año, de los cuales 60 % se debió a la venta de proteasas (Carrera, 2016, p. 12). La industria Novozymes es una de las más importantes a nivel mundial, reportando el 32 % en ventas de enzimas, donde se incluyen las proteasas, siendo estas las más vendidas. Un 22 % de sus ventas en enzimas se emplea para mejorar la calidad de alimentos, donde se involucra el uso de lipasas y proteasas (Feijoo y Villa, 2015, p. 1 071).

Además, se pueden encontrar enzimas proteolíticas sintetizadas de diferentes maneras.

- a. **Origen animal:** Son proteínas obtenidas a partir de los tejidos de diferentes organismos como el estómago o el páncreas. Las principales enzimas dentro de esta clasificación son la tripsina, pepsina, pancreatina, colagenasa y pronasa. Estas enzimas trabajan a pH ácido (Benítez, Ibarz y Pagan, 2008, p. 231).
- b. **Origen vegetal:** Extraída a partir de especies de frutos y plantas, principalmente de la familia Bromeliaceae (bromelina), Caricaceae (papaína) y Moraceae (ficina) a partir de la piña, papaya e higo, respectivamente mediante procesos de ruptura celular, precipitación y purificación (Andrade-Mahecha, Morales- Rodriguez y Martinez-Correa, 2011, p. 220).
- c. **Origen fúngico:** Los productores de enzimas proteolíticas a partir de cepas de origen fúngico son productoras de enzimas proteolíticas extracelulares

mediante fermentación en medio líquido, una tecnología ambientalmente sustentable, pues se pueden utilizar sustratos biodegradables. Al ser componentes extracelulares, son de fácil recuperación. Entre los principales productores de proteasas de origen fúngico, se encuentran especies *Mucor*, *Aspergillus* y *Rhizopus* (Corzo et al., 2003, p. 633).

1.3.2 APLICACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

- **Bromelina**

Es una glicoproteína del grupo de las cisteínproteasas derivada del tallo y el fruto de la piña (*Ananas comosus*). La bromelina (EC 3.4.22.33), ananaina (EC 3.4.22.31) y la comasaína se extraen de los tallos de piña, mientras que la bromelina (EC 3.4.22.33) proviene principalmente del zumo de fruta (Liang et al., 2014, pp. 19-20).

Proteasas similares también están presentes en la cáscara de piña, el núcleo, la corona y las hojas. La bromelina actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango de 5 a 8 (Gallardo et al., 2008, p. 1).

La enzima purificada del fruto es una cisteínproteasa de carácter ácido perteneciente a la misma familia que la papaína extraída del fruto de *Carica papaya* (Quinde y Sánchez, 2015, p. 2).

Las principales aplicaciones de la bromelina en la industria son:

- **Cárnica:** El ablandamiento de la carne es una característica importante que atrae a los clientes ya que consideran esta característica como sinónimo de calidad por lo que se han realizado estudios para el uso de proteasas como ablandadores. La adición de bromelina en la superficie hidroliza

eficientemente algunas proteínas de miofibrillas de la carne tales como actomiosina, titina, nebulina y miosina (Mohd et al., 2014, p. 4).

- **Panificación:** El gluten es un componente funcional de los productos alimenticios del trigo, compuesto de dos proteínas principales, gliadina y glutenina. El gluten se vuelve insoluble y forma una red estructural cuando está hidratado por lo que debe ser degradado para evitar la resistencia al estiramiento de la masa. El uso de la bromelina reduce la resistencia de la masa, mejora la solubilidad y previene el encogimiento de la masa, elevándola uniformemente durante el proceso de horneado (Clavijo, Portilla y Quijano, 2012, p. 43).
- **Alimento para ganado:** Los forrajes proporcionan el 90 % de la energía y los nutrientes de los rumiantes a bajo costo. La adición de proteasas a la dieta del ganado aumenta el porcentaje de proteína suministrada, reduciendo el valor de mantenimiento por animal (López et al., 2014, p. 385). Como el valor nutricional de los forrajes está influenciada por las especies forrajeras y el método de conservación, la variación de estos factores puede variar la disponibilidad de los compuestos nitrogenados (Ram y Pachecho, 2011, p. 72).
- **Cosmética y farmacéutica:** En la industria cosmética, las proteasas son usadas para la elaboración de productos que alivien problemas como la picazón, acné y piel seca ya que digieren las proteínas de las células muertas presentes, dando una mejor apariencia a la piel (López et al., 2016, pp. 18-20). En la industria farmacéutica se emplea como agente digestivo en el tratamiento de dispepsias, además tiene propiedades antiinflamatorias y presenta aplicaciones en tratamientos contra el cáncer (Lago et al., 2009, p. 19).

- **Ficina**

La ficina, al igual que la bromelina y la papaína es una cisteín proteasa que se obtiene del látex de las plantas del género Ficus. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el rango de 5 a 8. La temperatura óptima está alrededor de 60 °C, inactivándose completamente a los 80 °C (Bertoluzzo et al., 2000, p. 243).

- **Papaína**

Es el término que se aplica tanto a las preparaciones enzimáticas crudas obtenidas del látex de papaya como a las distintas fracciones proteicas del mismo. Es una cisteinproteasa perteneciente a la misma familia de la bromelina. Las enzimas papaína y quimopapaína son las principales proteasas del látex (10 y 45 % de la proteína soluble). Junto con la ficina ambas proteasas han sido denominadas como pepsina vegetal (Deulgaonkar y Thorat, 2008, p. 2). Las aplicaciones de la papaína son las mismas que tiene la bromelina.

- **Renina**

También llamada quimosina, es una enzima proteolítica de tipo aspartil – proteinasa, que se obtiene tradicionalmente del abomaso de terneros jóvenes (Bertozulo et al., 2000, p. 245). Se encuentra mezclada con pepsina, siendo la proporción de quimosina y la calidad del cuajo mayor mientras más joven es el animal. La pepsina causa un grado superior de proteólisis en la leche en comparación con la quimosina por lo que se forman péptidos cortos con sabor amargo que afectan la calidad final de los quesos (Hernández, 2004, p. 95).

1.3.3 MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ENZIMAS

Después de purificar una enzima con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, es necesario mantener la estabilidad de la enzima con el objetivo

de mantener por el mayor tiempo posible su actividad proteolítica (Desai y Park, 2005, p. 1363).

Una de las formas más efectivas para estabilizar la enzima es reducir la humedad presente y la actividad de agua, reduciendo también así el posible apareamiento de microorganismos (Balasundaram et al., 2009, p. 488).

El secado es descrito como un proceso de eliminación de la humedad para generar un producto sólido y seco mediante los procesos de transferencia de energía y humedad, los cuales ocurren simultáneamente (Nireesha et al., 2013, p. 87). Existen dos mecanismos para remover la humedad; el primero es la evaporación que ocurre cuando la presión de vapor de la humedad en la superficie es igual a la presión atmosférica; si la muestra a secarse es sensible al calor la temperatura puede ser disminuida al bajar la presión. Este mecanismo es usado para el secado por liofilización. El segundo es la vaporización, que se lleva a cabo por convección mediante el paso de aire caliente sobre el producto. El aire es enfriado por el producto y la humedad se transfiere hacia el aire. Este mecanismo es usado para el secado por atomización y de aire forzado (Gómez y Jiménez, 2014, p. 26).

Para evitar la pérdida de la actividad enzimática de los compuestos de interés, se utilizan como agentes protectores goma arábiga, goma carragenina, almidón, maltodextrina, entre otras (García y López, 2012, p. 85).

- **Secado por atomización**

La atomización es el proceso mediante el cual un líquido se seca para producir polvo. Previamente se forma una emulsión estable, para la cual se debe tener en cuenta diferentes parámetros como el porcentaje de sólidos y temperaturas de entrada y salida del proceso (Nireesha et al., 2013, p. 85).

La influencia del contenido de sólidos modifica la viscosidad de la solución y por tanto la velocidad de circulación de las gotas atomizadas. Es recomendable un

alto contenido de sólidos. Un valor adecuado se encuentra entre el 20 % y el 40 % para el material de cobertura de la emulsión (Nireesha et al., 2013, p. 86).

El control de la temperatura se debe realizar a la entrada y salida del aire, ya que al aumentar la temperatura, la viscosidad y el tamaño de la gota son menores, además, esto puede causar volatilización o degradación de compuestos termosensibles (Nireesha et al., 2013, p. 87).

Su principio de operación se basa en la atomización de la emulsión, generando de esta forma pequeñas microgotas, las cuales al estar en contacto con una corriente de aire caliente son pulverizadas. El aire actúa como medio de calefactor y fluido de transporte (Gómez y Jiménez, 2014, p. 31).

El equipo de atomización se compone principalmente de un atomizador por el cual pasa el fluido de trabajo en forma de gotas, una cámara de secado donde se secan las gotas, un calefactor en el que se regula la temperatura de entrada y salida de aire, un recipiente colector, donde se almacena la muestra en polvo y un ciclón, que se utiliza para regular la velocidad del flujo de aire (Devakate et al., 2008, p. 261). En el diagrama de la Figura 1.10 se observan las partes descritas.

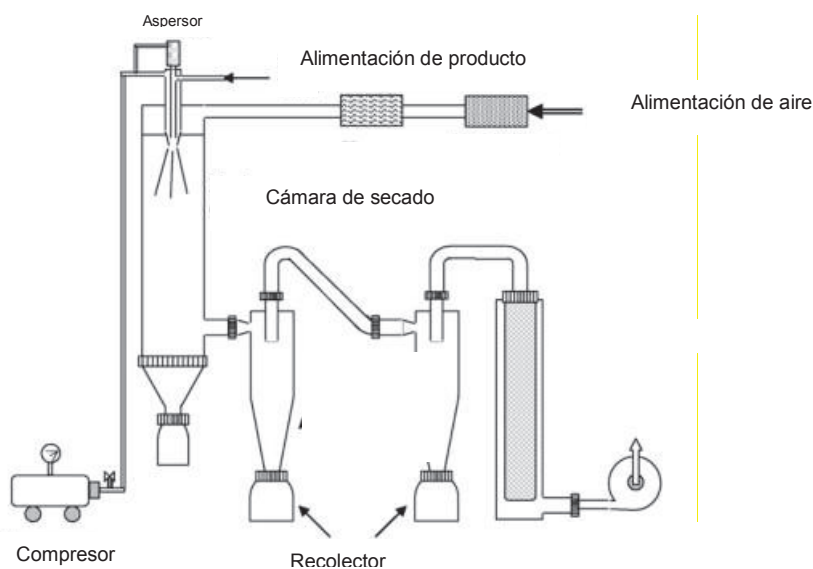


Figura 1.10. Esquema del atomizador (spray dryer)
(Devakate et al., 2009, p. 262)

- **Secado por liofilización**

La liofilización es un proceso de secado multi – etapa que se divide en tres procesos: congelación, sublimación (secado primario) y luego desorción (secado secundario) (Gómez y Jiménez, 2014, p. 25).

Antes del secado, el compuesto de interés se emulsifica (mezcla del compuesto de interés con agente encapsulante), se debe tener en cuenta que el material de cobertura no interfiera con el compuesto de interés aún después del congelamiento y secado. Los materiales de cobertura utilizados comúnmente son maltodextrina, gomas y quitosano (Bertozuelo et al., 2008, p. 243).

Los productos liofilizados presentan ventajas y desventajas con respecto a las muestras atomizadas. Entre las ventajas están una alta calidad de la muestra final, una fácil reconstitución y una conservación de sus propiedades por más tiempo; entre las desventajas están un alto consumo de energía para secar estas muestras, un mayor tiempo de procesamiento (alrededor de 20 horas) y un costo de 30 a 50 veces mayor (García y López, 2012, pp. 85-86).

El liofilizador está compuesto por una caja de vacío denominada cámara de liofilización, que contiene una bandeja para procesar el producto; un condensador, diseñado para eliminar el agua de la muestra; un sistema de fluido que utiliza normalmente como fluido de trabajo aceite de silicona; un sistema de vacío, que tiene una bomba rotativa de vacío y un sistema de control que permite visualizar el aumento de la temperatura del fluido de trabajo y la variación del peso (Gómez y Jiménez, 2014, p. 29). Las partes del equipo se muestran en la Figura 1.11.

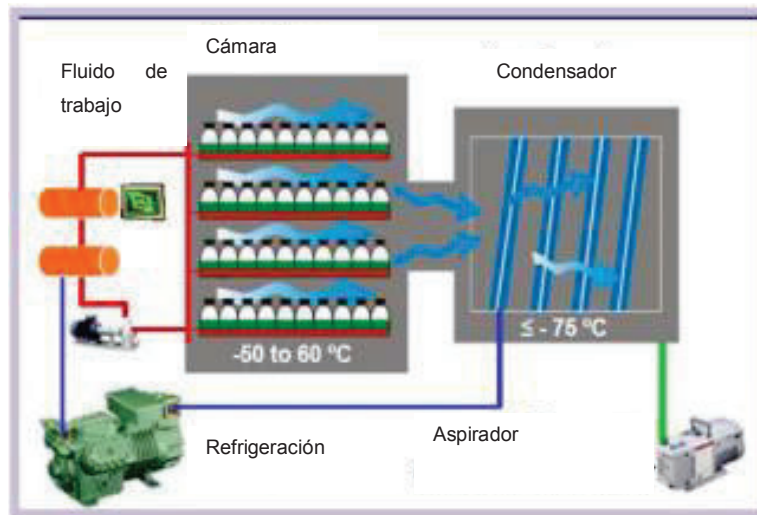


Figura 1.11. Esquema del liofilizador
(Nireesha et al., 2013, p. 91)

2 PARTE EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en la planta piloto del Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología DECAB de la EPN. Para el desarrollo de la investigación se utilizó como materia prima residuos del procesamiento de piña (cáscara, corazón y bagazo) obtenidos en la empresa ENVAGRIF dedicada al procesamiento de frutas para la elaboración de pulpas, mermeladas y otros productos.

2.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN RESIDUOS DE PIÑA

Para obtener los residuos, las piñas fueron procesadas siguiendo los pasos descritos en la Figura 2.1.

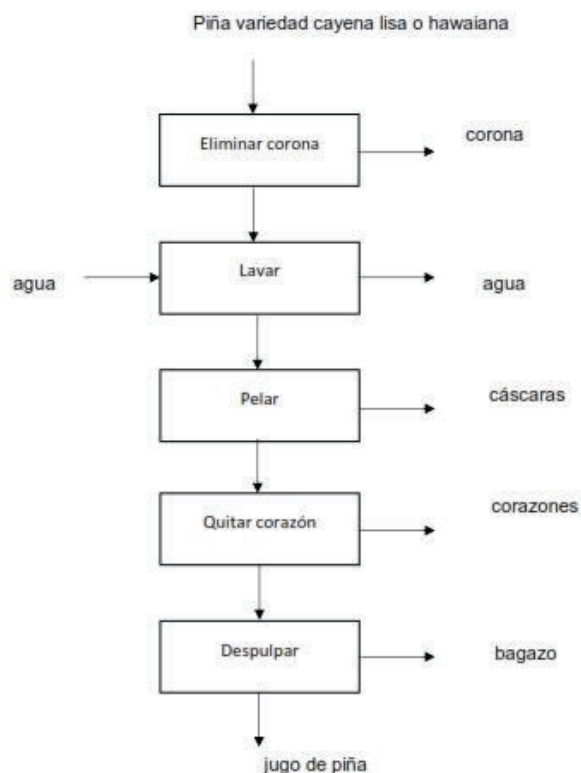


Figura 2.1. Proceso de obtención de residuos a partir del procesamiento de piña

Las coronas fueron desechadas y los residuos del procesamiento restantes fueron clasificados en bagazo (residuo de la refinación de la pulpa), corazón (parte central) y cáscara, almacenados en costales. Las muestras fueron llevadas a la planta piloto del DECAB, posteriormente cada una de las fracciones fue empacada en fundas de 1 kg, las cuales se etiquetaron y almacenaron a - 18 °C para su análisis tres días después.

Antes de iniciar los análisis se seleccionaron fundas de cáscara, corazón y bagazo de piña, se tomaron 10 g de muestra de cada funda y se descongeló cada fracción por separado a temperatura ambiente. El corazón y la cáscara se licuaron por separado en una licuadora Oster durante 3 minutos hasta triturarse.

Con la ayuda de una tela de liencillo se extrajo el jugo de cada una de las fracciones de residuo y se realizaron análisis químicos con los métodos AOAC (2005) para frutas y productos frutales. Los análisis que se realizaron fueron pH (981.12), °Brix (932.12), humedad (925.45), acidez titulable (942.15) y conductividad (957.16). El esquema del procedimiento se encuentra descrito en la Figura 2.2.

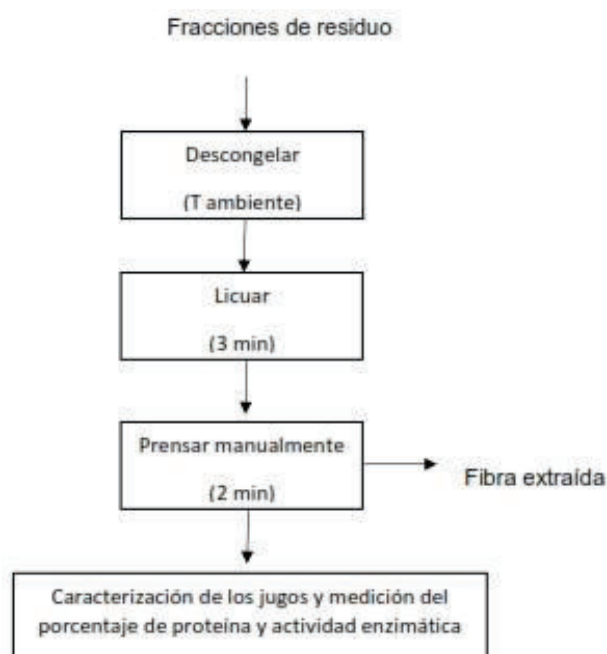


Figura 2.2. Proceso de obtención de los jugos de cada tipo de fracción de piña

- **Cálculo del porcentaje de proteína y actividad enzimática**

Con el jugo obtenido de la cáscara, corazón y bagazo se realizaron los análisis de porcentaje de proteína por el método Kjeldahl (920.152) y actividad enzimática por el método analítico Anson con las modificaciones, que se encuentran en Clavijo et al., 2012, p. 5).

Se preparó una solución acuosa de caseína al 2 % en peso, una solución de buffer fosfato 0,2 M pH 8, una solución de ácido acético 1 M y una solución de enzima (jugo de piña). Cada una de las soluciones se calentó en un baño maría marca Blue M a 30 °C durante 10 min, posteriormente se realizaron 3 diferentes mezclas (blanco 1, blanco 2 y muestra) a 30 °C en un tubo de ensayo. La cantidad y las soluciones empleadas se especifican en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Soluciones y cantidades empleadas en las mezclas a 30 °C

NOMBRE DE LA MEZCLA	COMPONENTES
BLANCO 1	3 mL buffer + 3 mL caseína + 3 mL buffer + 3 mL ácido acético
BLANCO 2	3 mL buffer + 3 mL buffer + 3 mL enzima + 3 mL ácido acético
MUESTRA	3 mL buffer + 3 mL caseína + 3 mL enzima

Para determinar la velocidad de la hidrólisis enzimática en los tubos de la muestra se prepararon 16 tubos idénticos y se detuvo la hidrólisis con la adición de 3 mL de ácido acético. Al primer tubo se añadió el ácido a los 30 s, en el segundo tubo se añadió a los 60 s y así sucesivamente hasta completar 8 min.

Cada uno de los tubos de ensayo fue centrifugado en una centrífuga DAMON IECHN SII a 3 500 rpm durante 10 min, el precipitado fue desechado y el sobrenadante fue almacenado. Se colocaron en una celda de cuarzo 0,3 mL de sobrenadante y 2,7 mL de agua destilada (dilución 1:10), se midió la absorbancia en el espectrofotómetro SHIMADZU UV 160 A a 270 nm y se determinó la absorbancia de cada una de las mezclas.

Con los datos obtenidos experimentalmente se obtuvo la pendiente de la recta en la zona en la que presentaron tendencia lineal. Los valores de las pendientes obtenidas se encuentran en el Anexo I. A partir de este valor se calculó la actividad enzimática total según la Ecuación 2.1.

$$AET \text{ (}\mu\text{mol/min mL)} = \frac{\frac{\Delta A}{t * 60} * \emptyset}{\varepsilon * L * PM \text{ caseína}} * 10^6 \quad [2.1]$$

Donde:

AE = Actividad enzimática total

$\frac{\Delta A}{t}$ = Variación de la actividad enzimática de la bromelina

\emptyset = Factor de dilución

ε = Coeficiente de extinción (g /100 mL)⁻¹ (cm)⁻¹

L = Longitud atravesada por la luz (cm)

PM caseína = Peso molecular de la caseína (g /mol)

Para esta ecuación, el peso molecular de la caseína fue de 23 600 Da (Rival et al., 2001, p. 289) y el coeficiente de extinción de la caseína a una longitud de onda de 270 nm fue de 10,1 (g/100 mL)⁻¹ (cm)⁻¹ (Herskovits et al., 1970, p. 4 545). A partir de la actividad enzimática total se calculó la actividad enzimática específica según la Ecuación 2.2:

$$AE \text{ específica (mol/min mg)} = \frac{AET}{[prot]} * 10^{-6} \quad [2.2]$$

Donde:

AE específica = Actividad enzimática específica

AET = Actividad enzimática total (μmol/min mL)

[prot] = Concentración de proteína (mg/mL)

La concentración de proteína se calculó según la Ecuación 2.3

$$[prot] = \frac{(\% \text{ proteína}) * \text{enzima}}{\text{muestra}} * 10^3 \quad [2.3]$$

Donde:

$[prot]$ = Concentración de proteína (mg/mL)

% proteína = Porcentaje de proteína de la muestra
(ejemplo: 0,9 %, colocar 0,9/100)

enzima = Cantidad de enzima añadida (g)

muestra = Volumen de solución total (mL)

Para esta ecuación la cantidad de solución con enzima añadida (jugo de piña) fue 3 g y el volumen de solución total fue de 12 mL. Estas cantidades fueron las usadas para el análisis de actividad enzimática descrito en la Tabla 2.1.

En el Anexo I se presentan los valores de actividad enzimática total y específica para cada uno de los procesos de extracción de bromelina con un ejemplo de cálculo.

En cada uno de los procesos se calculó el porcentaje de recuperación de actividad enzimática total y porcentaje de recuperación de proteína según las Ecuaciones 2.1 y 2.2 del Anexo II.

Se realizó un análisis de varianza en el programa Statgraphics Centurión XVI con el fin de determinar si existieron diferencias significativas entre las fracciones de residuo con respecto a pH, humedad, °Brix, acidez y conductividad.

Para el porcentaje de proteína y actividad enzimática se realizó el análisis de varianza y se determinó si existieron diferencias significativas con respecto a la fracción de residuo usada.

La fracción con mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática fue utilizada para continuar con el proceso de extracción de bromelina.

2.2 COMPARACIÓN DE DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ENZIMAS

La fracción de residuo elegida en el acápite 2.1 fue usada para realizar diferentes procesos de extracción siguiendo un diseño experimental 3x2, siendo las variables:

- a) Proceso de extracción usado con 3 niveles y
- b) Pretratamiento enzimático con 2 niveles

Antes de iniciar el proceso, la fracción escogida (cáscara, corazón o bagazo) se redujo de tamaño en un molino de cuchilla RAMON A 20 VAR durante 5 minutos en velocidad lenta (12 rpm) y 5 min en velocidad rápida (24 rpm) con el objetivo de obtener una pasta homogénea.

En las pruebas en las que se realizó el pretratamiento enzimático se utilizó un coctel enzimático comercial (Granozyme CL) cuyos componentes son xilanasas y beta glucanasas de origen microbiano, la temperatura de trabajo fue de 30 °C, la dosis aplicada a la muestra fue de 0,5 mL/kg, permaneció en reposo durante una hora y se agitó cada 10 minutos.

Las muestras molidas con o sin pretratamiento enzimático, se sometieron a los procesos de extracción listados en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Procesos de extracción usados y pretratamientos empleados en la extracción de enzimas

Proceso de extracción usado	Uso de un pretratamiento enzimático
Solo prensado	No
	Sí
Molino coloidal	No
	Sí
Punta ultrasónica	No
	Sí
Baño ultrasónico	No
	Sí

A continuación se describe cada uno de los procesos de extracción usados

- a) Con un molino coloidal:** A las muestras molidas se adicionó agua en proporción másica 2:1 (muestra: agua), antes de llevarlas al molino coloidal FRYMA VDE 0530 durante 5 min a 15 °C.
- b) Con ultrasonido:** A las muestras molidas se adicionó agua en proporción másica 2:1 (muestra: agua) y fueron llevadas a los equipos de punta ultrasónica VLIR y baño ultrasónico BRANSON 3120 durante 10 minutos a 15 °C y 350 W de potencia (Vilkhu et al., 2008, p. 163) y se agitaron cada 2 min hasta la finalización del proceso.

Las muestras de cada uno de los métodos de extracción usados se colocaron en tela de liencillo y se llevaron a una prensa neumática alrededor de 6 bar, este proceso se realizó 6 veces durante 5 min para obtener un residuo sólido y un extracto. Ambos fueron pesados y se determinó el rendimiento de cada uno de los procesos.

En cada uno de los extractos obtenidos se analizó el porcentaje de proteína, pH, °Brix, acidez, conductividad eléctrica según la metodología citada en AOAC (2005). Además se determinó el rendimiento según la Ecuación 2.3 del Anexo II.

En cada uno de los residuos sólidos obtenidos se determinó el porcentaje de proteína según la metodología descrita en AOAC (2005).

Cada uno de los procesos mencionados anteriormente y mostrados en la Figura 2.3 se realizaron por duplicado.

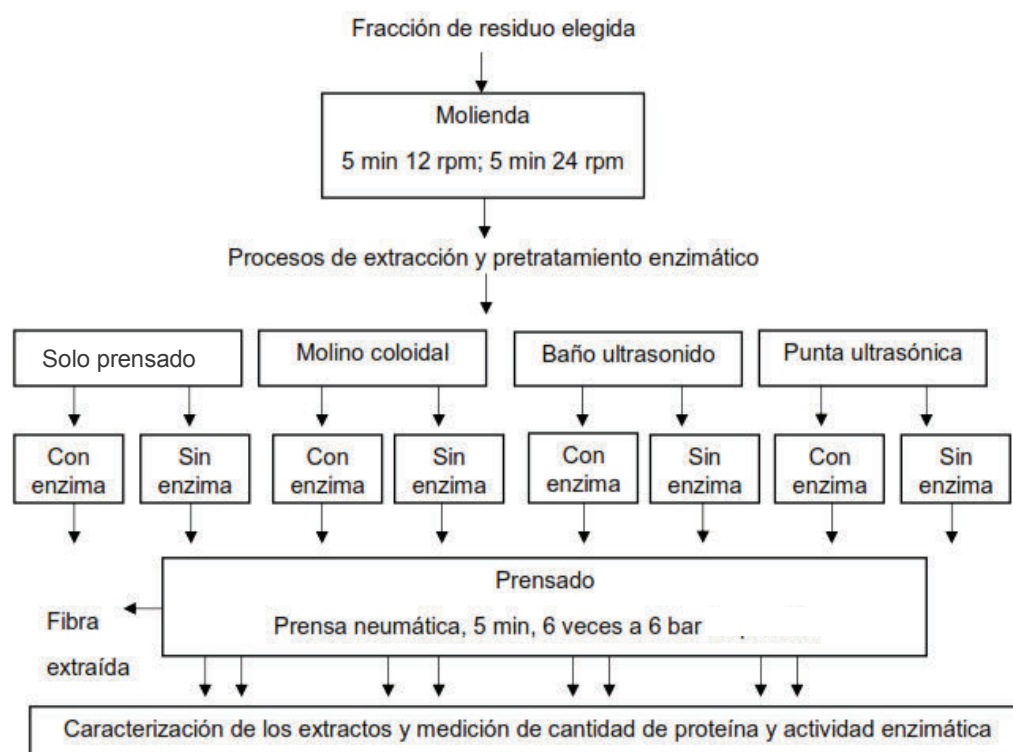


Figura 2.3. Proceso de obtención de los extractos de cada tipo de proceso de extracción y pretratamiento enzimático

Con los resultados de los análisis químicos se realizó un análisis de varianza con el 95 % de confianza en el programa Statgraphics Centurión XVI con el fin de determinar si existió efecto significativo de los diferentes procesos de extracción y el uso o no de un pretratamiento enzimático sobre el pH, humedad, °Brix, acidez, conductividad, rendimiento, porcentaje de proteína y actividad enzimática.

El extracto cuyo proceso de extracción y uso de un pretratamiento enzimático presentó el mayor porcentaje de proteína y actividad fue elegido y llevado al siguiente proceso.

2.3 EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

El proceso de purificación de enzimas se muestra en la Figura 2.4.

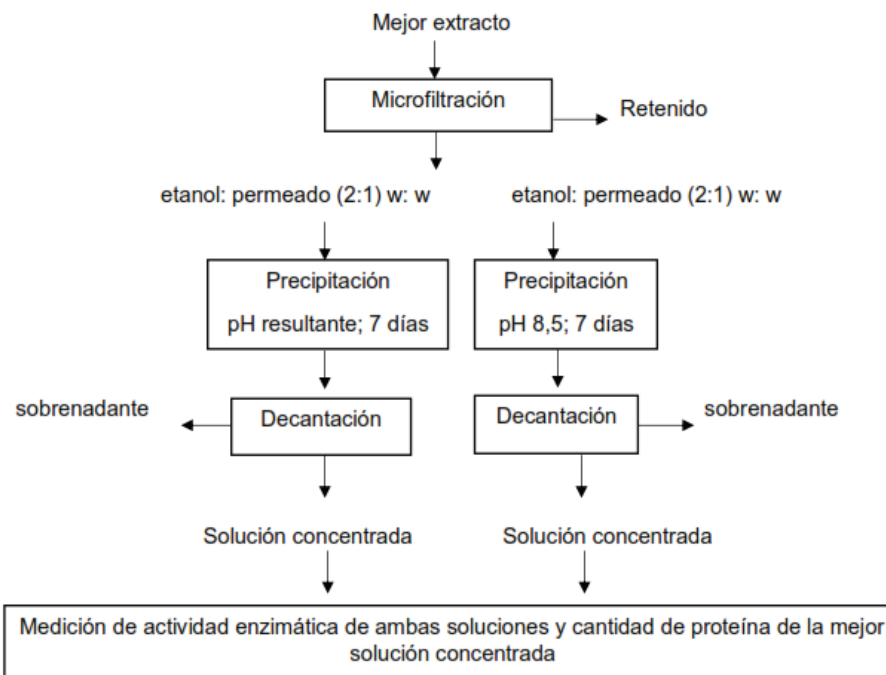


Figura 2.4. Proceso de obtención de las soluciones concentradas de bromelina mediante precipitación

Inicialmente, el extracto seleccionado en el acápite 2.2 se filtró con un microfiltrador tangencial TIA modelo F 84500 BOLLENE. Las condiciones de operación del proceso se describen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones de operación del proceso de microfiltración

Tamaño de la membrana	0,2 μm
Temperatura de operación	25 $^{\circ}\text{C}$
Presión de trabajo	4 bar
Flujo de alimentación	5 mL/min

El retenido fue eliminado y en el permeado se determinó el porcentaje de proteína (AOAC, 2005) y la actividad enzimática (Clavijo et al., 2012).

Para precipitar la proteína se añadió al permeado, etanol potable (96 %) en proporción másica 1:2 (permeado: etanol) (Coelho, Linhares, Ramalho, Campos, Pereira y Morais, 2012) y se mantuvo en reposo la muestra por 7 días a 4 °C.

Las muestras se evaluaron a dos valores diferentes de pH: el pH resultante de la microfiltración y un pH de 8,5 que corresponde al punto isoeléctrico de la proteína, añadiendo NaOH 1 N (Carvajal, Márquez, Pérez, Chávez y Hernández, 2010).

Posteriormente se aspiró con una manguera la mayor parte del sobrenadante de ambas muestras y se obtuvo una solución concentrada de bromelina y etanol. Se determinó el rendimiento de la solución concentrada para cada tratamiento según la Ecuación 2.3 del Anexo II y se realizó un análisis de varianza en el programa Statgraphics.

En la solución concentrada que obtuvo mayor rendimiento se determinó la cantidad de sólidos y de proteína según la metodología descrita en AOAC (2005).

Se determinó si el etanol en las muestras influyó en la actividad enzimática, por lo que se calculó el porcentaje de variación de la actividad enzimática según la Ecuación 2.4 del Anexo II y se calculó la relación de solventes que se obtuvo al trabajar con soluciones que usan como solvente agua respecto a las que usan etanol y agua según la Ecuación 2.5 del Anexo II.

Para obtener esos datos se prepararon las siguientes soluciones:

- a) Bromelina con agua destilada
- b) Bromelina con una mezcla etanol: agua proporción 2:1 (w: w)

La bromelina que se utilizó fue la obtenida en el mejor tratamiento de secado. El proceso de secado será descrito posteriormente.

Las muestras de bromelina fueron disueltas al mismo porcentaje de sólidos presentes en las soluciones concentradas de bromelina y etanol, y se realizó el análisis de actividad enzimática para cada muestra.

Con la ayuda del programa Statgraphics, se introdujeron los resultados obtenidos y se determinó mediante un análisis de varianza si existió diferencia significativa para la actividad enzimática al variar el pH de la mezcla permeado: etanol.

2.4 ANÁLISIS DEL EFECTO DE SECADO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar el efecto del secado sobre la actividad enzimática de las muestras, se prepararon soluciones encapsulantes con 25 % de sólidos, en las que se utilizaron goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes. Se realizaron 2 formulaciones en las que las proporciones goma arábica: maltodextrina fueron 70:30 y 30:70.

Para preparar la emulsión final se pesaron primero todos los constituyentes y se procedió de la siguiente manera:

- a) Para la solución encapsulante MD: GA proporción 70: 30 (w: w): Primero se disolvió la goma arábica con agua a 65 °C en proporción 1:2 w: w y en otro recipiente se disolvió la maltodextrina con el agua restante.
- b) Para la solución encapsulante MD: GA proporción 30: 70 (w: w): Primero se disolvió la maltodextrina con agua a 65 °C en proporción 1:2 w: w y en otro recipiente se disolvió la goma arábica con el agua restante.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente ambas soluciones. Una vez frías se adicionó la solución concentrada de bromelina a la solución de goma arábica y se agitó durante 5 min, posteriormente se adicionó la solución de maltodextrina

y se volvió a agitar durante 5 min hasta obtener una emulsión uniforme (Cuaspud, 2015, p.33).

Las cantidades que se adicionaron para formar la emulsión final se encuentran en el Anexo III.

La emulsión final se hizo para obtener una proporción 1:1 (solución encapsulante: solución concentrada de bromelina). Las emulsiones obtenidas se secaron por los siguientes métodos:

a) Atomización: Las emulsiones preparadas en proporción maltodextrina: goma arábica se secaron mediante las condiciones de operación descritas en la Tabla 2.4

Tabla 2.4. Condiciones de operación del secado por atomización

Condiciones	Procedimiento 1	Procedimiento 2	Procedimiento 3
Temperaturas de entrada (aire)	100 °C	130 °C	130 °C
Temperaturas de salida (aire)	95 °C	120 °C	120 °C
Proporción MD:GA (w: w)	70:30	70:30	30:70
Porcentaje de sólidos	25 %	25 %	25 %
Flujo de alimentación	600 mL /h	600 mL /h	600 mL /h

MD: Maltodextrina /GA: Goma arábica

El procedimiento de secado se encuentra descrito en la Figura 2.5. Todos los ensayos de las emulsiones se hicieron por duplicado.

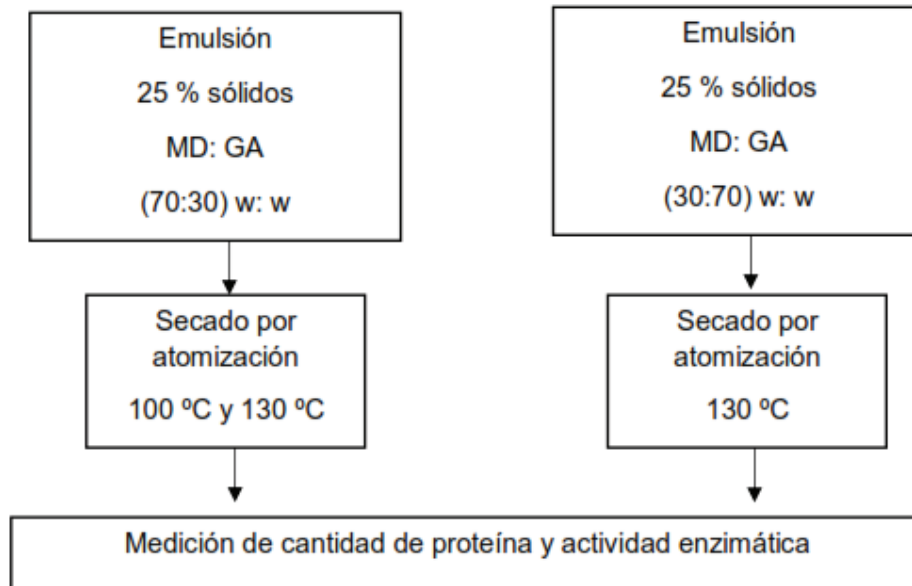


Figura 2.5. Condiciones de las muestras secadas por atomización

El mejor tratamiento fue aquel cuya temperatura y proporción de agente encapsulante presentó el mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática.

b) Liofilización: Primero se colocó la solución concentrada de bromelina en el rotavapor a 40 °C y 125 rpm hasta eliminar el etanol. Con la solución restante se preparó la emulsión en proporción maltodextrina: goma arábica 70:30 w: w.

La mezcla se llevó al congelador durante 12 horas y posteriormente se colocó en la bandeja del liofilizador STOKES hasta que el peso de la bandeja fue constante. El procedimiento se describe en la Figura 2.6.

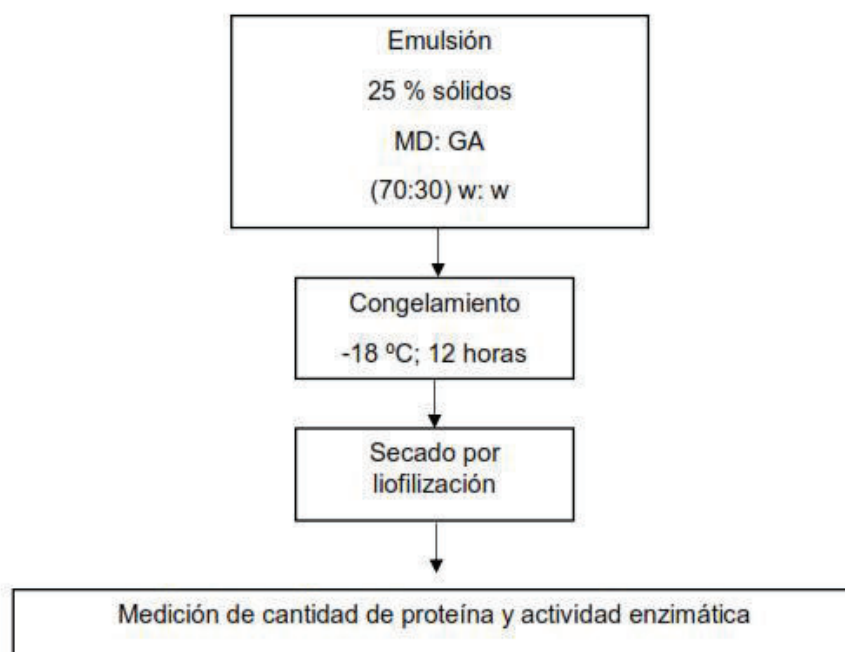


Figura 2.6. Condiciones de las muestras secadas por liofilización

En las muestras secadas por atomización y liofilización se analizó la humedad y porcentaje de proteína (AOAC, 2005), además se determinó el rendimiento del secado según la Ecuación 2.6 del Anexo II. La actividad enzimática se realizó según el método descrito en Clavijo et al., (2012) y se determinó el efecto del secado en la variación de la actividad enzimática de la muestra.

Para realizar el análisis de actividad enzimática previamente se realizó una solución con la bromelina seca (obtenida por atomización y liofilización) en el mismo porcentaje de sólidos calculados en la solución concentrada de bromelina.

En los resultados de los análisis de humedad y rendimiento se realizó un análisis de varianza en el programa Statgraphics Centurión XVI y se determinó si existió diferencia significativa para el tipo de secado.

Se eligió como mejor tipo de secado a aquel que presentó mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática.

Finalmente, el procedimiento (proporción de agente encapsulante y tipo de secado) cuya muestra tuvo mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática fue usado como método de secado para las dos fracciones restantes.

2.5 EVALUACIÓN DE LA BROMELINA EXTRAÍDA DE DIFERENTES RESIDUOS DE PIÑA

En las dos fracciones restantes se realizó la extracción, precipitación y secado de la bromelina aplicando el mejor proceso de extracción usado y pretratamiento, pH, proporción de agente encapsulante (MD: GA) y tipo de secado definidas en los acápites anteriores. Se analizó el porcentaje de proteína y la actividad enzimática.

Previamente se realizó una solución con la bromelina seca en el mismo porcentaje de sólidos calculados en la solución concentrada.

Para el proceso de precipitación, el valor de la actividad enzimática se multiplicó por la relación obtenida entre las muestras de bromelina con agua y etanol agua calculada en el acápite 2.3.

El análisis de porcentaje de proteína y actividad enzimática de cada muestra fue realizada por duplicado.

Con la ayuda del programa Statgraphics, se introdujeron los resultados obtenidos y se realizó un análisis de varianza para determinar si existió diferencia significativa para el porcentaje de proteína y actividad enzimática al variar la fracción de residuo de las muestras secas.

A partir del análisis estadístico se determinó qué fracción de residuo presentó mayor porcentaje de proteína y actividad enzimática.

- **Porcentaje de proteína teórica y experimental**

Se realizó un balance de masa para determinar el porcentaje teórico de la proteína extraída en cada uno de los procesos descritos en los acápites anteriores asumiendo que la pérdida en cada proceso de extracción fue cero y comparar si el porcentaje de proteína experimental fue similar con respecto al valor obtenido teóricamente.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE PIÑA

Cada una de las muestras de jugo obtenidas a partir de los residuos molidos y prensados de las fracciones del procesamiento de piña (cáscara, corazón y bagazo) fueron analizadas para determinar pH, humedad, °Brix, acidez y conductividad. Los resultados obtenidos a partir de estas pruebas se encuentran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Caracterización de cáscara, bagazo y corazón de piña

	Cáscara	Corazón	Bagazo
pH	3,90 ± 0,09	4,02 ± 0,10	4,08 ± 0,11
Humedad	85,57 ± 1,00	88,56 ± 1,25	87,2 ± 0,75
°Brix	7,13 ± 0,76	7,43 ± 0,4	10,55 ± 0,6
Acidez	0,35 ± 0,05	0,44 ± 0,10	0,63 ± 0,10
Conductividad	2180 ± 0,48	2150 ± 0,74	2160 ± 0,75

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 4)

Los valores de °Brix y acidez según la norma NTE INEN 1836 para piña en estado fresco son de 11 a 17 °Brix y 0,9 %, respectivamente. Los valores obtenidos en las muestras son cercanos a los indicados en la norma, por lo que el bagazo conserva características similares a las de la pulpa antes de su procesamiento.

En el análisis de los valores de humedad existió diferencia significativa entre las fracciones de piña ($p < 0,05$), la humedad de los residuos de piña se encuentran entre el 85 al 88 %, siendo estos resultados similares a los reportados en López et al., (2014), donde la humedad se encontró entre el 80 y 85 % (p. 385)

Para el caso del corazón y bagazo no existe una normativa que especifique el rango en el cual se deben encontrar los valores de pH, °Brix, acidez y

conductividad por lo que solo se realizó un análisis estadístico entre las muestras de las diferentes fracciones.

En los valores de pH, °Brix, acidez y conductividad para las tres fracciones existió diferencia significativa sobre la fracción de residuo, obteniendo un p-valor < 0,05.

Los valores obtenidos en la Tabla 3.2 muestran la actividad enzimática y el porcentaje de proteína obtenidos experimentalmente en cada una de las fracciones de residuo del procesamiento de piña.

Tabla 3.2. Porcentaje de proteína y actividad enzimática de los residuos obtenidos del procesamiento de piña

Fracción	Porcentaje de Proteína (%)	Actividad enzimática (μmol /min mL)
Bagazo	0,90 ± 0,04	166,67 ± 0,12
Corazón	0,80 ± 0,07	130,65 ± 0,19
Cáscara	0,30 ± 0,05	126,41 ± 0,19

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 4)

Para la actividad enzimática, los valores reportados para el corazón y la cáscara fueron similares, mientras que para el bagazo la actividad enzimática fue mayor.

La actividad enzimática específica del bagazo y el corazón fueron similares, mientras que para la cáscara fue mayor (p < 0,05), sin embargo para elegir la fracción con la cual se continuó el proceso de extracción se eligió a la que presentó mayor actividad enzimática total ya que la proteína de la cáscara no fue de naturaleza proteolítica.

Chaurasiya y Hebbar (2013) indicaron que el porcentaje de proteína presente en la pulpa de la piña es 1,27 % mientras que el bagazo presenta un 0,9 %, esto se debe a que luego del despulpado, parte de la proteína presente en la piña se encuentra en el jugo obtenido (p. 94).

En la gráfica de medias de la actividad enzimática de la Figura 3.1 indica que existe homogeneidad entre las muestras de cáscara y corazón, por lo que sí existió diferencia significativa entre el bagazo con respecto al corazón y la cáscara.

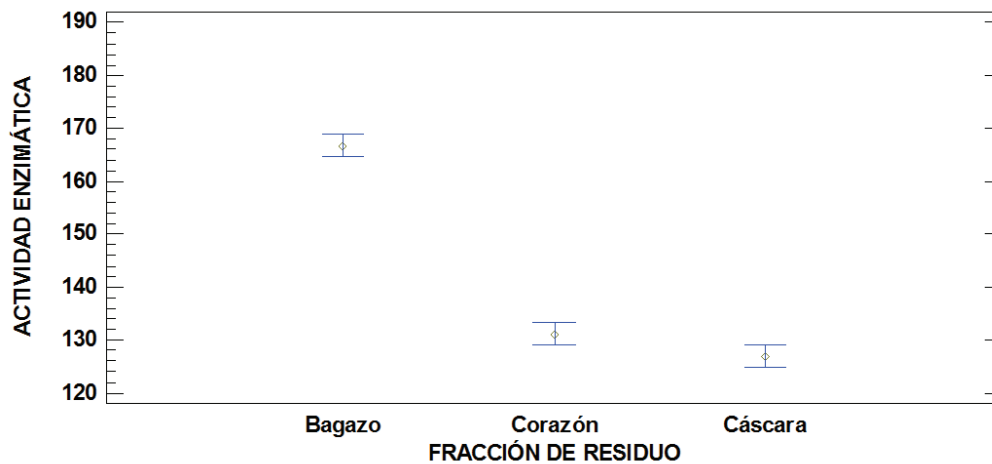


Figura 3.1. Gráfico de medias para la actividad enzimática a 30 °C de cada uno de los residuos del procesamiento de piña

Para el porcentaje de proteína, en la Figura 3.2 se observa que sí existió diferencia significativa entre las tres fracciones de piña, sin embargo, como entre las muestras que presentaron mayor porcentaje de proteína no existió diferencia significativa, se eligió la fracción con el mayor valor la cual fue el bagazo.

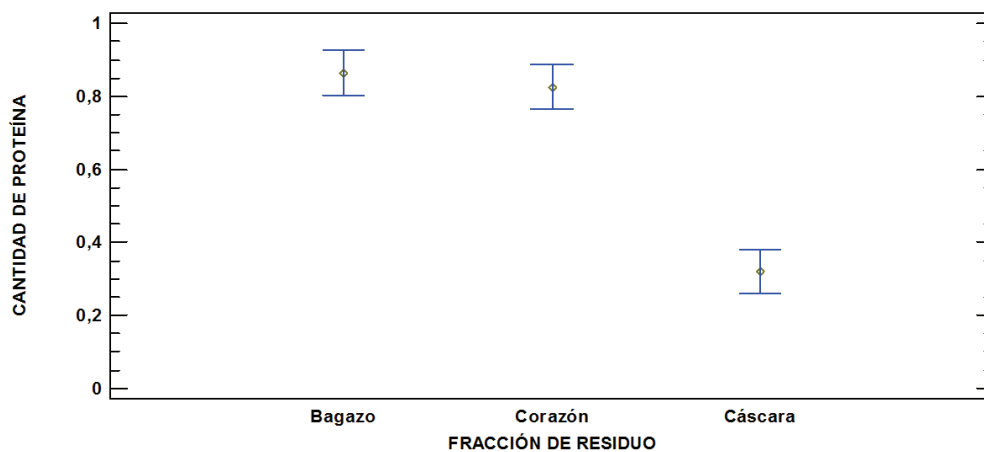


Figura 3.2. Gráfico de medias para el porcentaje de proteína por el método Kjeldahl de cada uno de los residuos del procesamiento de piña

Para ambas variables de respuesta (porcentaje de proteína y actividad enzimática), el bagazo fue la fracción que presentó el mayor valor, por lo que fue elegida para continuar el proceso de extracción.

3.2 APLICACIÓN DE DIFERENTES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ENZIMAS

3.2.1 EFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS EN LA EXTRACCIÓN DE BROMELINA

Inicialmente se analizó el efecto del uso o no de pretratamiento enzimático sobre el rendimiento de los extractos. Los resultados se observan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Rendimiento de jugo obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción

Método de extracción	Pretratamiento	Rendimiento jugo (%)
Solo prensado	No	57 ± 0,43
	Sí	77 ± 0,35
Molino Coloidal	No	73,5 ± 0,36
	Sí	82 ± 0,27
Punta ultrasónica	No	53 ± 0,75
	Sí	66 ± 0,23
Baño ultrasónico	No	57 ± 0,74
	Sí	77,5 ± 0,95

$\bar{X} \pm \sigma$ (n = 2)

Al utilizar pretratamientos enzimáticos combinados con diferentes procesos de extracción, se observa que el rendimiento aumenta hasta en un 30 % con respecto a la muestra en la cual solo se utilizó la prensa. Este valor es similar al reportado por Bisswanger (2014), quien comparó el rendimiento del extracto en el que se utilizó un coctel enzimático de xilanasas y prensado con respecto al tratamiento en el cual solo se realizó el prensado de la muestra (pp. 43-46).

Al emplear solamente procesos de extracción, en casi todas las muestras el rendimiento del extracto obtenido a partir del bagazo fue similar ($p > 0,05$) al igual que cuando se utilizó el pretratamiento enzimático.

Al usar el molino coloidal junto con el coctel enzimático, el rendimiento aumentó aproximadamente en un 9 % comparado con la muestra que solo se procesó en el molino. Esta es la menor diferencia que existió entre un mismo proceso de extracción, esto pudo deberse a que no existió degradación de la membrana celular con el uso de enzimas o que el uso de molino coloidal permitió por sí solo una mayor ruptura de las paredes celulares, aumentando así el rendimiento del extracto.

Al usar el equipo de ultrasonido y el coctel enzimático, el rendimiento del jugo aumentó de un 15 a un 20 % con respecto al tratamiento en el cual solo se empleó ultrasonido. Según Lieu y Le (2009), el rendimiento al combinar el equipo de ultrasonido y el coctel enzimático es de un 10 a un 20 % mayor que el tratamiento en el cual solo se empleó el equipo de ultrasonido (p. 273). Los resultados obtenidos en este tratamiento son similares a los citados.

El rendimiento de los tratamientos con ultrasonido y enzima fue mayor al 24 % cuando se utiliza el baño ultrasónico y 13 % cuando se utilizó la punta ultrasónica, comparadas con las muestras sometidas únicamente al ultrasonido (Bedolla et al., 2004, p. 90).

Al usar el baño ultrasónico se obtuvo un mayor rendimiento de jugo ($p < 0,05$), probablemente porque la vibración en el baño es más homogénea comparado con la punta ultrasónica.

La caracterización de los extractos obtenidos a partir de los diferentes métodos de extracción y el uso o no de un pretratamiento enzimático se observan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Caracterización de los tratamientos variando el método de prensado y el uso de enzima

Método de extracción	Pretratamiento	pH	°Brix	Acidez	Conductividad
Solo prensado	No	4,30 ± 0,11	10,10 ± 0,42	0,60 ± 0,12	2165 ± 1,12
	Sí	4,36 ± 0,13	8,20 ± 0,55	0,48 ± 0,14	2150 ± 0,890
Molino Coloidal	No	4,30 ± 0,11	6,70 ± 0,48	0,42 ± 0,13	2160 ± 0,990
	Sí	4,24 ± 0,12	5,80 ± 0,43	0,32 ± 0,11	2150 ± 0,770
Punta ultrasónica	No	4,14 ± 0,14	7,00 ± 0,51	0,41 ± 0,11	2155 ± 0,950
	Sí	4,24 ± 0,12	5,90 ± 0,60	0,37 ± 0,15	2140 ± 0,880
Baño ultrasónico	No	4,21 ± 0,15	6,90 ± 0,48	0,39 ± 0,13	2145 ± 1,13
	Sí	4,41 ± 0,13	6,10 ± 0,42	0,35 ± 0,10	2135 ± 0,980

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=4)

El pH en cada uno de los extractos obtenidos fue similar, por lo que el uso del pretratamiento enzimático no altera este valor. Pese a que los valores de °Brix, acidez y conductividad fueron similares para todas las muestras se observa que los valores son ligeramente mayores en las muestras en las cuales no se utilizó el pretratamiento enzimático. Según Demir et al., (2001), al emplear pretratamientos enzimáticos en las muestras se reduce el porcentaje de sólidos solubles y disminuye la acidez de los jugos (p. 275).

3.2.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y PORCENTAJE DE PROTEÍNA

Los valores de la actividad enzimática para cada uno de los extractos se observan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Actividad enzimática a 30 °C de jugo obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción

Proceso de extracción	Pretratamiento	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática
Solo prensado	No	190,68 \pm 0,44	113,3 \pm 0,47
	Sí	86,86 \pm 0,19	51,98 \pm 0,21
Molino Coloidal	No	495,06 \pm 0,42	296,80 \pm 0,37
	Sí	123,59 \pm 0,50	74,08 \pm 0,45
Punta ultrasónica	No	151,13 \pm 0,44	90,52 \pm 0,42
	Sí	120,76 \pm 0,13	72,33 \pm 0,15
Baño ultrasónico	No	74,86 \pm 0,13	44,72 \pm 0,14
	Sí	39,41 \pm 0,08	23,62 \pm 0,09

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2)

La actividad enzimática en la mayoría de los casos disminuyó respecto a la actividad medida en la materia prima inicial, sin embargo, aumentó en ciertos casos como en los extracto obtenidos mediante solo prensado y molino coloidal, ambos sin pretratamiento enzimático. Además, todas las muestras de jugo del bagazo de piña pretratadas con coctel enzimático tuvieron una menor actividad enzimática y menor porcentaje de recuperación de actividad enzimática, comparadas con las que no fueron pretratadas. Esto pudo deberse a que el coctel enzimático pudo actuar como un inhibidor que impidió la unión del complejo enzima- sustrato, o como agente lítico, y provocó la destrucción espontánea de las células.

Para determinar la actividad enzimática de los extractos, se esperaría que la muestra que tuvo mayor actividad enzimática sea aquella que tuvo mayor porcentaje de proteína, sin embargo esto no ocurre siempre porque del 25 a 30 % de los compuestos nitrogenados son proteína, y de este porcentaje el 80 % tiene actividad enzimática proteolítica y corresponde a la bromelina (80 %), comasaína (15 %) y ananaína (5 %) (Mondragón, Julia, Barba y Jarque, 2013, p. 159). El 20 % restante corresponde a enzimas sin actividad proteolítica como fosfatasas, glicoxidasas, peroxidadas, y otros (De Lencastre et al., 2015, p. 3).

La actividad enzimática específica mayor fue para el método de extracción de molino coloidal, esta muestra tuvo la mayor actividad enzimática total por lo que la proteína extraída fue de origen proteolítico. La tendencia de los valores de actividad específica fue similar, siendo mayor para los métodos de extracción con mayor actividad enzimática y menor para los que tuvieron menor actividad enzimática total.

Para el análisis estadístico se observa en la Figura 3.3 que no existió homogeneidad entre las muestras procesadas mediante punta ultrasónica y en la que no se aplicó ningún proceso de extracción, por lo que sí existió diferencia significativa entre los procesos de extracción sobre la actividad enzimática de los extractos.

En la Figura 3.4 se observa que sí existió diferencia significativa sobre la actividad enzimática de los extractos.

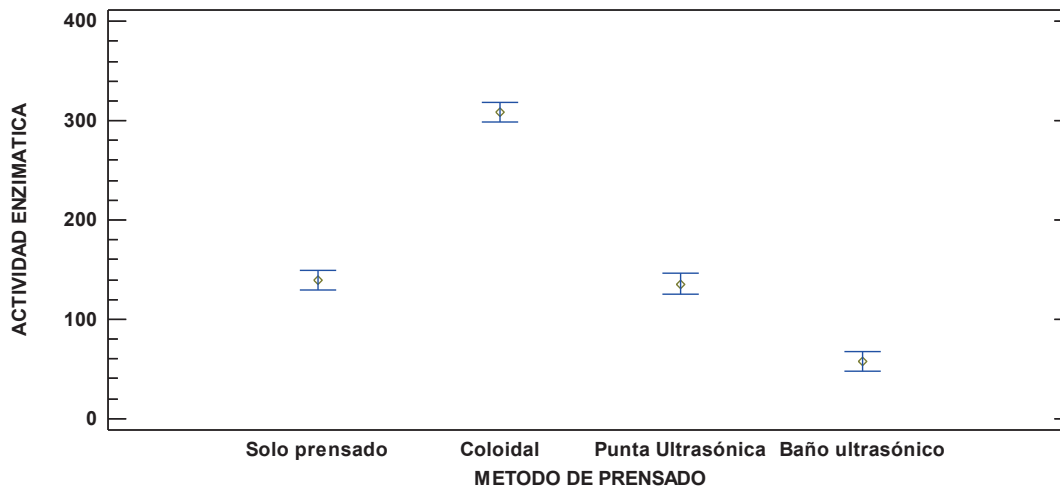


Figura 3.3. Gráfico de medias para determinar el efecto del tipo de extracción sobre la actividad enzimática

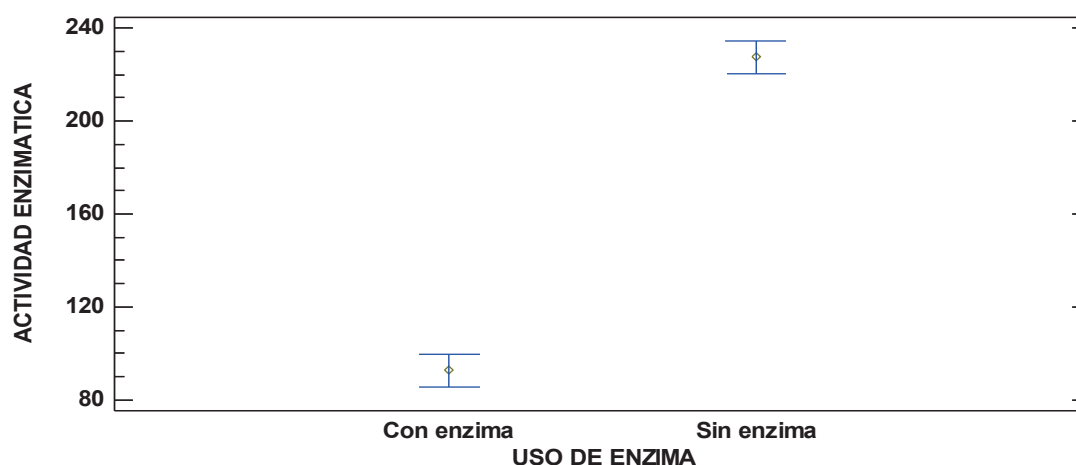


Figura 3.4. Gráfico de medias para determinar el efecto del uso o no de un coctel enzimático sobre la actividad enzimática

El menor porcentaje de recuperación de actividad enzimática fue para el proceso de baño ultrasónico con enzima (23,62 %) y el mayor resultó para el proceso del molino coloidal sin enzima (296,80 %).

Con respecto al porcentaje de proteína, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Porcentaje de proteína del extracto obtenido del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción

Método de extracción	Pretratamiento	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína
Solo prensado	No	0,43 ± 0,08	41,50 ± 0,09
	Sí	0,30 ± 0,06	37,34 ± 0,07
Molino Coloidal	No	0,21 ± 0,04	14,70 ± 0,05
	Sí	0,13 ± 0,03	30,08 ± 0,04
Punta ultrasónica	No	0,20 ± 0,09	16,82 ± 0,08
	Sí	0,30 ± 0,01	32,40 ± 0,02
Baño ultrasónico	No	0,30 ± 0,08	19,04 ± 0,07
	Sí	0,23 ± 0,05	40,19 ± 0,04

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2)

Solamente para el proceso de extracción punta ultrasónica con tratamiento enzimático se obtuvo mayor porcentaje de proteína en la muestra por lo que el uso del coctel enzimático probablemente no ayudó a liberar la proteína de la fibra del bagazo.

Para la fibra obtenida a partir del bagazo, el porcentaje de proteína se observa en el Tabla 3.7

Tabla 3.7. Porcentaje de proteína de la fibra obtenida del bagazo mediante el uso o no de un pretratamiento enzimático y diferentes procesos de extracción

Método de extracción	Pretratamiento	Porcentaje de proteína (%)
Solo prensado	No	1,37 ± 0,33
	Sí	1,59 ± 0,42
Molino Coloidal	No	1,50 ± 0,20
	Sí	2,83 ± 0,12
Punta ultrasónica	No	1,29 ± 0,76
	Sí	1,18 ± 0,35
Baño ultrasónico	No	1,72 ± 0,13
	Sí	1,19 ± 0,98

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2)

El porcentaje de proteína presente en la fibra fue similar en todos los casos, el mayor valor de proteína fue para el proceso de extracción con molino coloidal con pretratamiento enzimático y el menor fue para la punta ultrasónica con pretratamiento enzimático.

Según De Lencastre et al., (2015), parte del porcentaje de proteína presente en la fibra resultante de la extracción del jugo de piña puede corresponder a compuestos nitrogenados de naturaleza no proteolítica (p. 7).

Para el análisis estadístico del porcentaje de proteína, se observa en la Figura 3.5 que no existió diferencia significativa entre los procesos de extracción sobre

el porcentaje de proteína, mientras que para los demás procesos de extracción sí existió diferencia significativa.

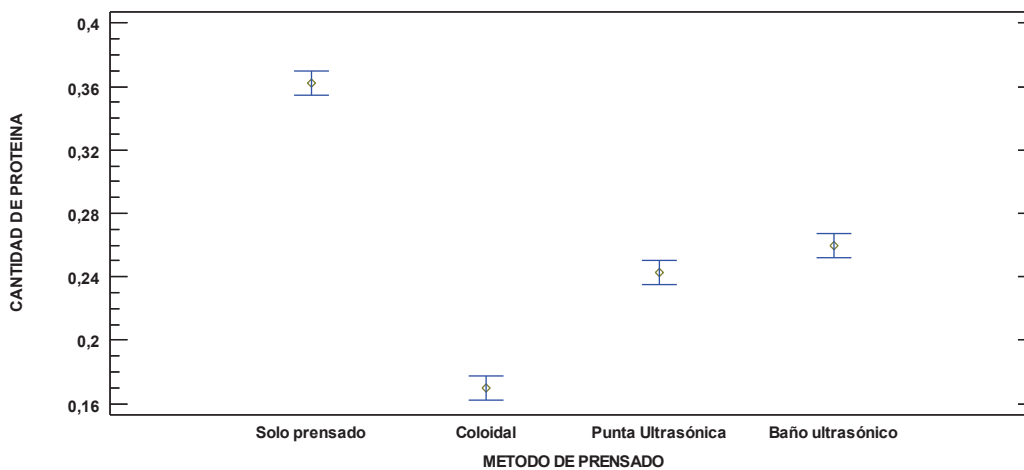


Figura 3.5. Gráfico de medias para determinar el efecto del tipo de extracción sobre el porcentaje de proteína

En el mismo análisis de porcentaje de proteína se observa en la Figura 3.6 que no existió homogeneidad entre los pretratamientos enzimáticos, por lo que sí existió diferencia significativa entre el uso o no de pretratamientos enzimático sobre el porcentaje de proteína de los extractos.

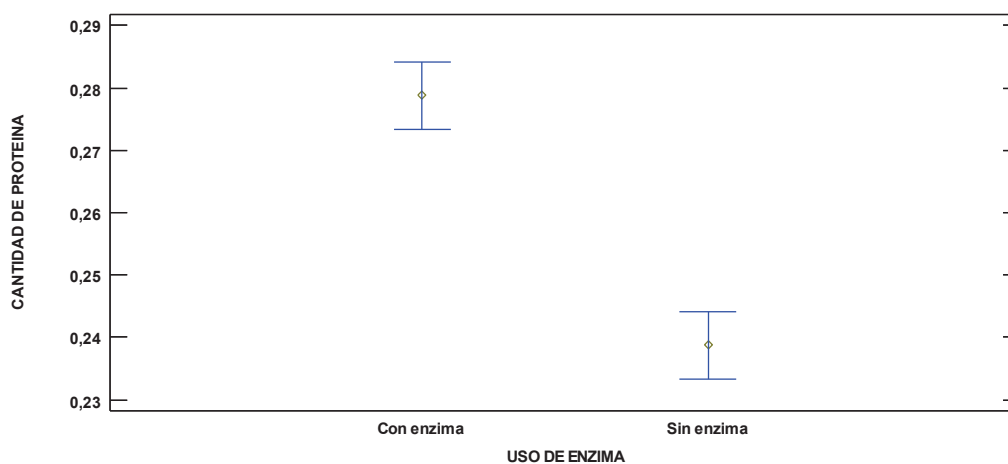


Figura 3.6. Gráfico de medias para determinar el efecto del uso o no de un coctel enzimático sobre el porcentaje de proteína

El proceso con mayor porcentaje de recuperación de proteína fue en el que no se aplicó ningún método de extracción y no se aplicó ningún pretratamiento.

Aunque existió mayor porcentaje de proteína en un extracto determinado, esto no implica que sea de naturaleza proteolítica (Demir et al., 2001, p.276) por lo que se eligió como la mejor muestra para continuar con el proceso de purificación a aquella que presentó mayor actividad enzimática, esta fue con el uso del molino coloidal sin enzima.

3.3 PURIFICACIÓN DE LA BROMELINA

3.3.1 MICROFILTRACIÓN

La filtración tangencial se realizó con el objetivo de concentrar en el permeado la proteína presente en el jugo de piña en base en el peso molecular de la bromelina que es 35 000 Da (Clavijo et al., 2012, p. 45). Por esta razón se eligió una membrana de 0,2 μm que permitió el paso de la proteína e impidió el paso de sólidos insolubles (Coelho et al., 2012, p. 882).

En el proceso de microfiltración se obtuvieron dos fracciones:

- Permeado: Fracción en la cual se encontró la proteína de interés
- Retenido: Fracción en la cual se acumularon componentes cuyo tamaño de partícula fue superior a 0,2 μm .

El rendimiento obtenido tanto para el retenido como para el permeado se reportan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Rendimiento del permeado y retenido del jugo de piña microfiltrado a 25 °C y 4 psi

Fracción	Peso (kg)	Rendimiento (%)
Alimentación	12,90 ± 0,08	-
Permeado	10,50 ± 0,09	81,5 ± 0,11
Retenido	2,35 ± 0,10	18,5 ± 0,12

\bar{x} (n=2)

Según Lieu y Van Viet (2010) el rendimiento en el proceso de microfiltración con el uso de una membrana de 0,2 μm para el permeado fue aproximadamente del 82 % (p. 275), valor similar al obtenido experimentalmente.

En el transcurso del tiempo la membrana se taponó aumentando la presión de trabajo de 4 a 4,5 psi. También la temperatura se incrementó de 25 a 55 °C en 3 horas de trabajo. Esto se dio por la colmatación o ensuciamiento que se da por la acumulación de los sólidos insolubles que se depositan sobre la membrana, ocasionando el taponamiento de los poros, aumentando la presión de trabajo y reduciendo la velocidad en el flujo de alimentación.

El valor de la actividad enzimática y porcentaje de proteína del permeado se observa en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Porcentaje de proteína y actividad enzimática del permeado y retenido del jugo de bagazo de piña microfiltrado a 25 °C y 4 psi

Fracción	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación de proteína	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática
Alimentación	0,21 ± 0,04	-	495,06 ± 0,42	-
Permeado	0,20 ± 0,05	77,38 ± 0,07	253,53 ± 0,25	51,00 ± 0,20
Retenido		No se realizaron análisis de esta muestra		

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2)

Se midió una reducción de aproximadamente 50 % en la actividad enzimática de la bromelina con respecto a la alimentación como se observa en la Tabla 3.10.

Según Mondragón, Julia, Barba, Jarque et al., (2013) en la microfiltración se conserva el 80 % de la actividad enzimática (p. 163), sin embargo en este trabajo se midió un aumento en la temperatura de 30 °C, por lo que el porcentaje de recuperación de actividad enzimática fue de un 30 % menor a lo esperado. De Lencastre et al., (2015) observó que el porcentaje de daño de la actividad enzimática sigue una reacción de primer orden cuando la temperatura se encuentra entre 55 y 60 °C, reduciendo en un 30 % aproximadamente el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática. A temperaturas mayores a 70 °C la destrucción de la enzima ya no sigue el mismo modelo de reacción y se reduce aproximadamente un 60 % de la actividad enzimática de la muestra (pp. 8-10).

Con respecto a el porcentaje de proteína, el porcentaje de recuperación del permeado fue menor que el reportado por Hebbar, Sumana y Hemavathi (2010) quienes mostraron un porcentaje de recuperación del 92,4 %, mientras que para el retenido fue de 9,9 % (p. 1 013).

El permeado se conservó para para el proceso de precipitación y el retenido fue desechado.

3.3.2 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ETANOL POTABLE

La precipitación de proteínas se realizó con la adición de solventes polares y variando el pH. La solubilidad de las proteínas en la solución es reducida por el incremento de la concentración del agente precipitante y el cambio en el valor de la constante dieléctrica de la solución. El objetivo fue separar componentes proteicos de los no proteicos, encontrándose en el primer grupo las enzimas como la bromelina.

La baja temperatura es favorable para evitar la denaturación de proteínas porque se reduce la capacidad de penetración del solvente y la denaturación irreversible de las enzimas (Soares, Vaz, Correia, Pessoa y Carneiro, 2012, p. 389). Los

solventes comúnmente usados para este procedimiento son los alcoholes (Soares et al., 2014, p. 7).

El etanol fue elegido como solvente de trabajo, porque es económico y puede ser aplicado para la purificación de diferentes enzimas. Además, este solvente puede ser reciclado mediante una destilación simple, reduciendo así el impacto ambiental comparado con el que genera el uso de sulfato de amonio o ácidos (Soares et al., 2012, p. 390).

Según Martins et al., (2014), el proceso de precipitación con etanol potable (96%) en diferentes concentraciones duró aproximadamente 4 horas para evitar un excesivo daño en la estructura proteica (p. 785), sin embargo, se realizó este proceso por más tiempo ya que no se evidenciaba una reducción en la solubilidad de la muestra y por ende no se observó la presencia del precipitado.

Como se observa en la Figura 3.7, el precipitado en pH a 5,3 (A) fue de color blanco y se encontró como una nube difusa en la solución, por lo que la recuperación del precipitado fue compleja en comparación con el precipitado de la solución (B) el cual fue de color amarillo y se depositó en la parte inferior del recipiente que contuvo la solución.

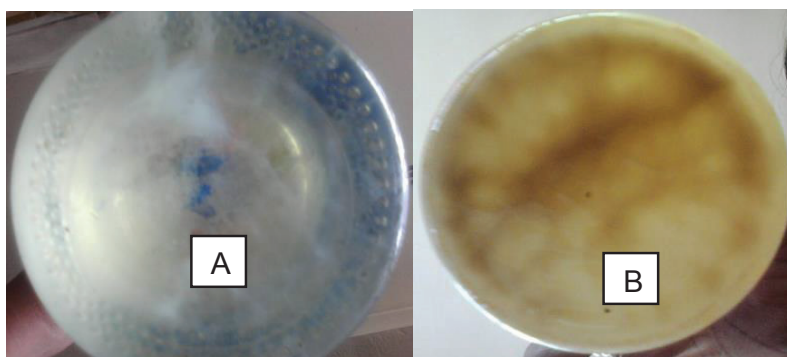


Figura 3.7. Precipitación del permeado del bagazo de piña a pH 5,3 (A) y pH 8,5 (B)

La muestra no pudo ser recuperada mediante centrifugación ya que el porcentaje de precipitado obtenido era muy bajo y se pegó a las paredes de los recipientes de la centrífuga.

Por esta razón se optó por separar la muestra mediante decantación. Con la ayuda de una jeringa y una manguera se eliminó la mayor cantidad de sobrenadante hasta obtener una solución concentrada de bromelina. El rendimiento del proceso de precipitación se observa en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Rendimiento de la precipitación de bromelina a pH 5,3 y pH isoelectrico (8,5) con NaOH 3N a 4 °C durante 7 días

pH	Permeado (kg)	Etanol añadido (kg)	Solución concentrada (precipitado) (kg)	Rendimiento (%)
5,3	3,00 ± 0,09	6,00 ± 0,11	0,01 ± 0,05	0,110 ± 0,02
8,5	6,80 ± 0,10	13,60 ± 0,11	5,00 ± 0,14	24,51 ± 0,13

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$

El rendimiento para la precipitación solamente con etanol fue menor al 1 % y fue muy diferente al rendimiento obtenido al precipitar la muestra a pH 8,5.

Según Deulgalonkar y Thora (2008), el rendimiento de la precipitación de bromelina con etanol potable en proporción permeado: etanol (2:1) w: w es de 10 %, mientras que para soluciones a pH isoelectrico el rendimiento es de aproximadamente 30 % (p. 8) por lo que los datos experimentales para el pH 5,3 fue un 80% menor que el valor reportado, mientras que para el pH isoelectrico, el rendimiento fue similar.

Los resultados de actividad enzimática para ambas soluciones concentradas de bromelina se encuentran en la Tabla 3.11.

Como las muestras fueron separadas mediante decantación, el sobrenadante obtenido fue una solución concentrada de bromelina y etanol para la cual se calculó la relación de la actividad enzimática en soluciones de bromelina seca, cuyos solventes fueron agua destilada y una mezcla etanol: agua (w: w) proporción 2:1.

Tabla 3.11. Actividad enzimática de las soluciones de bromelina con agua y agua con etanol

Solvente utilizado	Actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min mL}$)
Agua	190,68 \pm 0,11
Etanol y agua (2:1) w:w	140,54 \pm 0,12

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2)

El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática fue de 26,3 %. Según Bennuci, Liburd, Garzillo y Esti (2011), el porcentaje de inhibición de actividad enzimática para una muestra en proporción etanol:agua 2:1 es aproximadamente un 30 %, valor similar al obtenido experimentalmente (p. 1351). La relación de la actividad enzimática de la solución de bromelina con agua respecto a la solución de bromelina que usó como solvente etanol agua fue de 1,36. Los gráficos para el cálculo de la actividad enzimática de cada solución se encuentran en el Anexo IV.

Para ambas soluciones concentradas de bromelina (pH 5,3 y pH 8,5) se calculó la actividad enzimática, pero solo al valor de actividad enzimática de la solución concentrada a pH isoelectrico (8,5) se multiplicó por el valor de la relación de los solventes obtenidos porque las muestras secas de bromelina fueron disueltas al porcentaje de sólidos presentes en la solución concentrada. Los valores obtenidos se reportaron en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Porcentaje de proteína y actividad enzimática de las muestras precipitadas con etanol

	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática
Muestra Inicial	0,20 \pm 0,05	-	253,53 \pm 0,25	-
pH 5,3	ND	ND	111,58 \pm 0,28	45,09 \pm 0,25
pH 8,5	0,21 \pm 0,04	77,21 \pm 0,05	300,85 \pm 0,13	118,60 \pm 0,11

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2) / ND: No detectable

Pese a que la proteína estuvo 7 días en contacto con el etanol, el porcentaje de recuperación de actividad enzimática fue mayor al 100 %, por lo que no existió un daño severo en la estructura de la proteína.

En el estudio de Pinto et al., (2011) el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática en el precipitado obtenido mediante precipitación solo con etanol fue de 35,65 % y en el punto isoeléctrico fue del 75 % (p. 1 827), los valores obtenidos en el presente trabajo fueron superiores en un 40 %. La actividad enzimática específica fue similar en el permeado como en la solución concentrada de bromelina.

Con respecto al porcentaje de proteína el porcentaje de recuperación a pH isoeléctrico fue 41,6 % mayor comparado con el porcentaje de recuperación de proteína a pH 5,3 ya que las cargas positivas se igualan a las negativas haciendo que la solubilidad de la proteína disminuya, permitiendo una mayor precipitación de las proteínas. (Nelson y Cox, 2004, p. 85).

Para el análisis estadístico de la actividad enzimática en la gráfica de medias de la Figura 3.8 se observa que sí existió diferencia significativa entre ambos valores.

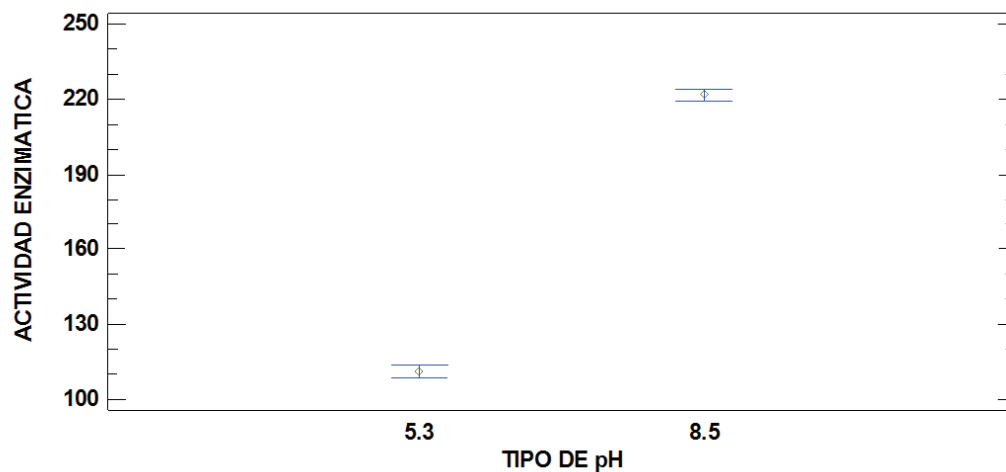


Figura 3.8. Análisis ANOVA de la actividad enzimática a pH 5,3 y 8,5 para el precipitado de piña

Como la actividad enzimática fue mayor para la muestra cuyo tratamiento de precipitación se realizó a pH isoelectrico (8,5) fue elegido para continuar con el proceso de secado.

3.4 SECADO

Después de la purificación de la bromelina, fue necesario desarrollar emulsiones para estabilizar e impedir la inactivación de la proteína. Ya que la bromelina es sensible a la temperatura se recurrió al uso de agentes encapsulantes para evitar la reducción de la actividad enzimática.

3.4.1 ATOMIZACIÓN

En la Tabla 3.13 se observa los valores obtenidos de humedad y rendimiento de las muestras secas.

Tabla 3.13. Humedad y rendimiento de las muestras secadas por atomización de la solución concentrada de bromelina a 100 y 130 °C con dos diferentes proporciones de encapsulante

Temperatura (°C)	Proporción MD/GA (w:w)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
100	70/30	12,30 ± 0,42	88,98 ± 0,38
130	70/30	8,05 ± 0,29	89,83 ± 0,29
130	30/70	9,87 ± 0,38	86,99 ± 0,37

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$ / MD: Maltodextrina; GA: Goma arábica

La humedad de las muestras secas fue del 8 al 12 %. Según Devakate et al., la humedad de las muestras secadas por atomización se encuentra en un rango de 5,2 a 6%, siendo la humedad de las muestras obtenidas experimentalmente aproximadamente 2 veces mayor. La muestra con mayor humedad fue la secada a 100 °C en proporción MD: GA 70:30 (w: w)

El rendimiento de las muestras obtenidas experimentalmente fue del 86 al 88 %, sin embargo, según Devakate et al., (2008) fue aproximadamente de un 73 % para muestras encapsuladas con maltodextrina con un 25 % de sólidos (p. 263).

El valor obtenido experimentalmente fue 15 % mayor que el reportado, pese a que una fracción de polvo seco se depositó en la tubería del atomizador y no pudo ser recuperado. La muestra con mayor rendimiento fue la secada a 130 °C en proporción MD: GA 70:30 (w: w).

Los valores obtenidos actividad enzimática y porcentaje de proteína se encuentran descritos en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Porcentaje de proteína y actividad enzimática de las muestras secadas por atomización de la solución concentrada de bromelina a 100 y 130 °C con dos diferentes proporciones de agente encapsulante

Muestra	Encapsulante MD:GA (w: w)	Temperatura de secado (°C)	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad Enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática
Solución concentrada de bromelina	-	-	$0,21 \pm 0,04$	-	$300,85 \pm 0,13$	-
Solución concentrada + encapsulante	70:30	100	$0,63 \pm 0,10$	$89,65 \pm 0,12$	$178,67 \pm 0,24$	$59,38 \pm 0,22$
	70:30	130	$0,65 \pm 0,05$	$85,46 \pm 0,08$	$196,33 \pm 0,14$	$65,25 \pm 0,10$
	30:70	130	$0,62 \pm 0,09$	$87,24 \pm 0,08$	$62,43 \pm 0,11$	$20,75 \pm 0,12$

$\bar{x} \pm \sigma/ (n=2)$

Con respecto a la actividad enzimática, en las muestras que se secaron con mayor proporción de maltodextrina tuvieron porcentajes de recuperación del 60 al 65 %, siendo estos valores similares a los reportados por Devakate et al., (2008), donde el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática para las muestras encapsuladas con maltodextrina se encontró entre el 50 y 70 %. (p. 263).

Con respecto a el porcentaje de proteína, el porcentaje de recuperación al usar dos agentes encapsulantes fue mayor que el reportado por Quinde y Sánchez

(2013), donde el porcentaje de recuperación al encapsular la emulsión a 130 °C con goma arábica fue del 26 % (p. 6). Comparando con los valores obtenidos experimentalmente, el porcentaje de recuperación de proteína fue del 85 a 90 %, obteniendo un porcentaje de recuperación aproximadamente tres veces mayor.

Según Abadio et al., (2004), al encapsular la emulsión a 130 °C con maltodextrina, el porcentaje de recuperación del porcentaje de proteína fue del (p. 285). Al comparar con los valores obtenidos experimentalmente, el porcentaje de recuperación fue aproximadamente 20 % mayor.

Ya que para el porcentaje de proteína y actividad enzimática el tratamiento con los mayores valores fue a 130 °C con la proporción MD: GA 70: 30 (w: w) se seleccionó como el mejor para el proceso de secado por atomización. Además esta proporción de agente encapsulante fue elegida para formar la emulsión que fue secada por liofilización.

3.4.2 LIOFILIZACIÓN

El secado por liofilización presenta ciertas ventajas sobre otros tipos de secado ya que las bajas temperaturas mantienen la estructura y el funcionamiento de las proteínas durante el proceso de deshidratación (Devakate et al., 2009, p. 261).

Antes de realizar la emulsión con el agente encapsulante, fue necesario retirar el etanol del precipitado con el uso del rotavapor, ya que impedía el congelamiento del producto, porque el punto de fusión del etanol es -118 °C (Abadio et al., 2004, p. 286) y la muestra fue congelada a -18 °C.

Para formar la emulsión se usó la proporción de encapsulante MD: GA 70:30 (w: w), se realizó una prueba de secado y se midió por duplicado el porcentaje de proteína y actividad enzimática de la muestra.

Los datos de porcentaje de proteína y actividad enzimática se reportaron en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Porcentaje de proteína, actividad enzimática y rendimiento de la muestra secada por liofilización de la solución concentrada de bromelina a 40 °C con una proporción de encapsulante

Encapsulante MD:GA (w: w)	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad Enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática	Rendimiento (%)
70 : 30	0,60 \pm 0,03	82,83 \pm 0,05	211,16 \pm 0,29	70,18 \pm 0,26	98,00

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$

Para la actividad enzimática el porcentaje de recuperación fue de 70,18 %. Según De Lencastre et al., (2015) el porcentaje de recuperación fue del 80 %. Comparando con los valores obtenidos experimentalmente se obtuvo un valor 10 % menor (p. 34).

La actividad enzimática específica fue menor para el tratamiento secado por atomización a 130 °C en proporción MD: GA 30:70, mientras que para las demás muestras los valores fueron mayores y similares entre sí. La muestra con mayor actividad enzimática específica fue la que tuvo la mayor actividad enzimática total.

El porcentaje de proteína recuperada fue del 82 % con el uso del agente encapsulante. Según Devakate et al., (2008, p. 263) fue del 87 % sin el uso de agente encapsulante. La muestra obtenida experimentalmente tuvo un porcentaje de recuperación 5 % menor.

Con los valores de porcentaje de proteína y actividad enzimática se realizó el análisis estadístico entre el mejor tratamiento secado por atomización con respecto al secado por liofilización para determinar mediante el análisis de la gráfica de medias y la obtención del valor p, si cada uno de los tipos de secado tuvieron o no diferencia significativa sobre la actividad enzimática y porcentaje de proteína.

Para el análisis estadístico de la actividad enzimática en la gráfica de medias de la Figura 3.9 se observa que sí existió diferencia significativa entre los dos tipos de secado.

Sin embargo, como el valor p fue cercano a 0,05 se tomaron en cuenta otros factores como el costo de los equipos, los cuales son mayores para el proceso de liofilización, además el tiempo de procesamiento de una muestra liofilizada fue aproximadamente 36 horas, mientras que el secado por atomización, duró 3 horas para la misma porcentaje de muestra por lo que se eligió como el mejor tratamiento el secado por atomización.

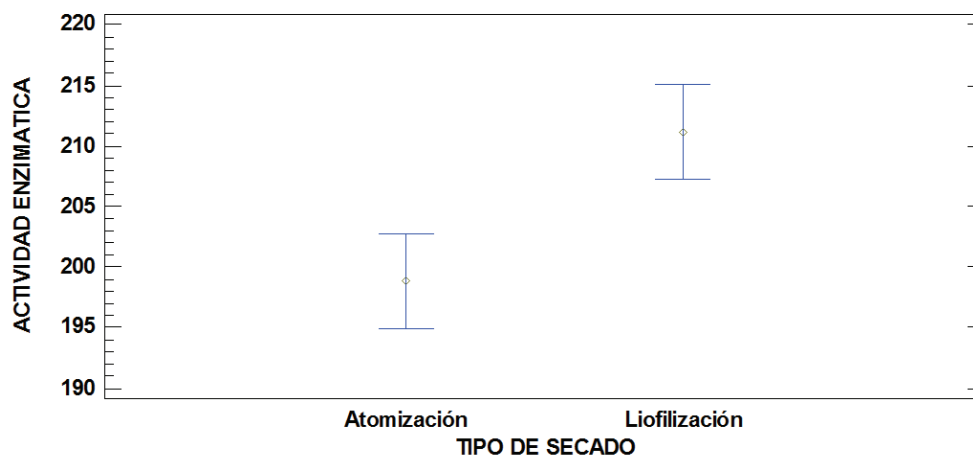


Figura 3.9. Análisis ANOVA de la actividad enzimática en función del tipo de secado para el bagazo de piña

Para el porcentaje de proteína en la gráfica de medias de la Figura 3.10 se observa que existió homogeneidad entre las muestras atomizadas y liofilizadas, además el p -valor $> 0,05$ por lo que no existió diferencia significativa entre los dos tipos de secado sobre el porcentaje de proteína. Ya que las muestras fueron estadísticamente iguales se eligió como el mejor tratamiento de secado a aquel que presentó un mayor valor de proteína, este fue el tratamiento secado por atomización.

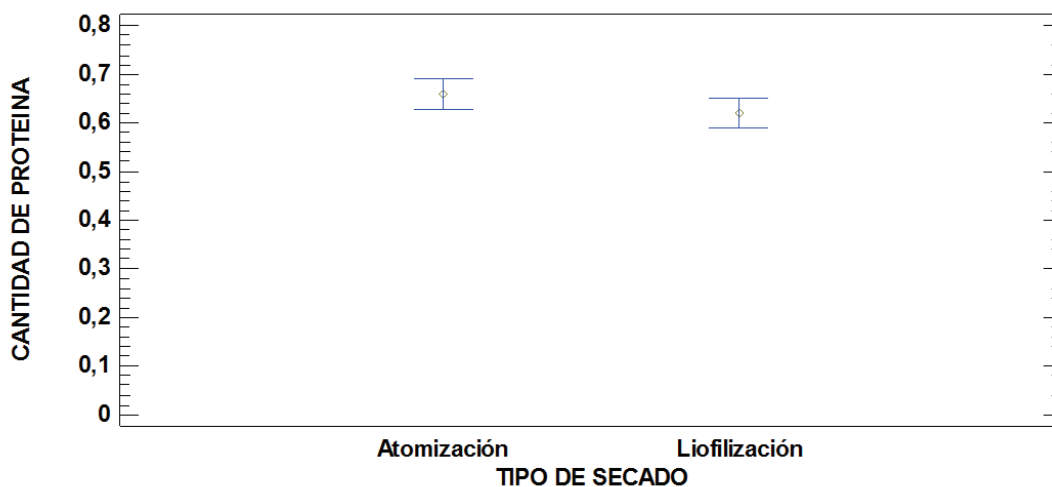


Figura 3.10. Análisis ANOVA del porcentaje de proteína en función del tipo de secado para el bagazo de piña

Por los resultados obtenidos para el porcentaje de proteína y actividad enzimática se escogió como el mejor proceso al secado por atomización a 130 °C con uso de maltodextrina y goma arábiga en proporciones 70:30 w: w. Este procedimiento fue usado para secar las dos fracciones de piña restantes.

3.5 EXTRACCIÓN DE BROMELINA DE DIFERENTES FRACCIONES DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE PIÑA

Como se indicó anteriormente, los residuos de piña se separaron en 3 fracciones: bagazo, cáscaras y corazones.

En base a los resultados obtenidos en la extracción de la bromelina del bagazo, se realizó la extracción en las cáscaras y corazones usando las condiciones de operación descritas en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16. Condiciones de operación seleccionadas para la obtención de bromelina

PROCESO	Tratamiento
Prensado	Coloidal sin enzima
Precipitado	pH isoelectrico
Secado	130 °C / 70 :30 MD:GA / atomización

La actividad enzimática de las muestras de corazón y bagazo no fueron calculadas nuevamente antes de iniciar el proceso de extracción porque según los análisis realizados por Sinche, (2009) la pérdida de la actividad enzimática de proteasas cuando son mantenidas en congelamiento es aproximadamente 2 % (p. 62).

Los resultados del % de humedad, rendimiento, porcentaje de proteína y actividad enzimática de la cáscara, corazón y bagazo se presentan en las Tablas 3.17, 3.18 y 3.19.

Tabla 3.17. Resumen del porcentaje de proteína y actividad enzimática del bagazo de piña con el mejor tratamiento

Proceso	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad enzimática (μmol /min mL)	% Recuperación actividad enzimática (*)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Muestra Inicial	0,90 ± 0,04	-	166,67 ± 0,12	-	-	-
Prensado	0,21 ± 0,04	14,70 ± 0,05	495,06 ± 0,42	296,80 ± 0,37	-	73,50 ± 0,36
Microfiltrado	0,20 ± 0,05	77,38 ± 0,07	253,53 ± 0,25	51,00 ± 0,20	-	81,50 ± 0,11
Precipitado	0,21 ± 0,04	77,21 ± 0,05	300,85 ± 0,13	118,60 ± 0,11	-	24,51 ± 0,13
Secado	0,65 ± 0,05	85,46 ± 0,08	196,33 ± 0,14	65,25 ± 0,10	8,05 ± 0,29	89,83 ± 0,29

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2) / (*) Respecto al proceso anterior

Tabla 3.18. Porcentaje de proteína y actividad enzimática del corazón de piña con el mejor tratamiento

Proceso	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática (*)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Muestra Inicial	0,80 \pm 0,97	-	130,65 \pm 0,19	-	-	-
Prensado	0,20 \pm 0,64	26,20 \pm 0,60	347,46 \pm 0,06	264,8 \pm 0,08	-	67,80 \pm 0,48
Microfiltrado	0,19 \pm 0,42	72,00 \pm 0,43	232,34 \pm 0,19	66,61 \pm 0,11	-	79,50 \pm 0,87
Precipitado	0,18 \pm 0,28	71,40 \pm 0,25	257,06 \pm 1,02	110,60 \pm 0,14	-	22,50 \pm 1,13
Secado	0,60 \pm 0,71	99,60 \pm 0,70	171,61 \pm 1,14	66,75 \pm 0,12	8,90 \pm 0,74	81,05 \pm 1,29

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2) / (*) Respecto al proceso anterior

Tabla 3.19. Porcentaje de proteína y actividad enzimática de la cáscara de piña con el mejor tratamiento

Proceso	Porcentaje de proteína (%)	% Recuperación proteína	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	% Recuperación actividad enzimática (*)	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Muestra Inicial	0,30 \pm 0,05	-	126,41 \pm 0,19	-	-	-
Prensado	0,16 \pm 0,02	59,25 \pm 0,03	185,03 \pm 0,44	145,70 \pm 0,40	-	71,40 \pm 0,49
Microfiltrado	0,14 \pm 0,03	70,13 \pm 0,02	110,88 \pm 0,19	59,35 \pm 0,22	-	81,00 \pm 0,36
Precipitado	0,18 \pm 0,02	80,67 \pm 0,04	168,79 \pm 0,33	152,23 \pm 0,28	-	20,92 \pm 0,39
Secado	0,60 \pm 0,04	94,80 \pm 0,03	185,73 \pm 0,38	110,03 \pm 0,35	9,10 \pm 0,51	81,05 \pm 0,49

$\bar{x} \pm \sigma$ (n=2) / (*) Respecto al proceso anterior

La humedad en todas las fracciones de residuo de piña fue similar y estuvo en el rango entre 8 y 9 % y existió diferencia significativa entre las tres fracciones de piña sobre la humedad.

Los rendimientos en los procesos de prensado, microfiltrado, precipitado y secado fueron similares para las tres fracciones de piña, en cada uno de los procesos y existió diferencia significativa entre las tres fracciones de piña sobre la variable de respuesta.

Para la actividad enzimática de la cáscara y el corazón, el proceso en el cual se recuperó mayor porcentaje de actividad enzimática fue en el prensado, seguramente porque la proteína fue liberada de las células mediante molienda y prensado, mientras que para la cáscara fue en el precipitado. Sin embargo, para la cáscara, la actividad enzimática fue un casi la mitad de valor de las otras dos fracciones.

Para las tres fracciones, la actividad enzimática decreció en el proceso de microfiltración. Se observa que para la cáscara, la actividad enzimática fue aumentando en cada uno de los procesos hasta llegar al secado, mientras que para las dos fracciones restantes la actividad enzimática solamente aumentó en el proceso de precipitación y decreció en el secado.

Para las muestras secas de bagazo, corazón y cáscara la actividad enzimática fue mayor en un 20 % comparada con las muestras iniciales.

El mayor valor de actividad enzimática específica (Anexo I) fue para la cáscara pese a que esta fracción no tuvo la mayor actividad enzimática total, por lo que parte de la proteína extraída no fue de origen proteolítico.

Para el análisis estadístico de la actividad enzimática en la gráfica de medias de la Figura 3.11 se observa que sí existió diferencia significativa entre las tres fracciones de piña siendo la fracción con mayor actividad enzimática el bagazo.

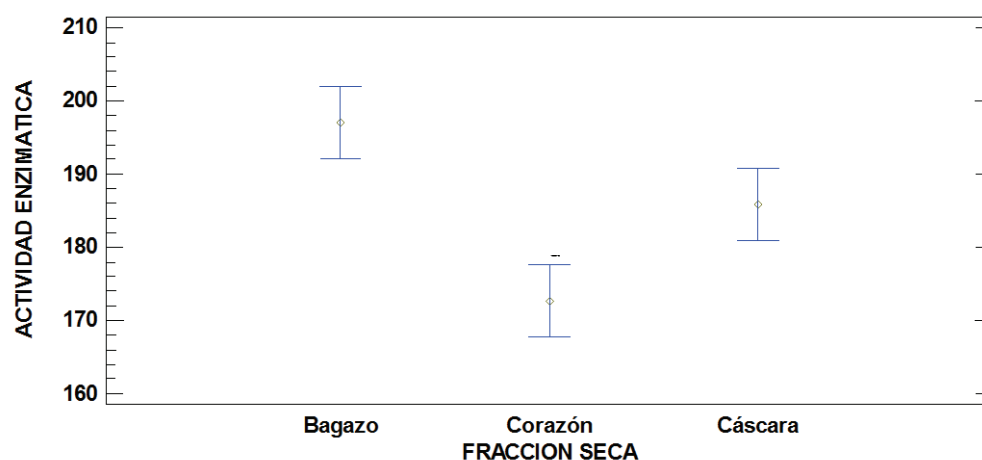


Figura 3.11. Análisis ANOVA de la actividad enzimática de las muestras secas en función de la fracción de piña

La actividad enzimática en cáscara y corazón fue similar y fue menor que la actividad reportada para el bagazo.

Para el corazón y la cáscara, los porcentajes de recuperación de proteína en cada uno de los procesos fueron similares excepto para:

- El secado, en el caso del corazón y la cáscara en donde se vio un incremento de alrededor del 20 % con respecto a la muestra seca obtenida del bagazo de piña, pero esto puede deberse a que siempre hay sólidos que se pegan en el equipo y no siempre se logra recuperar todo.
- En el prensado de la cáscara, en donde el porcentaje de recuperación aumentó casi al doble con respecto al observado en el bagazo y el corazón. Esto probablemente se debió a que las células de la cáscara se destruyen más fácilmente, lo que facilitó la extracción de las proteínas.

Para el análisis estadístico del porcentaje de proteína en la gráfica de medias de la Figura 3.12 se observa que no existió diferencia significativa entre las tres fracciones de piña sobre el porcentaje de proteína por lo que se eligió como la mejor fracción a aquella que presentó mayor porcentaje de proteína la cual fue el bagazo.

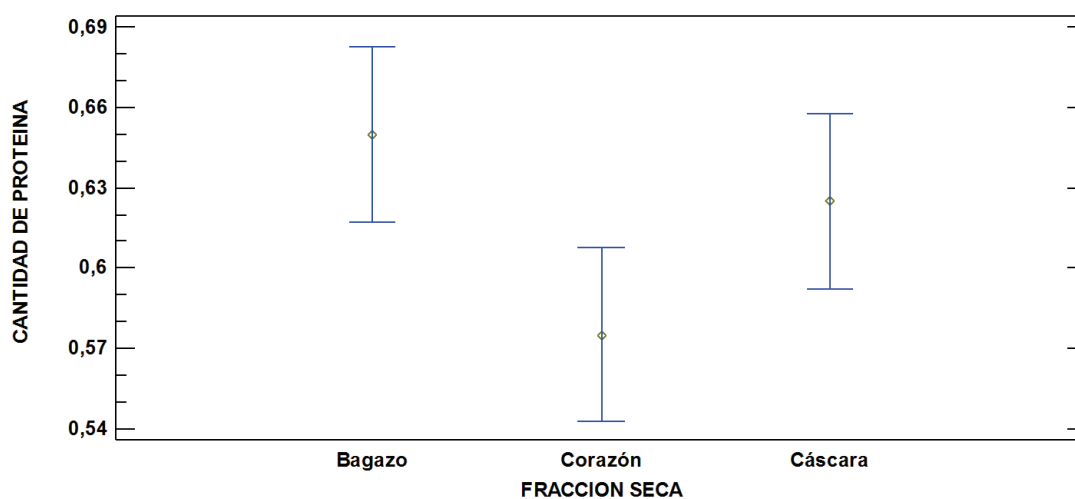


Figura 3.12. Análisis ANOVA del porcentaje de proteína de las muestras secas en función de la fracción de piña

Mediante el análisis estadístico realizado para el porcentaje de proteína y actividad enzimática de las diferentes fracciones de piña, se determinó que la mejor fracción fue el bagazo.

3.6 PORCENTAJE DE PROTEÍNA EXPERIMENTAL Y TEÓRICA EN CADA PROCESO

Una forma de conocer cuales debieron ser los valores teóricos del porcentaje de proteína en cada uno de los procesos, es realizar el balance de masa del proceso.

Los cálculos para los balances de masa del proceso de extracción de bromelina de cada una de las fracciones están en el Anexo V.

Los valores teóricos y experimentales obtenidos para el bagazo se muestran en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Porcentaje de proteína experimental y teórica obtenida en cada uno de los procedimientos para la extracción de bromelina a partir del bagazo de piña

Procedimiento	Porcentaje de proteína (%)	
	Experimental	Teórica
Cortado	0,90	0,90
Molienda	0,60	0,60
Prensado	0,21	0,21
Microfiltrado	0,20	0,20
Precipitado	0,21	0,27
Mezclado	0,11	0,14
Secado	0,70	0,94

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$

En el proceso de precipitación del bagazo de piña se recuperó solo el 77,77 % de la proteína teórica reportada, esto pudo deberse a una variación en el punto isoeléctrico de la muestra o a una separación defectuosa de la solución concentrada de bromelina y el sobrenadante.

Para la cáscara de piña el porcentaje de proteína teórica y experimental se observa en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Porcentaje de proteína experimental y teórica obtenida en cada uno de los procedimientos para la extracción de bromelina a partir de la cáscara de piña

Procedimiento	Porcentaje de proteína (%)	
	Experimental	Teórica
Cortado	0,30	0,30
Molienda	0,20	0,20
Prensado	0,16	0,16
Microfiltrado	0,14	0,14
Precipitado	0,18	0,23
Mezclado	0,09	0,12
Secado	0,60	0,84

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$

En la solución concentrada de bromelina se logró recuperar el 78,26 % del porcentaje de proteína teórica reportada, este valor fue 4 % mayor que el porcentaje de recuperación en el bagazo de piña por lo que el valor de pH fue más cercano al pH isoelectrico de la cáscara.

Para el corazón de piña, el porcentaje de proteína teórica y experimental se observan en la Tabla 3.22

Tabla 3.22. Porcentaje de proteína experimental y teórica obtenida en cada uno de los procedimientos para la extracción de bromelina a partir del corazón de piña

Procedimiento	Porcentaje de proteína (%)	
	Experimental	Teórica
Cortado	0,80	0,80
Molienda	0,53	0,53
Prensado	0,20	0,20
Microfiltrado	0,19	0,19
Precipitado	0,18	0,28
Mezclado	0,09	0,14
Secado	0,60	0,94

$\bar{x} \pm \sigma / (n=2)$

En el corazón de piña se logró recuperar el 64,29 % del porcentaje de proteína teórica en el proceso de precipitación, esto pudo deberse a que el pH isoelectrico para esta fracción de residuo es 7 (Mondragón et al., 2013, p. 395) .En el proceso de secado de las tres fracciones de residuo se recuperó aproximadamente el 75 % del porcentaje de proteína experimental, con respecto a la teórica.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. El mejor tratamiento para el proceso de extracción de bromelina de bagazo de piña fue en molino coloidal sin uso del coctel enzimático, precipitado a pH isoelectrico y secado en atomización a 130 °C en proporción MD: GA 70:30.
2. La actividad enzimática se redujo significativamente al utilizar un pretratamiento enzimático.
3. El uso del molino coloidal para reducir el tamaño de partícula, sin el uso del pretratamiento enzimático provocó el aumento de la actividad enzimática de la muestra en un 296,8 %.
4. El aumento de la temperatura en la microfiltración tangencial del extracto del bagazo redujo la actividad enzimática del permeado en un 50 %.
5. La precipitación en el punto isoelectrico (pH 8,5), tuvo un porcentaje de recuperación de actividad enzimática del 118,6 %, 3 veces superior a la precipitación realizada al pH del extracto (pH 5,3).
6. En el secado por atomización, la mayor recuperación de proteína y actividad enzimática se obtuvo usando como agente encapsulante emulsiones con maltodextrina en mayor proporción.
7. En el secado por atomización, la única fracción cuyo porcentaje de recuperación de actividad enzimática fue mayor al 100 % fue la cáscara.
8. La muestra secada por liofilización obtuvo mayor actividad enzimática que las muestras secadas por atomización.

9. Para las tres fracciones de residuos (bagazo, corazón y cáscara), el porcentaje de recuperación de proteína fue menor en el prensado, que en la microfiltración y precipitación.
10. Existió diferencia significativa sobre el porcentaje de proteína y actividad enzimática de las muestras secas obtenidas de cada una de las fracciones de los residuos del procesamiento de piña.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Realizar el análisis de las condiciones óptimas de prensado, precipitado y secado para el corazón y cáscara de la piña.
2. Analizar el porcentaje de pérdida de la actividad enzimática en función del tiempo al momento de realizar la precipitación con etanol potable.
3. Estudiar la estabilidad en el tiempo del polvo de bromelina obtenido mediante atomización y precipitación.
4. Realizar un análisis de la precipitación de proteínas con etanol recuperado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadio F., Domingues, A., Borges S. y Oliveira, V. (2004). Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice — effect of malt dextrin concentration and atomization speed. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 285–287. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.010>.
2. Agrocalidad (2015). Manual de Aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas de Producción de Piña. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/manuales-aplicabilidad/manual-pina.pdf> (Marzo, 2017).
3. Aguilar N. (2010). Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero. 20(2) ,1–12. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Córdoba, Veracruz México Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0124-81702010000200001&lng=es&nrm=is. (Marzo, 2017).
4. Andrade-mahecha, M. M., Morales-rodriguez, O. y Martinez-correa, H. A. (2011). Study of the extraction process of papain from latex of papaya (*Carica papaya* L.). *Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Tolima*, 60 (3), 217–224. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/30068/11/28818-169899-1-PB.pdf>. (Marzo, 2017).
5. AOAC (2005). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, 10(1), 4 -10.
6. Azarkan, M., Wuytswinkel, D. Van. (2003). Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of*

Cromatography, 790 (1), 229–238. [http://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00084-9](http://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00084-9).

7. Bala, M., Ismail, N. A., Mel, M., Jami, M. S., Jami, M. S., Mel, M. (2012). Bromelain Production : Current Trends and Perspective. Bioprocess and Molecular Engineering Research Unit, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Engineering, International Islamic University Malaysia. 65(11), 369–399. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/234077305_Bromelain_Production_Current_Trends_and_Perspective. (Marzo, 2017)
8. Balasundaram B; Harrison S; Bracewell D. (2009). Advances in product release strategies and impact on bioprocess desing. Trends in Biotechnology, 27 (8), 477 – 485. Doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.004>.
9. Bedolla S., Dueñas C., Esquivel I y Favela T. (2004). Introducción a la Tecnología de Alimentos, (2da. ed.), México, México, Limusa.
10. Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones. Grupo de Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca, 42(2), 227–237. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008. (Marzo, 2017).
11. Benucci, I. Liburdi, K, Garcillo, A y Esti, M. (2011). Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. Food Chemistry, 124(1), 1349-1353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.087>
12. Bertoluzzo, M., Bertoluzzo, S. y Rigatuso, R. (2008). Estudio cinético de la actividad proteolítica de la enzima ficina. Facultad de Ciencias

- Médicas - Universidad Nacional De Rosario, 20 (3), 243–245.
Recuperado de
<http://anales.fisica.org.ar/journal/index.php/analesafa/article/view/134>. (Marzo, 2017).
13. Bisswanger, H (2014). Enzyme Assay. Interfaculty Institute of Biochemistry, 1(6) ,41-55. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
14. Carrera J. (2016.). Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1 (1), 9-15. Recuperado de https://www.academia.edu/6125354/PRODUCCI%C3%93N_Y_APLICACI%C3%93N_DE_ENZIMAS_INDUSTRIALES_PRODUCTION_AND_APPLICATION_OF_INDUSTRIAL_ENZYMES_JORGE_ELI%C3%89CER_CARRERA_1_PALABRAS_CLAVE_RESUMEN. (Marzo, 2017).
15. Carvajal C; Márquez M; Pérez A; Chávez M; Hernández M. (2010). Caracterización cinética de un preparado semipurificado de bromelina para uso antitumoral. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 15 (2), 27 - 41.
16. Chaurasiya, R. y Hebbar, H. (2013). Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. Academy of Scientific and Innovative Research, India, 111(1), 90–97. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.029>.
17. Clavijo D; Portilla C; Quijano A. (2012). Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (Ananas Comosus) de Lebrija-Santander Bistua. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 10 (2), 41- 49.
18. Coelho M, Linhares R, Ramalho M, Campos F, Pereira M, Morais H. (2012). Effect of pH and Temperature on the Activity of Enzymatic Extracts

- from Pineapple Peel. *Food and Bioprocess Technology*. 5 (5), 1824-1831. Doi 10.1007/s11947-011-0616-5
19. Corzo, C., Waliszewski, K. y Welti-chanes, J. (2012). Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, 133(3), 631–635. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.119>.
20. Cosgrove, D. (2000). Expansive growth of plant cell walls, 38 (2) 109–124. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00164-9)
21. Cuaspud, M. (2015). Obtención de aceite de aguacate microencapsulado mediante secado por atomización. Recuperado de Repositorio Digital EPN. (CD-6219)
22. Demir, N., Acar, J., Sarão, K., y Mutlu, M. (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 275–280. [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00127-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00127-8).
23. De Lencastre L, de Carvalho V, Faustino A y Gava P. (2015). Stability, purification, and applications of bromelain: a review. *Bioseparations and Downstream Processing*, 32(1), 1-34. <http://doi.org/10.1002/btpr>.
24. Desai, K., y Park, H. (2005). An Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. <http://dx.doi.org/10.1081/DRT-200063478>.
25. Deulgaonkar, S. y Thorat, C. (2008). The Purification, Formulation and Drying of Papain. *International Journal of Food Engineering* 4(8). 1-18. <http://doi.org/10.2202/1556-3758.1512>.

26. Devakate, R. V., Patil, V. V., Waje, S. S., & Thorat, B. N. (2009). Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*, 64(3), 259–264. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.09.012>.
27. Elizondo J y Campos C (2014). Características nutricionales de la cáscara de piña ensilada con porcentajes crecientes de urea y heno. *Nutrition Animal Tropical*, 8(2), 51–71. Recuperado de <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/nutrianimal/article/view/17581/17081> (Marzo, 2017).
28. Feijoo, L. y Villa, T. (2015). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol*, 4(2) ,1066–1088. <http://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>.
29. Gallardo L, Montalvo C, y Alonso A (2008). Extracción de bromelina a partir de residuos de piña. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 18(1), 1–4. Recuperado de <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5225/1-PDF;jsessionid=37B5B78A71E5DF6AFAC332391FEEF11E?sequence=1> (Marzo, 2017).
30. Gallego, L. (2011). Factores que influyen en la colmatación de membranas de microfiltración tangencial y representación matemática. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=i5Ek1o7-uRwC&pg=PA196&lpg=PA196&dq=taponamiento+de+membranas+en+microfiltracion+tangencial&source=bl&ots=S3eL9Sz-2p&sig=4lb-ph39NDJkPC4nu2ws2s5q7Kc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwibipUMqoHVAhUD7CYKH8Y8QCUQQ6AEILTAC#v=onepage&q=taponamiento%20de%20membranas%20en%20microfiltracion%20tangencial&f=false>. (Marzo, 2017).

31. García, A. y López ,A. (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación. 6(1). 84-97. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Puebla, Recuperado de [http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6\(1\)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf](http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6(1)-Garcia-Ceja-et-al-2012.pdf). (Marzo, 2017).
32. Gautam S, Mishra S, Dash V, Goyal A y Rath G (2010). Comparative study of extraction , purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. Department of Pharmaceutics, 34 (3), 67–76. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/235990131_Comparative_study_of_extraction_purification_and_estimation_of_bromelain_from_stem_and_fruit_of_pineapple_plant (Marzo, 2017).
33. Gómez, N. y Jiménez, M. (2014). Métodos de secado de emulsiones alimentarias. Departamento de Ingeniería Química Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, 8(2), 23–33.
34. Guizard, C. (2007).Técnicas membranarias de filtracion de líquidos microfiltracion – ultrafiltracion – nanofiltracion – osmosis inversa. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos, 1(1), 1-56. Recuperado de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S451B.pdf> (Marzo, 2017).
35. Hale, L., Greer, P., Trinh, C. y James, C. (2005). Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. International Immunopharmacology, 5(4), 783–793. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.12.007>.
36. Hebbar, H., Sumana, B., y Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. Bioresource Technology. 99(11), 4896–4902. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.038>.

37. Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M., y Chávez, M. (2004). Aislamiento de enzimas proteolíticas a partir de restos de cosecha de piña. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 25 (4), 95-102. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193225911013>. (Marzo, 2017).
38. Herskovits, T., Jaillet, H., y Gadegbeku, B. (1970). On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins. The Journal of Biological Chemistry. ,245(17), 4544-4550. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/245/17/4544.short>
39. Iffah, Z., Arshad, M., Amid, A., y Yusof, F. (2014). Bromelain : An overview of industrial application and purification strategies. Appl Microbiol Biotechnol, 98 (17), 83-97. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
40. INEN NTE 1836 (2015). Frutas Frescas. Piña. Requisitos. Recuperado de http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/07/nte_inen_1836_2r.pdf (Marzo, 2017).
41. INEN NTE 2841 (2014). gestión ambiental. estandarización de colores para recipientes de depósito y almacenamiento temporal de residuos sólidos. Requisitos. Recuperado de <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/03/2841.pdf>. (Marzo, 2017)
42. Jutamongkon R y Charoenrein S (2010). Effect of Temperature on the Stability of Fruit Bromelain from Smooth Cayenne Pineapple. Department of Food Science and Technology, 43 (2), 943–948.

43. Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2010). Extraction of bromelain from pineapple peels. *Food Science and Technology International*, 17(4), 395-406. <http://doi.org/10.1177/1082013210387817>.
44. Ketnawa, S., Chaiwut, P. y Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 385–391. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>.
45. Le Gnoc, L y Van Viet, M. (2010), Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonic Sonochemistry*, 17(1), 273-279. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.05.002
46. Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. y Wang, X.(2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application , Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology*, 2(3), 1–11. <http://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
47. Liang H, Li M, Shi M, Liao A y Wu R (2012). Study on the Stability of Fruit Bromelain. *Advances Materials Research*, 421(1), 19–22. <http://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.421.19>.
48. Lieu, L. y Le, V. (2010). Ultrasonics Sonochemistry Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics – Sonochemistry*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 273–279. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.05.002>.
49. López I., Diaz J. y Merino de Caceres F. (2016). La bromelina : una proteasa de interés comercial. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(2). 17-22.<http://doi.org/10.1080/11358129609487552>.
50. López M, WingChing R y Rojas A. (2014). Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*), para la alimentación animal. *Agron.*

- Mesoam, 25(2), 383–392. Recuperado de http://www.produccionbovina.com/tablas_composicion_alimentos/94-anana.pdf. (Marzo, 2017).
51. MAGAP (2015). Boletín situacional piña. Coordinación general del sistema de información nacional, 1(1), 1-6. Recuperado de http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/boletin_situacional_pina_2015.pdf
52. Martins, B., Rescolino, R., Coelho, D, Zanchetta, B, Tambourgi E, Silveira, E. (2014). Characterization of Bromelain from Ananas Comosus Agroindustrial Residues Purified by Ethanol Fractional Precipitation. The Italian Association of Chemical Engineering , 37 (1), 781–786. <http://doi.org/10.3303/CET1437131>.
53. Mohd, S. y Amir, A. Bromelain Production: Current Trends and Perspective. University of Malasya, 85(11), 369-400. Recuperado de <http://irep.iium.edu.my/28364/>. (Marzo, 2017)
54. Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A. y Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización : formación de gránulos y cinética de secado de gotas. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 52(4), 159–168. <http://doi.org/10.3989/cyv.212013>.
55. Murillo O. (2008). Ficha Técnica de industrialización de Piña (Ananas comosus L.).Tecnología de alimentos CNP, 1(1). 1-5. Recuperado de https://www.cnp.go.cr/biblioteca/fichas/pina_FTPpdf. (Marzo, 2017).
56. Nadzirah K, Zainal S, Noriham A y Normah I (2013). Efficacy of selected purification techniques for bromelain. Department of Food, Science and Technology, 20(1), 43–46. Recuperado de

<https://uitm.pure.elsevier.com/en/publications/efficacy-of-selected-purification-techniques-for-bromelain> (Marzo, 2017).

57. Nelson D. y Cox M. (2005). Lehninger. Principios de Bioquímica (4ta. ed.). Barcelona, España; Omega.
58. Nienaber U., Shellhammer T. (2001). High-Pressure Processing of Orange Juice : 66(2), 332–336. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>.
59. Nireesha G, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu M y Lavakumar V (2013). Lyophilization / Freeze Drying- A review. International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Science, 3(4), 87–98. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/292047227_LYOPHILIZATION_FREEZE_DRYING_-_A_REVIEW (Marzo, 2017).
60. Nor A, Norsyalieza T, Illias R (2016). Bromelain: From Production to Commercialisation. University of Malasya, 1(1), 1-34. <http://doi.org/10.1002/j>
61. Nor M, Ramchandran L, Duke M y Vasiljevic T. (2015). Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. Journal of food Science technology, 52(11), 7103-7112. <http://doi.org/10.1007/s13197-015-1812-5>.
62. Ozuna, L. y Ochoa, L. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el proceso de alimentos. Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha, 13(2). 109-122. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/813/81325441002/> (Marzo, 2017).

63. Pinto, M., Silvestre, C., Carreira, R. L., & Silva, M. R. (2012). Effect of pH and Temperature on the Activity of Enzymatic Extracts from Pineapple Peel. *Food and Bioprocess Technology* ,5(5) ,1824–1831. <http://doi.org/10.1007/s11947-011-0616-5>.
64. Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44. Doi:<http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
65. Quinde C y Sánchez N, (2015). Extracción, Purificación Parcial y Secado de la Enzima Bromelina Obtenida a partir del Corazón de la Piña (*Ananas comosus*) 1 (1). Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción ESPOL, 1–7. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25265>. (Marzo, 2017).
66. Ramírez, A., y Pacheco, E. (2011). Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* ,36 (1), 71–75. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33917727011>. (Marzo, 2017).
67. Rival, S., Fornaroli,S., Boeriu,C. y Wichers,H. (2001). Caseins and Casein Hydrolysates.: Lipoxygenase Inhibitory Properties. *Journal of Chemistry Agricultural and Food*, 49(1), 287-294. DOI: 10.1021/jf000392t
68. Robles, L. y Ochoa, L. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 13(2), 109-122. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/813/81325441002/> (Marzo, 2017).

69. Rocha, I., Pereira, A., Tadeu, I., Bresolin, L., Silveira, E., Tambourgi, E. y Mazzola, P. (2013). Isolation and Purification of Bromelain from Waste Peel of Pineapple for Therapeutic Application. *Brazilian archives of biology and technology* 56(6), 971–979. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132013000600012. (Marzo, 2017).
70. Sáenz, A., Urdaneta, G., Joheni, A. (2014). Manejo de residuos sólidos en América Latina y el Caribe. *Universidad de Zulia*, 20(3), 121-135. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/737/73737091009/>. (Marzo, 2017)
71. Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2014). Purification Processes and Market Potential of Bromelain in Brazil, *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8 (1), 882–888. <http://doi.org/10.17265/1934-7375/2014.09.007>.
72. Sinche, M. (2009). Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasa presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*. Recuperado de Repositorio Digital EPN.(CD-2218)
73. Soares, P., Coelho, D., Mazzola, P., Silveira, E., Carneiro, M., Pessoa, A. y Tambourgi, E. (2009). Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol , Poly (Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. *Universidad de Sao Paulo*, 1(1) ,1-6. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/235675050_Studies_on_Bromelain_Precipitation_by_Ethanol_PolyEthylene_Glycol_and_Ammonium_Sulphate (Marzo, 2017).
74. Soares, P., Vaz, A., Correia, M., Pessoa, A. y Carneiro-da-cunha, M. (2012). Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol

precipitation. *Separation and Purification Technology*, 98(1), 389–395. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.042>.

75. Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R. y Damborsky, J. (2013). Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. *Faculty of Science*, 3(4) 2823-2836. dx.doi.org/10.1021/cs400684x.
76. Upadhyay, A., Lama, J., y Tawata, S. (2010). Utilization_of_Pineapple_Waste_A_Review. *Departament of Biochemistry and Applied Sciences*, 6(10). Doi: 10.3126/jfstn.v6i0.8255.
77. Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review, 9 (1), 161–169. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>.
78. Voet, D. y Voet, J. (2004). *Bioquímica*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA140&lpg=PA140&dq=precipitacion+de+proteinas+por+solventes+organicos&source=bl&ots=RmmSdXC9W5&sig=C__OaRHtH_UPeodemnoSzHGxEJw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiQiqLph_PUAhVRziYKHbFCDFQ4ChDoAQgtMAM#v=onepage&q=precipitacion%20de%20proteinas%20por%20solventes%20organicos&f=false (Marzo, 2017).

ANEXOS

ANEXO I

Gráficas Absorbancia vs Tiempo (horas), para determinar la variación de absorbancia / tiempo y cálculo de la actividad enzimática total y actividad enzimática específica en cada una de las etapas de la extracción de bromelina.

Nombre prueba: Actividad enzimática de muestras de residuos del procesamiento de piña

Objetivo: Calcular mediante la regresión lineal y la pendiente de la recta la variación de la absorbancia de cada una de las muestras.

Condiciones: Temperatura de trabajo: 30 °C; dilución de la muestra en agua destilada: 1:10 (muestra: agua destilada)

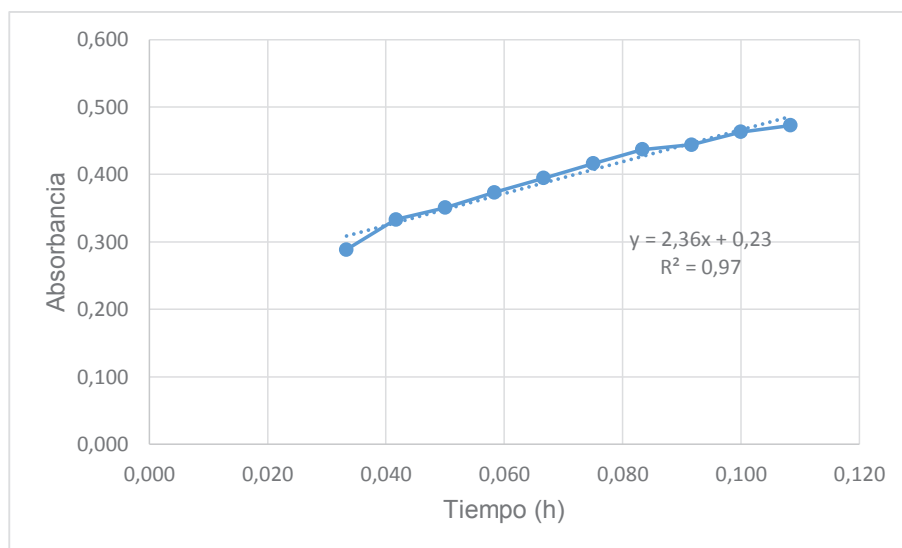


Figura A I.1. Gráfico absorbancia vs tiempo para el bagazo de piña

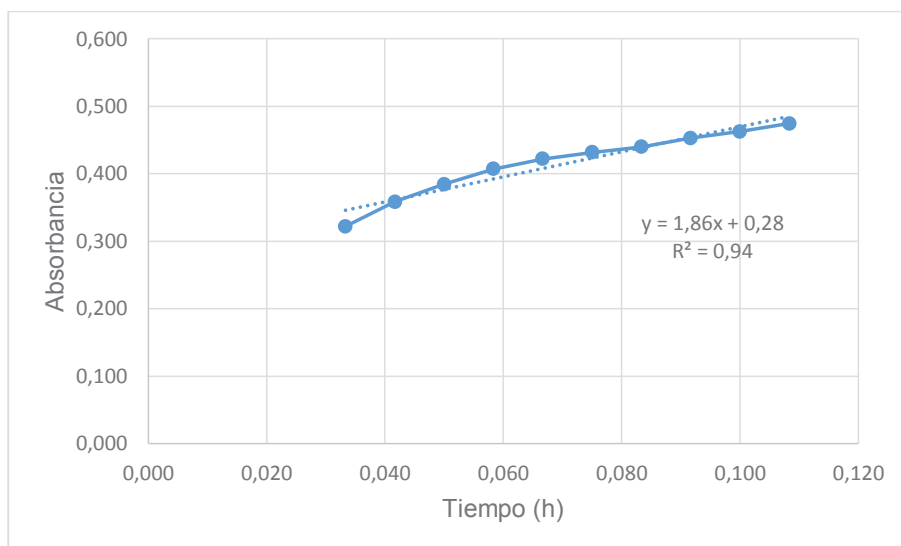


Figura A I.2. Gráfico absorción vs tiempo para el corazón de piña

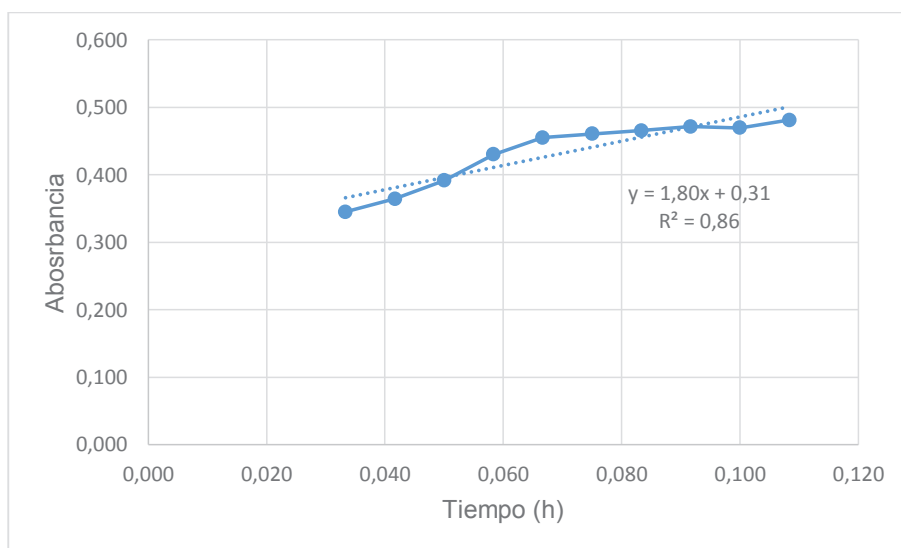


Figura A I.3. Gráfico absorción vs tiempo para la cáscara de piña

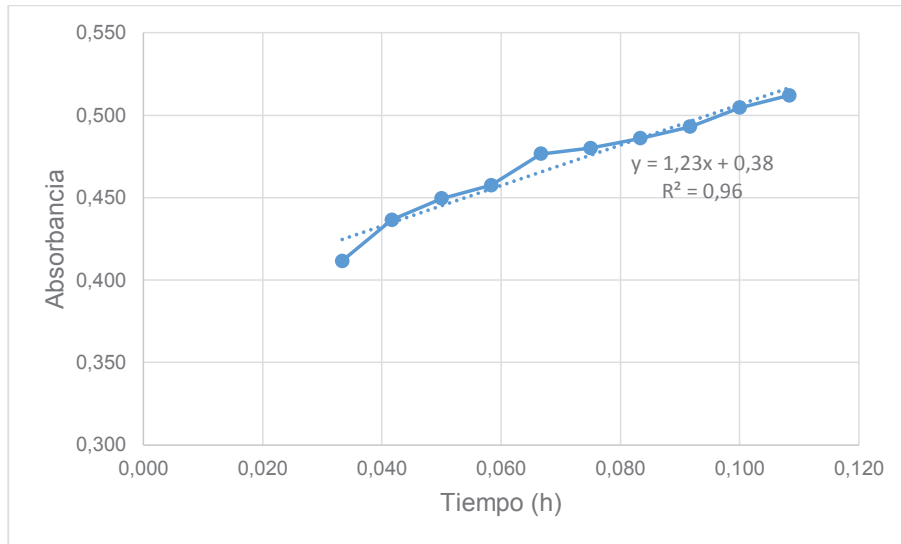


Figura A I.4. Gráfico absorbanza vs tiempo para prensa con enzima del bagazo de piña

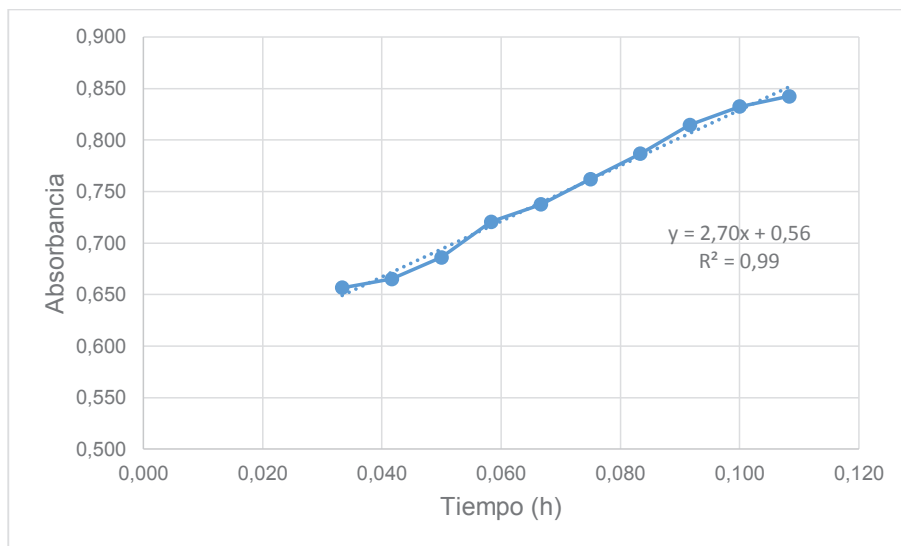


Figura A I.5. Gráfico absorbanza vs tiempo para prensa sin enzima del bagazo de piña

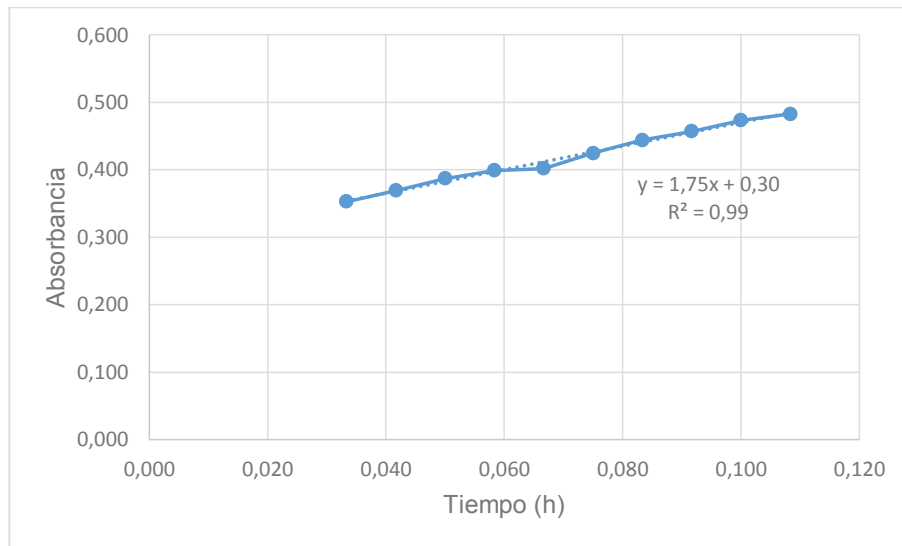


Figura A I.6. Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal con enzima del bagazo de piña

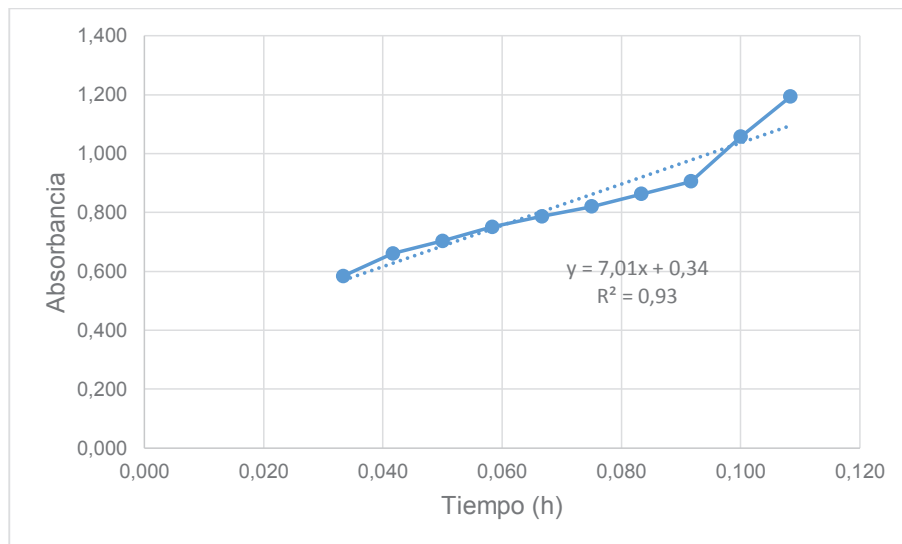


Figura A I.7. Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima del bagazo de piña

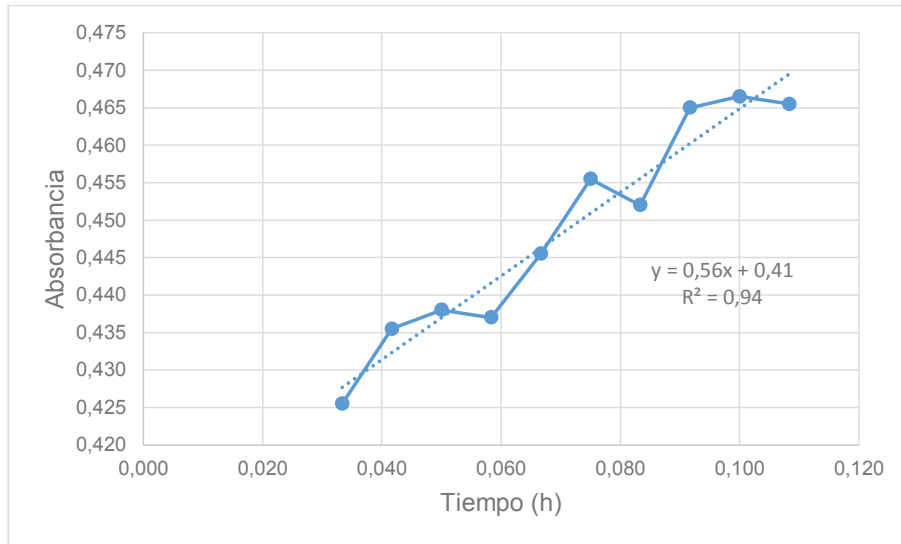


Figura A I.8. Gráfico absorción vs tiempo para baño ultrasónico con enzima del bagazo de piña

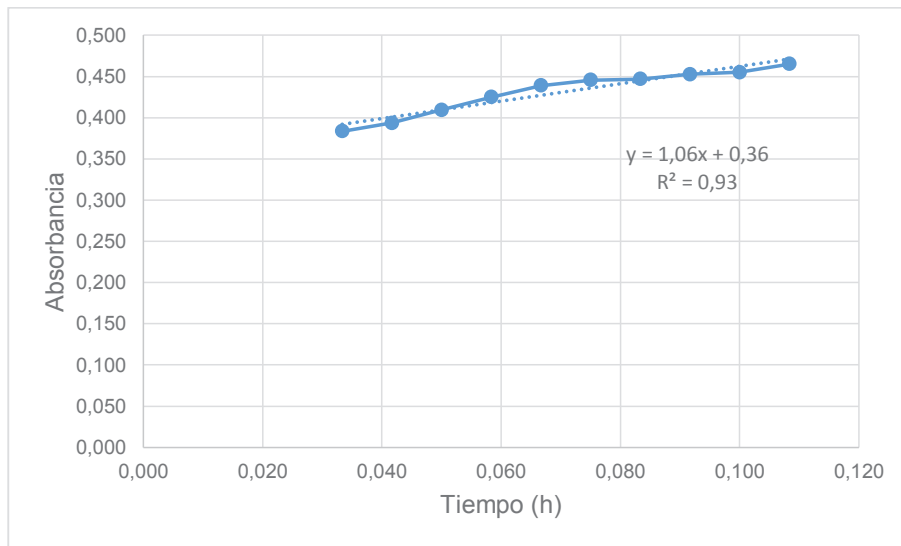


Figura A I.9. Gráfico absorción vs tiempo para baño ultrasónico sin enzima del bagazo de piña

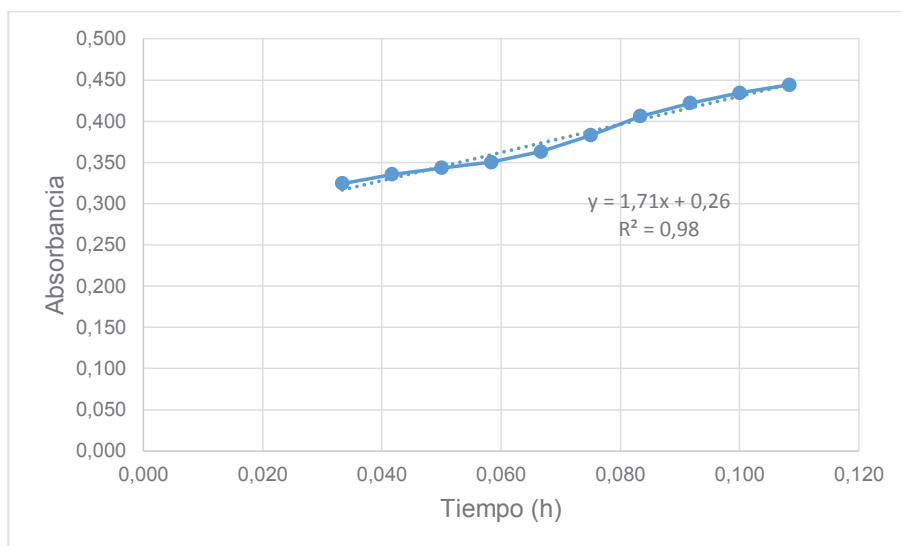


Figura A I.10. Gráfico absorción vs tiempo para punta ultrasónica con enzima del bagazo de piña

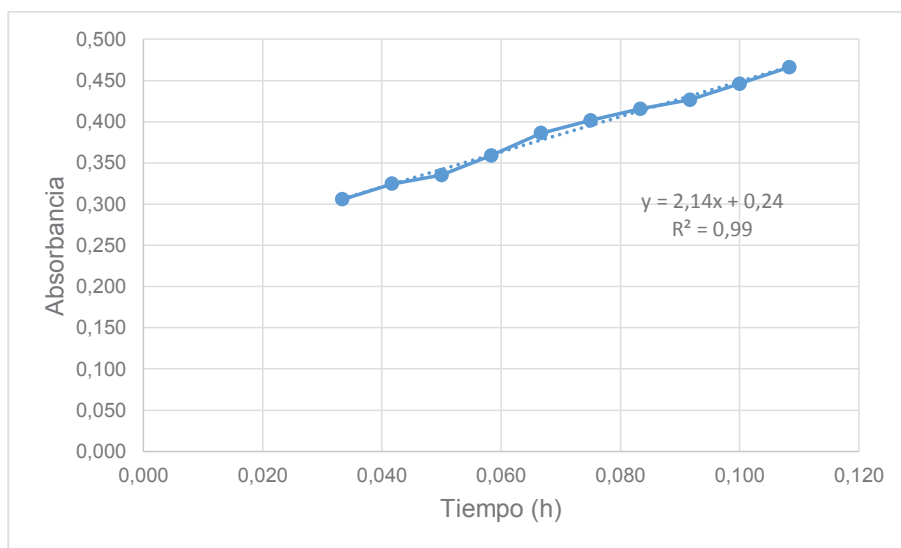


Figura A I.11. Gráfico absorción vs tiempo para baño ultrasónico punta sin enzima del bagazo de piña

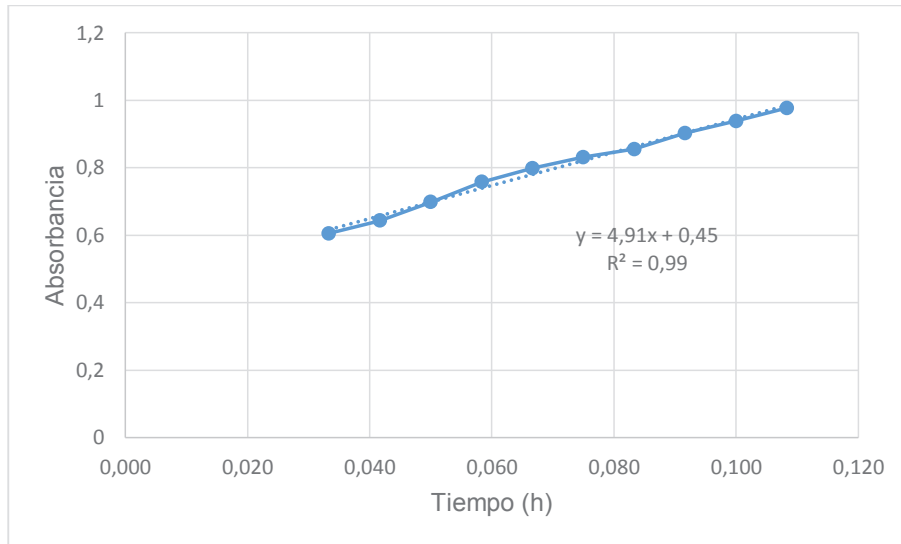


Figura A I.12. Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima del corazón de piña

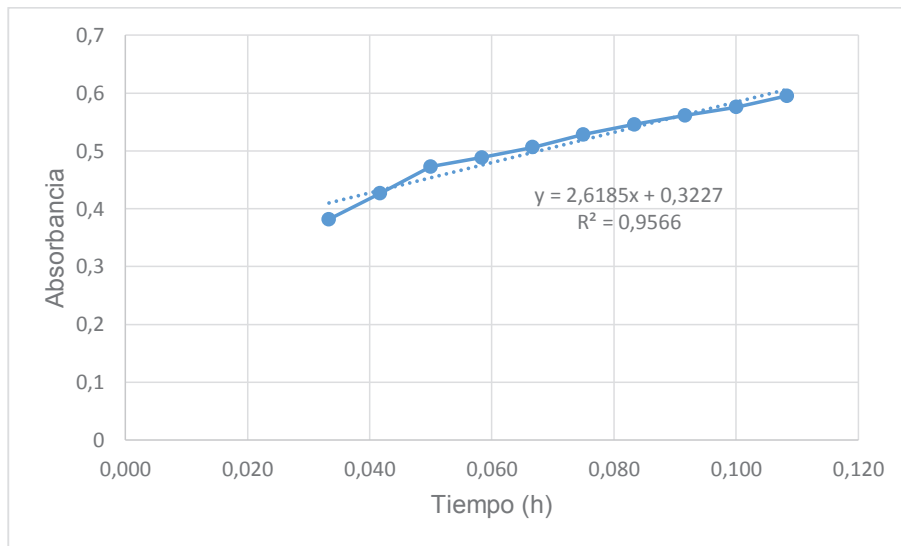


Figura A I.13. Gráfico absorbancia vs tiempo para coloidal sin enzima de la cáscara de piña

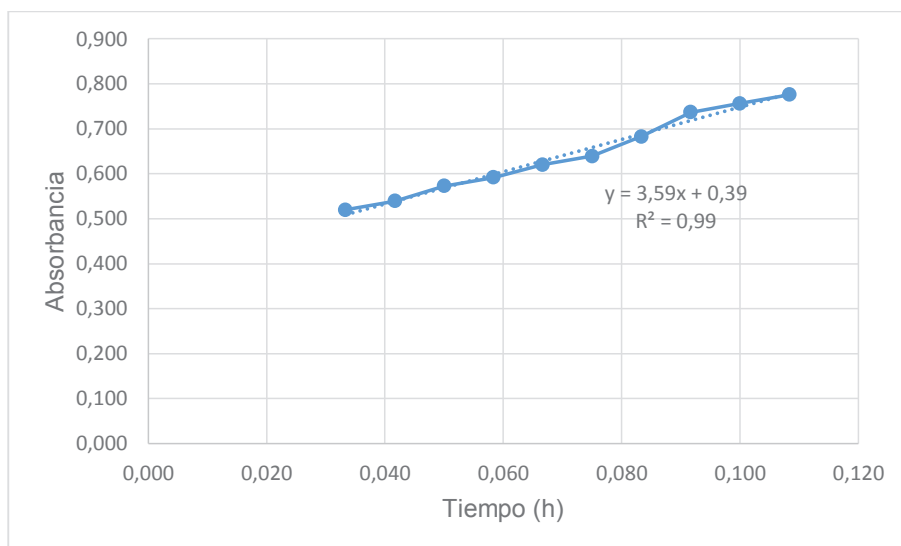


Figura A I.14. Gráfico absorbanza vs tiempo para la microfiltración del bagazo de piña

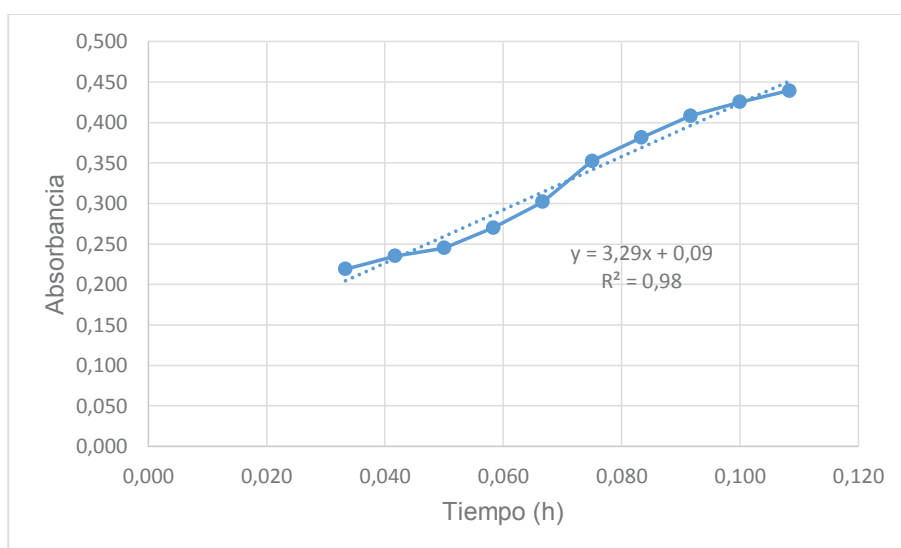


Figura A I.15. Gráfico absorbanza vs tiempo para la microfiltración del corazón de piña

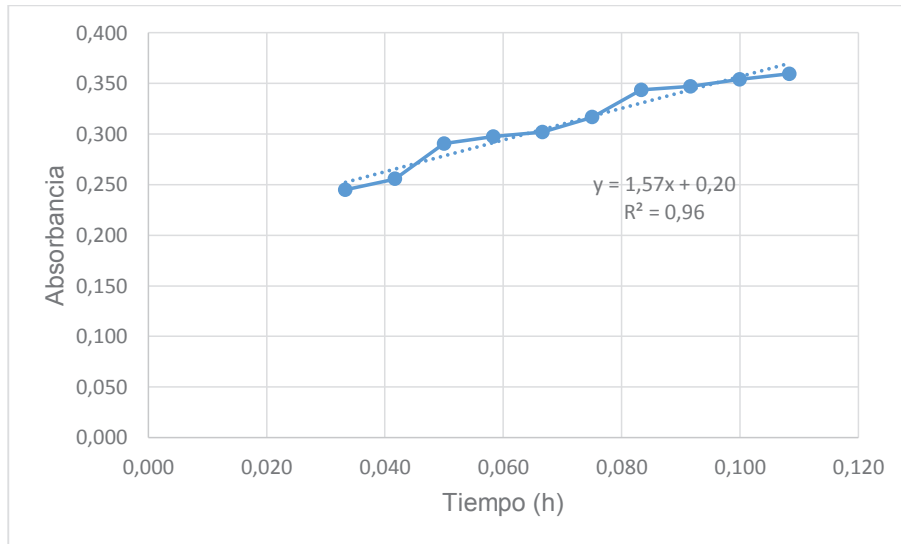


Figura A I.16. Gráfico absorción vs tiempo para la microfiltración de la cáscara de piña

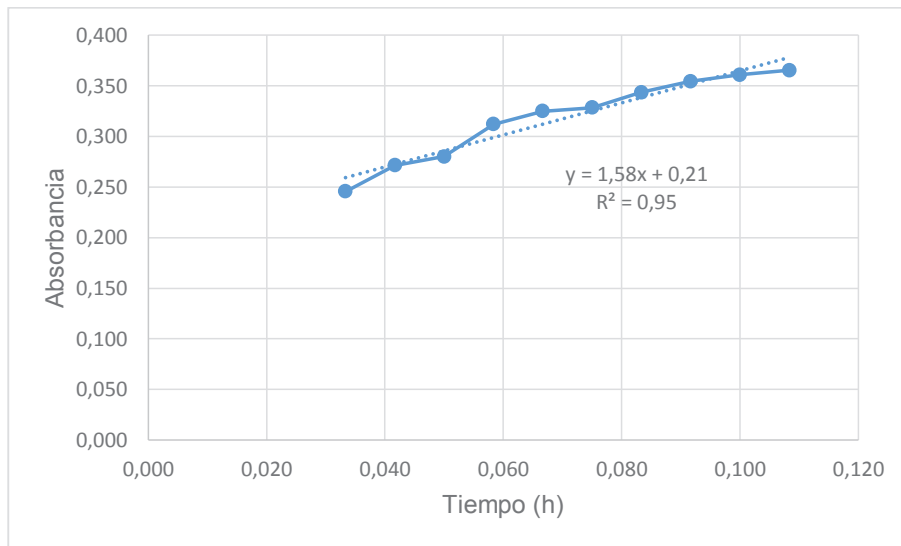


Figura A I.17. Gráfico absorción vs tiempo para la precipitación del bagazo de piña con etanol a pH 5,3

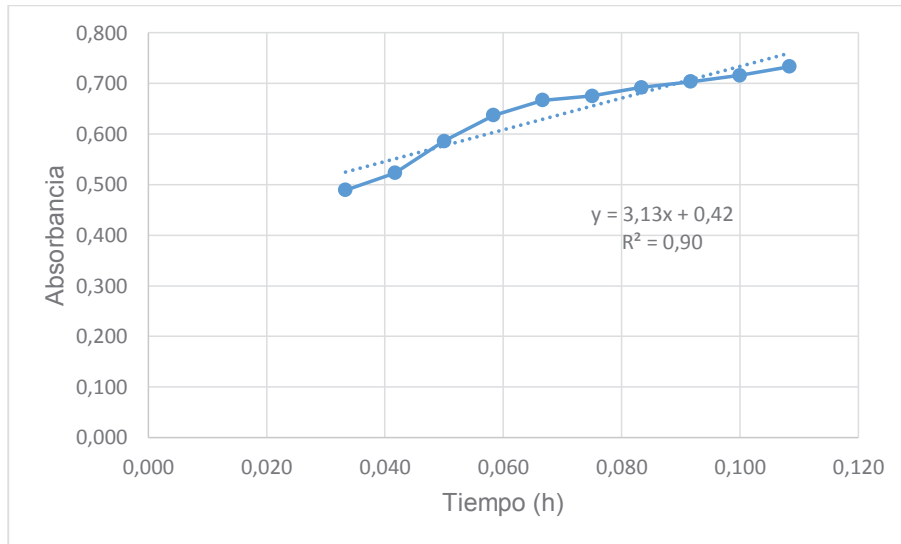


Figura A I.18. Gráfico absorción vs tiempo para la precipitación del bagazo de piña con etanol a pH isoelectrico (8,5)

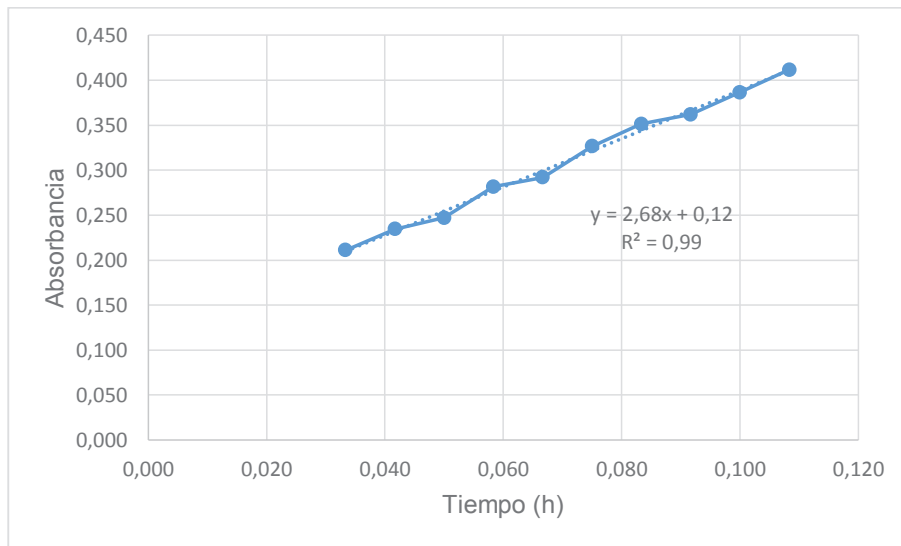


Figura A I.19. Gráfico absorción vs tiempo para la precipitación del corazón de piña con etanol a pH isoelectrico (8,5)

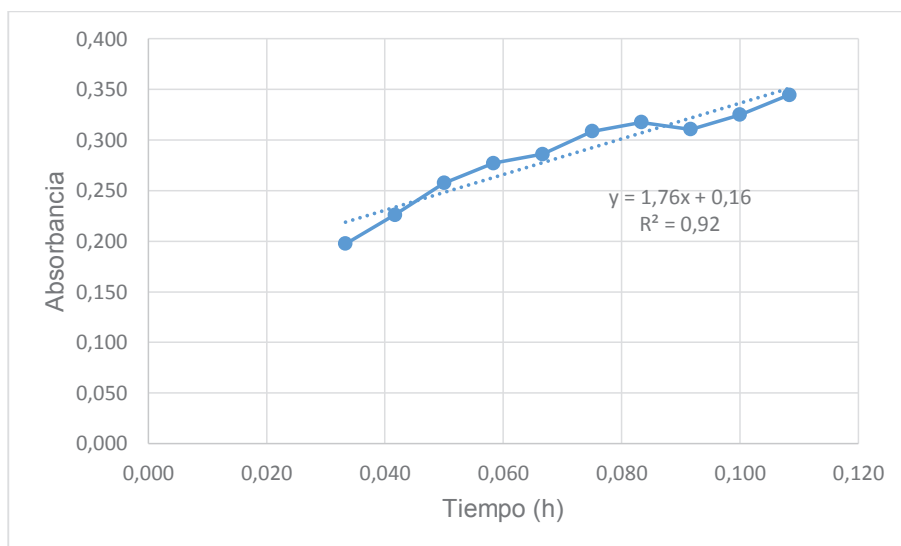


Figura A I.20. Gráfico absorción vs tiempo para la precipitación de la cáscara de piña con etanol a pH isoeléctrico (8,5)

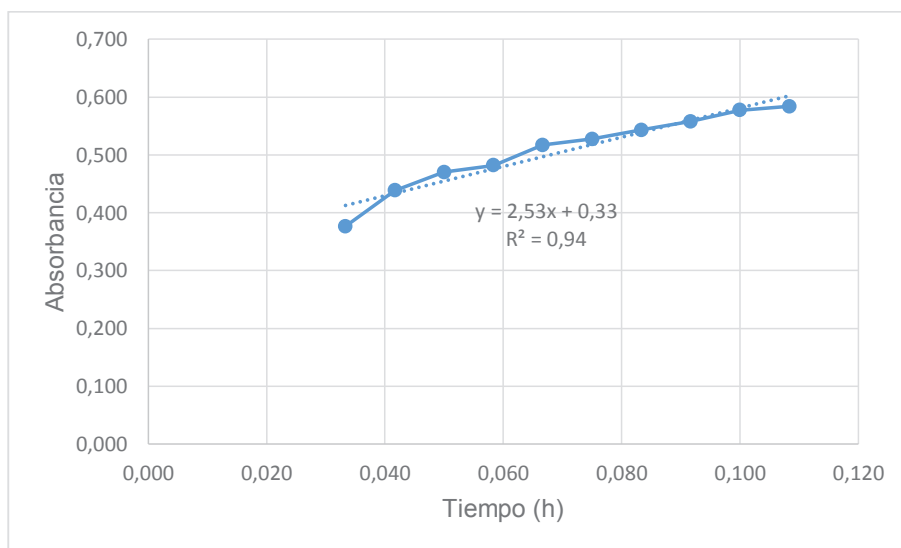


Figura A I.21. Gráfico absorción vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 100 °C y proporción MD: GA 70:30

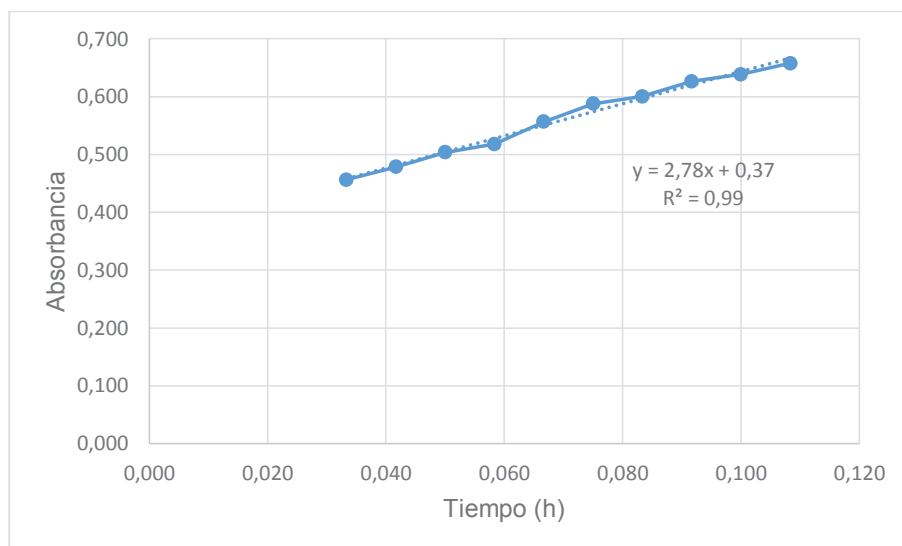


Figura A I.22. Gráfico absorción vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 70:30

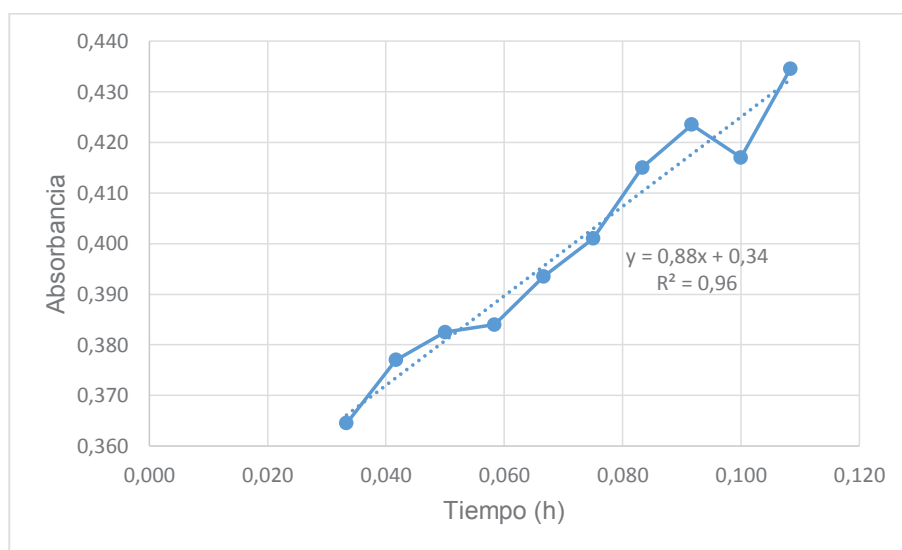


Figura A I.23. Gráfico absorción vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 30:70

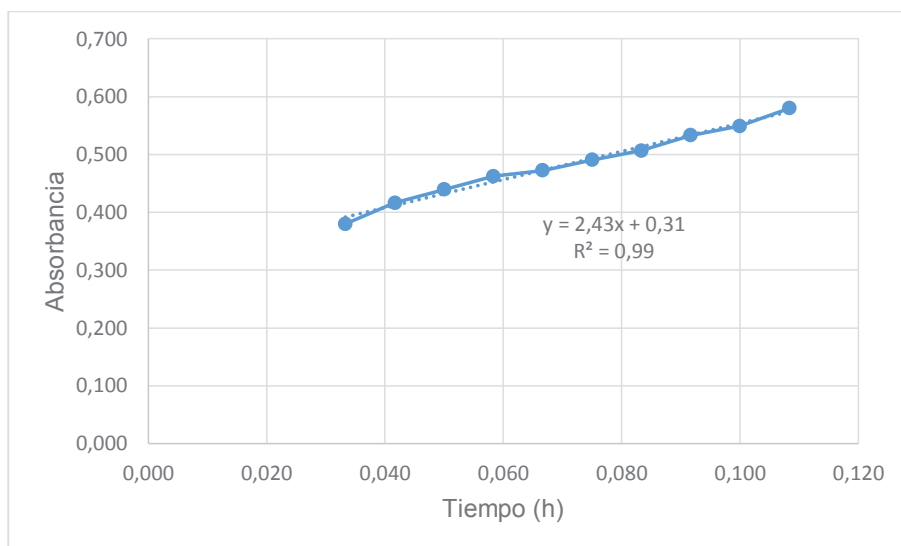


Figura A I.24. Gráfico absorción vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de corazón a 130 °C y proporción MD: GA 70:30

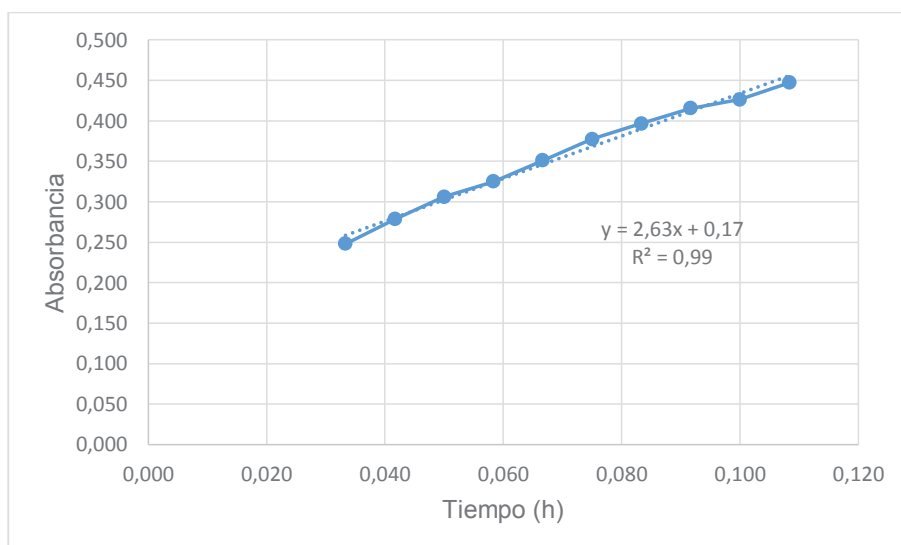


Figura A I.25. Gráfico absorción vs tiempo para el secado por atomización de la solución concentrada de bromelina de la cáscara a 130 °C y proporción MD: GA 70:30

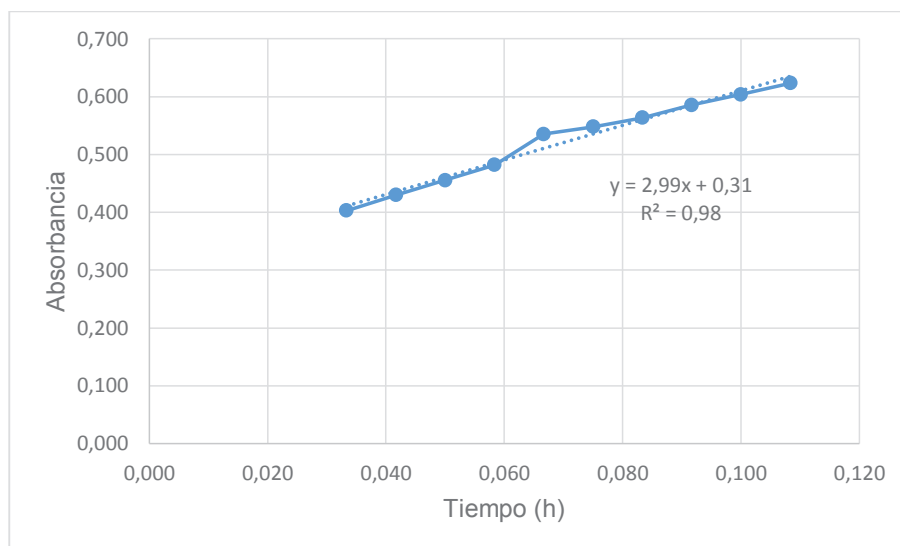


Figura A I.26. Gráfico absorbancia vs tiempo para el secado por liofilización de la solución concentrada de bromelina del bagazo a 130 °C y proporción MD: GA 70:30

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL Y ESPECÍFICA

Actividad enzimática total del bagazo de piña

$$AET \text{ (}\mu\text{mol/min mL)} = \frac{\frac{\Delta A}{t * 60} * \phi}{\epsilon * L * PM \text{ caseína}} * 10^6$$

$$AET = \frac{\frac{2,36}{60 \text{ min}} * 10}{10,1 \left(\frac{g}{100 \text{ mL}}\right)^{-1} (\text{cm})^{-1} * 1 \text{ cm} * 23 \text{ 600} \left(\frac{g}{\text{mol}}\right)} * 10^6$$

$$AET = 165,02 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mL}}$$

Actividad enzimática específica del bagazo de piña

$$AE \text{ específica} = \frac{165,02 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mL}}}{[\text{prot}] * 10^6}$$

$$[\text{prot}] = \frac{\left(\frac{0,9}{100}\right) * 3 \text{ g}}{12 \text{ mL}} * 10^3$$

$$[\text{prot}] = 2,25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$AE \text{ específica} = \frac{165,02 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mL}}}{2,25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 10^6}$$

$$AE \text{ específica} = 7,33 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{min mg}}$$

TABLAS DE LA VARIACIÓN DE ABSORBANCIA/ TIEMPO, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA

Para el bagazo

Tabla A I.1. Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica del bagazo de piña

PROCESO	SOLUCIÓN	Δ Absorbancia (UA/h)	Actividad enzimática total ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	Actividad enzimática específica ($\text{mol}/\text{min mg}$)
Inicial	Bagazo	2,36	165,02	7,33E-05
Extracción	solo prensa s/e	2,7	188,79	1,76E-04
	solo prensa c/e	1,23	86,00	1,15E-04
	coloidal s/e	7,01	490,15	9,34E-04
	coloidal c/e	1,75	122,36	3,77E-04
	punta ultrasónica s/e	2,14	149,63	2,99E-04
	punta ultrasónica c/e	1,71	119,57	1,59E-04
	baño ultrasónico s/e	1,06	74,12	9,88E-05
	baño ultrasónico c/e	0,558	39,02	6,79E-05
Purificación	permeado	3,59	251,02	5,02E-04
	solución bromelina (pH 5,3)	1,58	110,48	4,42E-03
	solución bromelina (pH 8,5)	4,26	297,87	5,67E-04
Atomización	130 °C (70:30) MD:GA	2,78	194,38	1,11E-04
	130 °C (30:70) MD:GA	0,884	61,81	4,12E-05
	100 °C (70:30) MD:GA	2,53	176,90	1,18E-04
Liofilización	(70:30) MD:GA	2,99	209,07	1,39E-04

s/e: sin enzima; c/e: con enzima; MD: Maltodextrina; GA: Goma arábica

Para el corazón

Tabla A I.2. Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica del corazón de piña

PROCESO	SOLUCIÓN	Δ Absorbancia (UA/h)	Actividad enzimática total ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	Actividad enzimática específica (mol/min mg)
Inicial	Corazón	1,85	129,36	6,47E-05
Extracción	coloidal s/e	4,92	344,02	6,88E-04
Purificación	permeado	3,29	230,04	4,84E-04
	solución bromelina (pH 8,5)	3,64	254,52	5,66E-04
Atomización	130 °C (70:30) MD:GA	2,43	169,91	1,13E-04

s/e: sin enzima; MD: Maltodextrina; GA: Goma arábica

Para la cáscara

Tabla A I.3. Variación de absorbancia, actividad enzimática total y específica de la cáscara de piña

PROCESO	SOLUCIÓN	Δ Absorbancia (UA/h)	Actividad enzimática total ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	Actividad enzimática específica (mol/min mg)
Inicial	Cáscara	1,79	125,16	1,67E-04
Extracción	coloidal s/e	2,62	183,20	4,58E-04
Purificación	permeado	1,57	109,78	3,14E-04
	solución bromelina (pH 8,5)	2,39	167,11	3,71E-04
Atomización	130 °C (70:30) MD:GA	2,63	183,90	1,23E-04

s/e: sin enzima; MD: Maltodextrina; GA: Goma arábica

ANEXO II

Ecuaciones para obtener el porcentaje de recuperación de actividad enzimática, porcentaje de recuperación de proteína, rendimiento del secado y del extracto.

$$\text{Recuperación actividad enzimática (\%)} = \frac{A_p}{A_f} * 100 \quad [2.1]$$

Donde:

A_p = Actividad enzimática de la bromelina en la corriente de salida

A_f = Actividad enzimática de la bromelina en la corriente de entrada

$$\text{Recuperación de proteína (\%)} = \frac{M_s * X_s}{M_e * X_e} * 100 \quad [2.2]$$

Donde:

M_s = Masa de la corriente de salida

M_e = Masa de la corriente de entrada

X_s = Porcentaje de proteína en la corriente de salida

X_e = Porcentaje de proteína en la corriente de entrada

$$\text{Rendimiento extracto (\%)} = \frac{M_{\text{extracto}}}{M_{\text{muestra}}} * 100 \quad [2.3]$$

Donde:

M_{extracto} = Masa extracto (g)

M_{muestra} = Masa muestra (g)

$$\text{variación de la actividad enzimática (\%)} = \frac{A_{\text{enz Agua}} - A_{\text{enz BE}}}{A_{\text{enz Agua}}} * 100 \quad [2.4]$$

Donde:

$A_{\text{enz Agua}}$ = Actividad enzimática de la solución de bromelina en agua

$A_{\text{enz BE}}$ = Actividad enzimática de la solución de bromelina en agua y etanol

$$\text{relación solventes} = \frac{A \text{ enz Agua}}{A \text{ enz BE}} \quad [2.5]$$

Donde:

A enz Agua = Actividad enzimática de la solución de bromelina en agua

A enz BE = Actividad enzimática de la solución de bromelina en agua y etanol

$$\text{Rendimiento del secado (\%)} = \frac{Xps * Mps}{Xpas * Mas} * 100 \quad [2.6]$$

Donde:

Mps = Masa de polvo seco (g)

Mas = Masa de la emulsión (g)

Xps = Porcentaje de proteína del polvo seco

Xpas = Porcentaje de proteína de la emulsión

ANEXO III

Preparación de las emulsiones usadas para el secado por atomización y liofilización

Tabla A III.1. Cantidad de encapsulante y solución concentrada usada para realizar las emulsiones

Tipo de Secado	Proporción encapsulante MD:GA w:w	Fración de residuo	Temperatura de secado (°C)	Solución concentrada de bromelina con etanol (g)	MD (g) (A)	GA(g) (B)	Solución encapsulante (A+B+ agua) (g)
Atomización	70 : 30	Bagazo	130	600	105	45	600
	30 : 70	Bagazo	130	600	45	105	600
	70 : 30	Bagazo	100	600	105	45	600
	70 : 30	Corazón	130	600	105	45	600
	70 : 30	Cáscara	130	600	105	45	600
Liofilización	70 : 30	Bagazo		900 (200 g después del rotavapor)	157,5	67,5	900

(n=2) / MD: Maltodextrina GA: Goma arábica

ANEXO IV

Ensayo de la actividad enzimática de las soluciones de bromelina con agua y etanol: agua

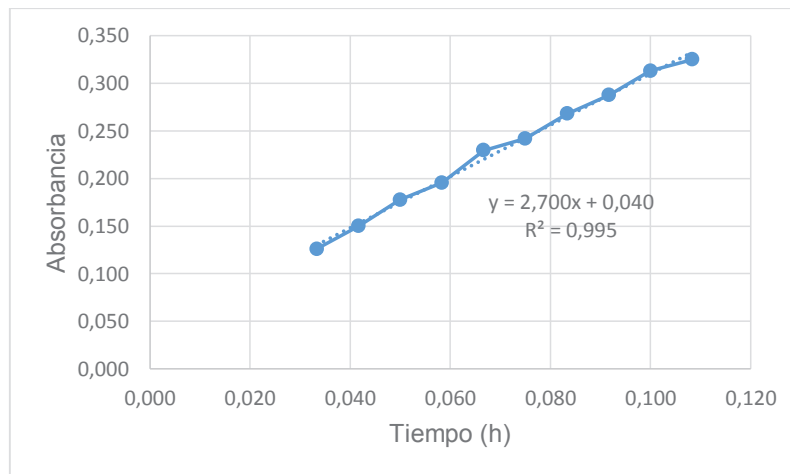


Figura A IV.1. Gráfico Absorbancia vs Tiempo para la solución de bromelina seca y agua

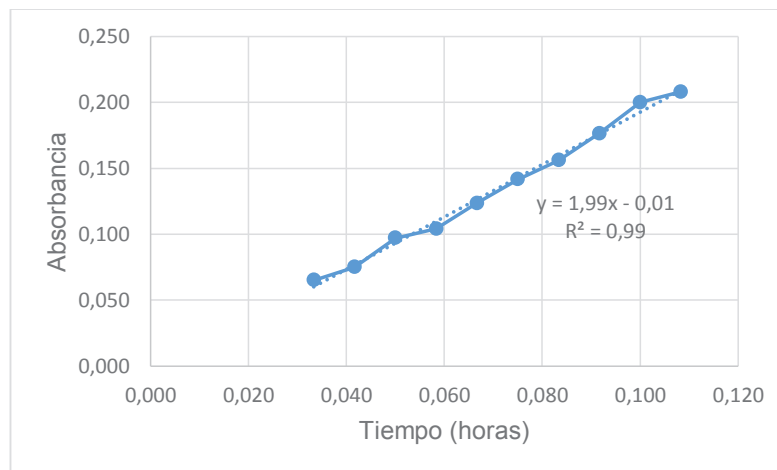


Figura A IV.2. Gráfico Absorbancia vs Tiempo para la solución de bromelina seca y agua: etanol

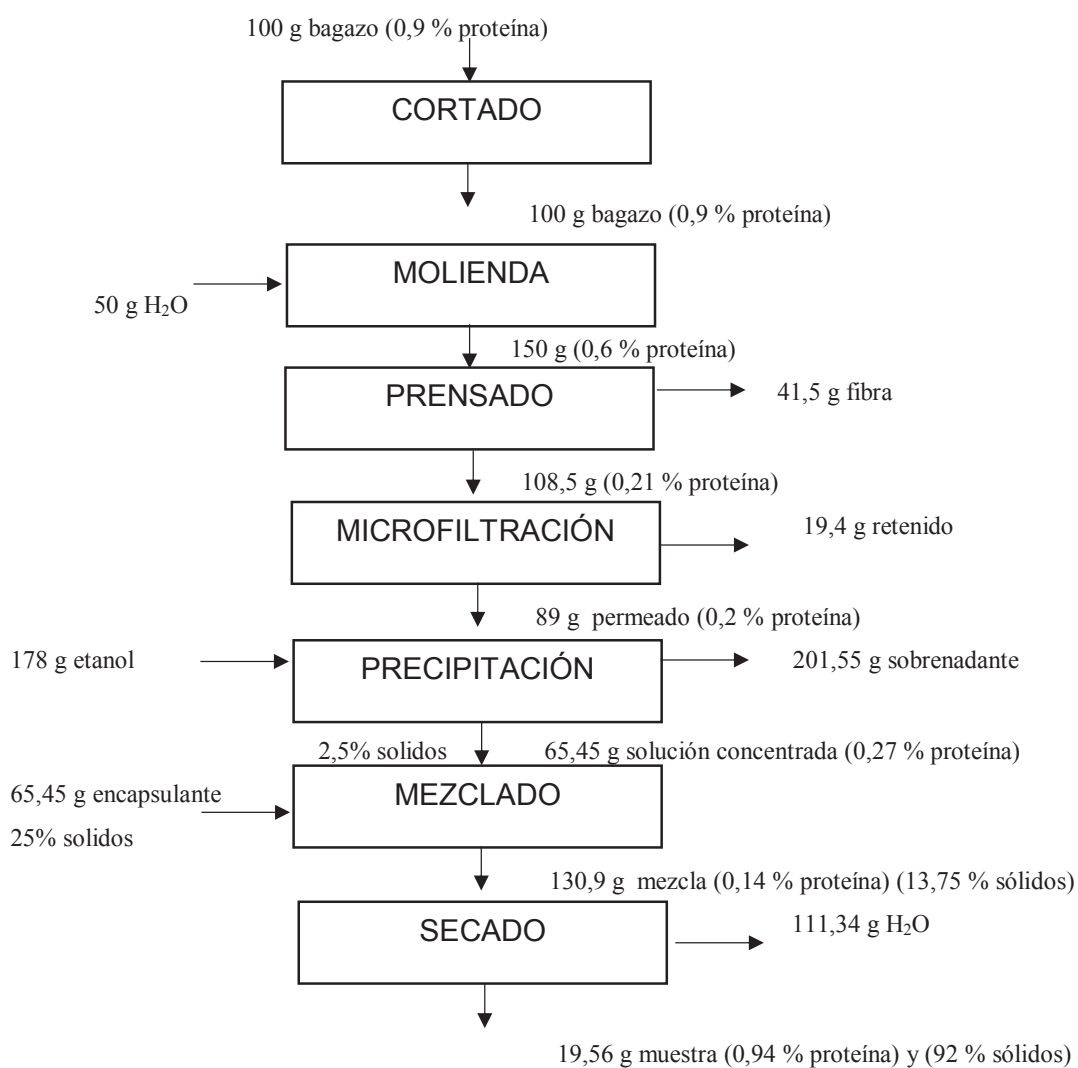
TABLA DE LA VARIACIÓN DE ABSORBANCIA/ TIEMPO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL**Tabla A IV.1.** Variación de la absorbancia y actividad enzimática total de las muestras de bromelina seca con agua y agua: etanol

SOLUCIÓN	Δ Absorbancia (UA/h)	A enzimática total ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)
Bromelina seca y agua	2,70	188,79
Bromelina seca y agua:etanol	1,99	139,15

ANEXO V

Proceso teórico de secado por atomización del bagazo, corazón y cáscara de piña a 130 °C, proporción MD: GA 70:30

Proceso secado por atomización del bagazo de piña a 130 °C, proporción MD: GA 70:30



Cálculos realizados para el bagazo de piña**En el precipitado**

$$89 \cdot (0,2) = 65,45 \cdot (x)$$

$$x = 0,27\% \text{ proteína}$$

En el mezclado

$$130,9 \cdot (y) = 65,45 \cdot (0,27)$$

$$y = 0,14 \text{ \% proteína}$$

$$65,45 \cdot (2,5) + 65,45 \cdot (25) = 130,9 \cdot (w)$$

$$w = 13,75 \text{ \% sólidos}$$

En el secado

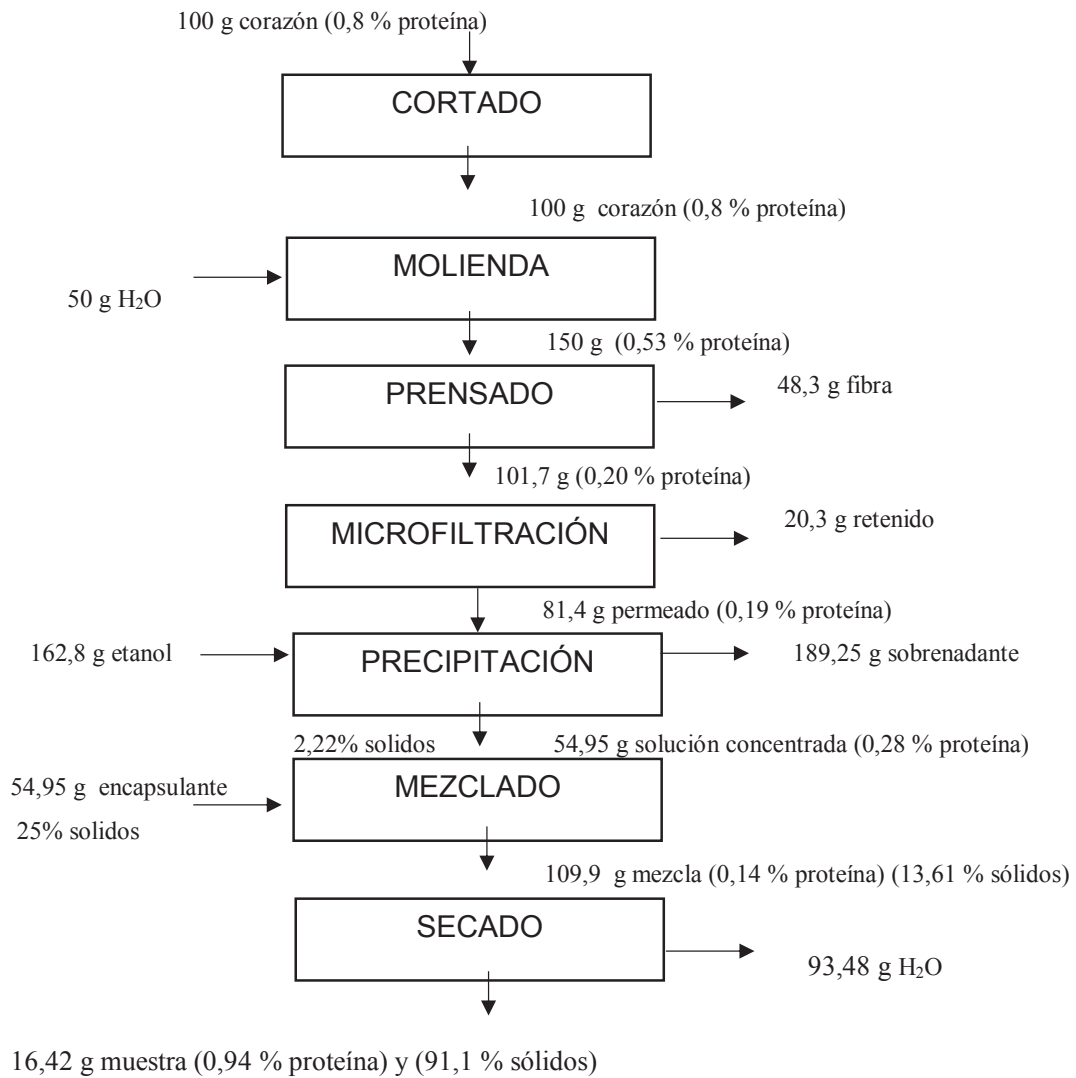
$$130,9 \cdot (13,75) = A \cdot (92)$$

$$A = 19,56 \text{ gramos muestra seca}$$

$$130,9 \cdot (0,14) = 19,56 \cdot (z)$$

$$z = 0,94 \text{ \% proteína}$$

Proceso secado por atomización del corazón de piña a 130 °C, proporción MD: GA 70:30



Cálculos realizados para el corazón de piña**En el precipitado**

$$81,4 \cdot (0,19) = 54,95 \cdot (x)$$

$$x = 0,28 \text{ \% proteína}$$

En el mezclado

$$109,9 \cdot (y) = 54,95 \cdot (0,28)$$

$$y = 0,14 \text{ \% proteína}$$

$$54,95 \cdot (2,22) + 54,95 \cdot (25) = 109,9 \cdot (w)$$

$$w = 13,61 \text{ \% sólidos}$$

En el secado

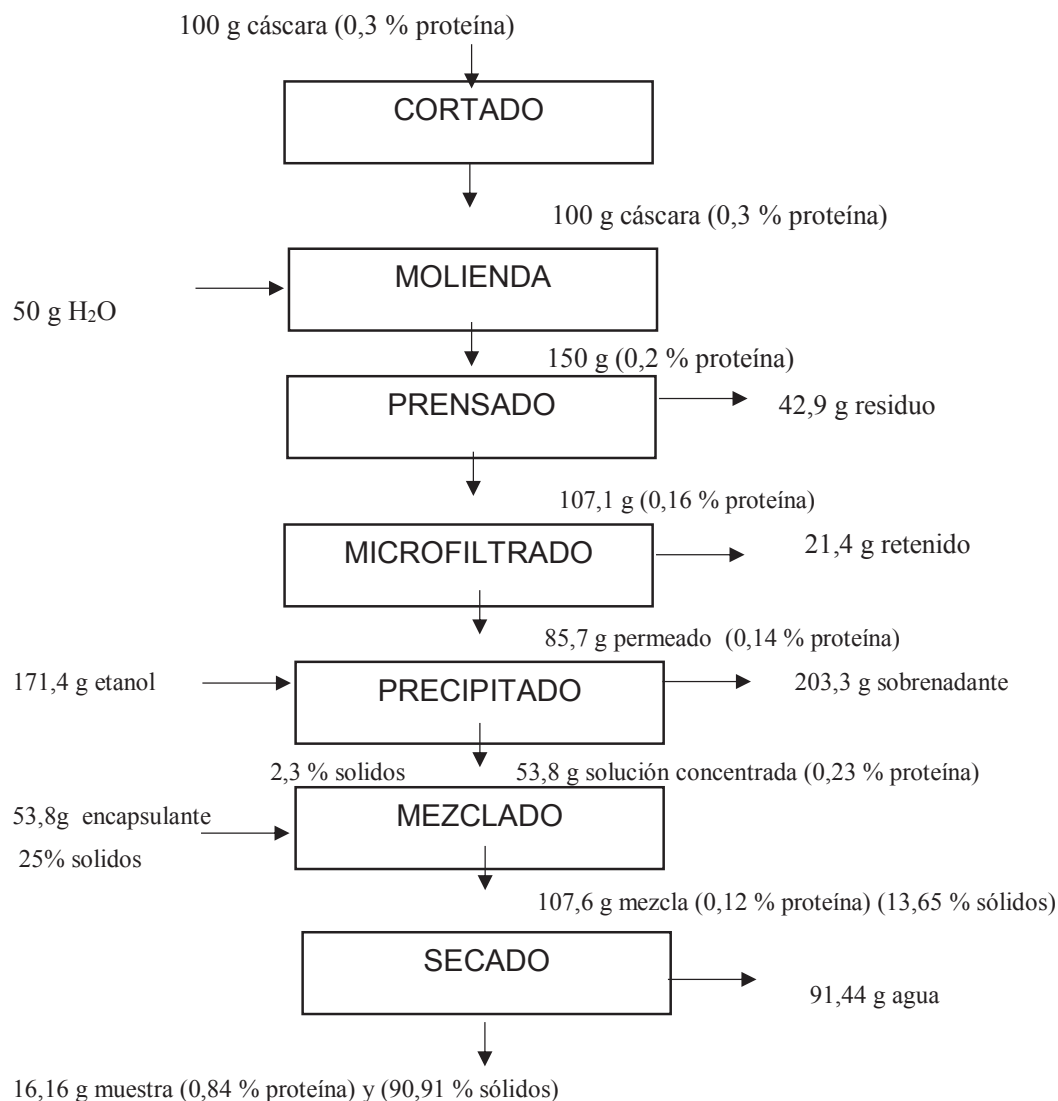
$$109,9 \cdot (13,61) = A \cdot (91,1)$$

$$A = 16,42 \text{ gramos muestra seca}$$

$$109,9 \cdot (0,14) = 16,42 \cdot (z)$$

$$z = 0,94 \text{ \% proteína}$$

**Proceso secado por atomización de la cáscara de piña a 130 °C,
proporción MD: GA 70:30**



Cálculos realizados para cáscara de piña**En el precipitado**

$$85,7*(0,14) = 53,8*(x)$$

$$x = 0,23 \text{ \% proteína}$$

En el mezclado

$$107,6*(y) = 53,8*(0,23)$$

$$y = 0,12 \text{ \% proteína}$$

En el secado

$$107,6*(13,65) = A*(90,91)$$

$$A = 16,16 \text{ gramos muestra seca}$$

$$107,6*(0,12) = 16,16*(z)$$

$$z = 0,84 \text{ \% proteína}$$

$$53,8*(2,3) + 53,8*(25) = 107,6*(w)$$

$$w = 13,65 \text{ \% sólidos}$$

