



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**TEMA**

---

**“OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO CON BROMELINA A PARTIR DE PIÑA (*Ananas comosus*), Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUSTRATOS PROTEÍNICOS”**

---

Trabajo de investigación (Graduación). Modalidad: Seminario de graduación. Presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**AUTORA:** Violeta Maricela Dalgo Flores

**TUTOR:** Ing. Juan de Dios Alvarado. M.Sc

AMBATO – ECUADOR

2012

## **APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS**

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: **“OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO CON BROMELINA A PARTIR DE PIÑA (*Ananas comosus*), Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUSTRATOS PROTEÌNICOS”**, de la estudiante Violeta Maricela Dalgo Flores egresada de la Carrera de Ingeniería Bioquímica considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado.

Ambato, Septiembre del 2012

---

Ing. Juan de Dios Alvarado. M.Sc.

**TUTOR**

## **AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: **“OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO CON BROMELINA A PARTIR DE PIÑA (*Ananas comosus*), Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUSTRATOS PROTEÍNICOS”**, así como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta corresponden exclusivamente a Violeta Maricela Dalgo Flores, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Septiembre del 2012

---

Srta. Violeta Dalgo Flores

**AUTORA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**  
**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el informe de investigación, sobre el tema: **“OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO CON BROMELINA A PARTIR DE PIÑA (*Ananas comosus*), Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUSTRATOS PROTEÍNICOS”** de la estudiante: Violeta Maricela Dalgo Flores.

Ambato, Septiembre del 2012

Por constancia firman:

---

Ing. MBA Romel Rivera

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

---

Ing. Mario Manjarrez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

---

Ing. William Teneda

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiar mi camino.

A mis padres, Héctor y Violeta, a mi abuelita Ofir,

A mis queridas hermanas Geovy y Gaby, y a Lili  
que son mi fortaleza diaria, y el pilar para alcanzar mis metas.

A mis amigos y compañeros de aula que me han

brindado su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

Presento mi sentido agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, que me han permitido cumplir con el sueño de mi vida.

Agradezco también a aquellos profesores de mi facultad quienes con sus consejos y aprendizaje supieron guiarme en el desarrollo de mi tesis de grado.

Un sincero agradecimiento a mi tutor de tesis Ing. Juan Alvarado por su apoyo incondicional, y por brindarme sus conocimientos, orientaciones, y motivación, que han sido fundamentales para mi formación como investigadora.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>PÁGINAS PRELIMINARES</b>	
Portada	i
Aprobación del tutor de tesis	ii
Autoría de la investigación	iii
Aprobación del tribunal de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice general	vii
Índice de tablas	xi
Índice de figuras	xii
Índice de ecuaciones	xii
Índice de anexos	xii
Resumen ejecutivo	xviii
INTRODUCCIÓN	1

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

<b>1.1 Tema de investigación</b>	2
<b>1.2 Planteamiento del problema</b>	2
1.2.1 Contextualización	3
1.2.1.1 Macro	3
1.2.1.2 Meso	4
1.2.1.3 Micro	5
1.2.2 Análisis crítico	6
1.2.3 Prognosis	7
1.2.4 Formulación del problema	7
1.2.5 Preguntas directrices	7
1.2.6 Delimitación del objeto de investigación	8
<b>1.3 Justificación</b>	8
<b>1.4 Objetivos</b>	9
1.4.1 General	9
1.4.2 Específicos	10

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

<b>2.1 Antecedentes investigativos</b>	11
<b>2.2 Fundamentación filosófica</b>	15
<b>2.3 Fundamentación legal</b>	18
<b>2.4 Categorías fundamentales</b>	22
2.4.1 Marco teórico de la variable independiente	22
2.4.2 Marco teórico de la variable dependiente	30
<b>2.5 Hipótesis</b>	34
<b>2.6 Señalamiento de variables</b>	34



## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

<b>3.1 Enfoque</b>	35
<b>3.2 Modalidad básica de la investigación</b>	36
<b>3.3 Nivel o tipo de investigación</b>	36
<b>3.4 Población y muestra</b>	37
3.4.1 Población	37
3.4.2 Muestra	37
<b>3.5 Operacionalización de variables</b>	38
<b>3.6 Recolección de información</b>	38
3.6.1 Obtención del jugo de piña	38
3.6.2 Extracción de bromelina	39
3.6.3 Concentración de la bromelina	39
3.6.4 Determinación de la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina	40
3.6.4.1 Determinación de la constante K del viscosímetro de Cannon – Fenske	41
3.6.4.2 Determinación de la densidad de los sustratos proteínicos de hidrólisis	42
3.6.4.3 Medición de la viscosidad de la leche y jugo de carne al adicionar el concentrado proteínico de bromelina	43
3.6.4.3.1 Preparación de las muestras	43
3.6.4.3.2 Medición de la viscosidad	43
3.6.5 Diseño experimental	44
3.6.5.1 Diseño factorial 2 <sup>2</sup>	44
3.6.5.2 Diseño de bloques completos	46
<b>3.7 Procesamiento y análisis</b>	47

## **CAPITULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

<b>4.1 Análisis de los resultados</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Interpretación de datos</b>	<b>51</b>
4.2.1 Humedad y materia seca de los concentrados proteínicos	51
4.2.2 Constante K de los viscosímetros de Cannon – Fenske	52
4.2.3 Densidad y viscosidad de los sustratos	52
4.2.4 Viscosidad de los sustratos al adicionar los concentrados proteínicos de bromelina	53
4.2.5 Actividad enzimática	55
4.2.6 Gráficas	56
4.2.7 Análisis estadístico	58
<b>4.3 Verificación de la hipótesis</b>	<b>60</b>

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

<b>5.1 Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Recomendaciones</b>	<b>63</b>

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

<b>6.1 Datos informativos</b>	<b>65</b>
<b>6.2 Antecedentes de la propuesta</b>	<b>66</b>
<b>6.3 Justificación</b>	<b>67</b>

<b>6.4 Objetivos</b>	68
6.4.1 General	68
6.4.2 Específicos	68
<b>6.5 Análisis de factibilidad</b>	69
<b>6.6 Fundamentación</b>	70
<b>6.7 Metodología</b>	72
<b>6.8 Administración</b>	74
<b>6.9 Previsión de la evaluación</b>	75

## MATERIALES DE REFERENCIA

<b>Bibliografía</b>	77
---------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas de la bromelina	29
<b>Tabla 2.</b> Operacionalización de la variable independiente y dependiente	38
<b>Tabla 3.</b> Esquema del diseño factorial 2 <sup>2</sup>	45
<b>Tabla 4.</b> Esquema del diseño de bloques completos	46
<b>Tabla 5.</b> Costos de la propuesta de investigación	70
<b>Tabla 6.</b> Modelo operativo (Plan de acción)	73
<b>Tabla 7.</b> Administración de la propuesta	74
<b>Tabla 8.</b> Previsión de la evaluación	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Niveles estructurales de las proteínas	23
<b>Figura 2.</b> Evolución energética de una reacción química	25
<b>Figura 3.</b> Modelo llave – cerradura de Fisher	26
<b>Figura 4.</b> Estructura de la bromelina	29
<b>Figura 5.</b> Viscosímetro de Cannon – Fenske	33

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje de humedad	40
<b>Ecuación 2.</b> Porcentaje de materia seca	40
<b>Ecuación 3.</b> Constante K del viscosímetro de Cannon – Fenske	41
<b>Ecuación 4.</b> Densidad absoluta de la muestra	42
<b>Ecuación 5.</b> Viscosidad	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

### ANEXO A. TABLAS DE RESULTADOS

<b>Tabla A1.</b> Humedad y materia seca de los concentrados proteínicos con bromelina en etanol y NaCl.	
---	--

**Tabla A2.** Constante K de los viscosímetros Cannon - Fenske para la medida de viscosidad.

**Tabla A3.** Densidad y viscosidad de la leche y jugo de carne.

**Tabla A4.** Viscosidad de la leche con concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol.

**Tabla A5.** Viscosidad de la leche con concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl.

**Tabla A6.** Viscosidad de la leche con bromelina comercial.

**Tabla A7.** Viscosidad del jugo de carne con concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol.

**Tabla A8.** Viscosidad del jugo de carne con concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl.

**Tabla A9.** Viscosidad del jugo de carne con bromelina comercial.

**Tabla A10.** Valores de la actividad enzimática de los sustratos de hidrólisis con concentrados proteínicos de bromelina.

## **ANEXO B. GRÁFICAS**

**Gráfica B1.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B2.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación lineal.

**Gráfica B3.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B4.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación lineal.

**Gráfica B5.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B6.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación lineal.

**Gráfica B7.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B8.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación lineal.

**Gráfica B9.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B10.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación lineal.

**Gráfica B11.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.

**Gráfica B12.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación lineal.

## **ANEXO C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Tabla C1.** Optimización del diseño factorial  $2^2$ .

**Gráfica C1.** Optimización del diseño factorial  $2^2$

**Gráfica C2.** Respuesta de superficie.

**Tabla C2.** Diseño de bloques completos.

**Tabla C3.** Prueba de comparación múltiple Tukey al 95% para los diferentes tratamientos.

**Gráfica C3.** Prueba de Tukey al 95% para los tratamientos.

**Tabla C4.** Cuadro de análisis de varianza.

## **ANEXO D. FOTOGRAFÍAS**

**Fotografía D1.** Selección de la piña

**Fotografía D2.** Fraccionamiento

**Fotografía D3.** Molienda

**Fotografía D4.** Jugo de piña

**Fotografía D5.** Jugo de piña con NaCl y etanol

**Fotografía D6.** Congelación

**Fotografía D7.** Centrifugación

**Fotografía D8.** Precipitados

**Fotografía D9.** Precipitados en NaCl y etanol

**Fotografía D10.** Pesado

**Fotografía D11.** Secado

**Fotografía D12.** Concentrados de bromelina en NaCl y etanol

**Fotografía D13.** Pesado de la leche

**Fotografía D14.** Mezcla en agua a 40°C

**Fotografía D15.** Densidad de la leche

**Fotografía D16.** Adición del concentrado proteínico en la leche

**Fotografía D17.** Muestras en congelación



**Fotografía D18.** Medición de la viscosidad de la leche

**Fotografía D19.** Molienda de la carne

**Fotografía D20.** Obtención del jugo

**Fotografía D21.** Filtración

**Fotografía D22.** Densidad del jugo de carne

**Fotografía D23.** Adición del concentrado proteínico en el jugo de carne

**Fotografía D24.** Muestras en congelación

**Fotografía D25.** Medición de la viscosidad del jugo de carne

## RESUMEN EJECUTIVO

En esta investigación se efectuó el estudio de la actividad enzimática de un concentrado de bromelina a partir de piña (*Ananas comosus*) en dos sustratos proteínicos de hidrólisis, leche y jugo de carne.

El Ecuador al ser un país muy diverso en frutas y aplicado a la Biotecnología podría extraer enzimas presentes en dichos materiales. La bromelina es una enzima que se extrae del jugo de piña, y que presenta varias aplicaciones.

En el proyecto de investigación se realizó la extracción y concentración de la proteasa de la piña y la determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos, ya que se conoce que esta enzima presenta varias aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica y en la medicina. Se utilizó como materia prima piñas de la variedad milagreña, en estado de maduración verde, porque se conoce que en ese estadio las enzimas tienen mayor actividad sobre el sustrato. El jugo de piña fue extraído de la pulpa, y fue sometido a un proceso de precipitación de proteínas mediante precipitación alcohólica y salina, utilizando etanol al 96% y NaCl al 10% respectivamente. Posteriormente se realizó el proceso de concentrado de las muestras extracto-etanol y extracto-NaCl mediante el método de secado en estufa. Para determinar la actividad enzimática del concentrado de bromelina sobre el sustrato, se basó en el método de coagulación de la leche propuesto por Balls y Hoover, el mismo que fue validado al medir la variación de viscosidad de las muestras de leche con adición del concentrado de bromelina, utilizando el viscosímetro de Cannon – Fenske. Se quiso utilizar otro sustrato para comprobar la acción del concentrado de bromelina, y se utilizó jugo de carne, su obtención se realizó mediante un método propuesto por la investigadora. De la misma manera que para el sustrato leche, se determinó la variación de la viscosidad del jugo de carne

al adicionar 0,1g de concentrado de bromelina disuelto en 100ml de vinagre natural. Se realizó entonces una adaptación del método de coagulación de la leche al jugo de carne, en donde también se observó que su viscosidad va aumentando conforme aumenta el tiempo de acción del concentrado de bromelina, demostrando que se da la hidrólisis de enlaces peptídicos de sus proteínas como son caseína y actina respectivamente.

Los resultados indicaron que el etanol permite una mayor precipitación de proteínas, por lo tanto su concentrado presenta mayor bromelina, acoplándose así de mejor manera a los sustratos, y en especial al jugo de carne.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la demanda de productos mejores, así como de procesos industriales óptimos, donde los beneficios sean para el consumidor, la industria y el medio ambiente, incentiva el estudio de nuevas tecnologías para lograr dicha meta.

En Ecuador existe gran biodiversidad de plantas con principios activos aplicados, tal es el caso de las enzimas proteasas, las cuales pueden utilizarse en la elaboración de muchos productos, en diversas industrias como las de alimentos, farmacéuticas, entre otras.

Las proteasas son enzimas proteolíticas que cumplen una importante función en el desarrollo de las reacciones inherentes al metabolismo de la planta y existen varios estudios desarrollados que demuestran que las proteasas, desempeñan un rol importante en la patofisiología de muchas enfermedades. Se ha despertado interés en su estudio, tanto en lo concerniente a su actividad enzimática, su efecto sobre distintos sustratos y también en lo relacionado a sus inhibidores. Las proteasas constituyen una muy larga y compleja agrupación de enzimas usadas para transformar proteínas en simples péptidos.

La piña contiene diversas enzimas entre las que se destacan las proteasas, sobresaliendo la bromelina que es una glicoproteína básica del grupo de las cisteín proteasas. Es una proteína constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre, la misma que ha reportado varios usos.

El desarrollo de este proyecto consiste en extraer, y concentrar bromelina a partir de pulpa de piña (*Ananas comosus*). Planta cuya actividad enzimática mostró buenos resultados sobre los sustratos de hidrólisis seleccionados.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

#### **1.1 Tema de investigación**

Obtención de un concentrado con bromelina a partir de piña (*Ananas comosus*), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos.

#### **1.2 Planteamiento del problema**

En Ecuador existe gran diversidad de frutas con principios activos, por ejemplo las enzimas, las cuales mediante su aislamiento y purificación pueden ser aplicadas en diferentes áreas de la industria como en la farmacéutica, alimentaria, química, textil, otras. Motivo por el cual, la presente investigación se realizó con la finalidad de dar estudios previos a la obtención de enzimas puras, desarrollando un método químico que permite obtener un concentrado proteínico con la enzima bromelina contenida en la pulpa de la piña, así como la determinación de parámetros de cinética enzimática, datos que son necesarios para monitorizar las reacciones.

## **1.2.1 Contextualización**

### **1.2.1.1 Macro**

(RAJESHA et al., 2006), citado por (FÉLIX, 2008), menciona que la mayor parte de la producción mundial de enzimas está destinada a la obtención de proteasas, las cuales son enzimas proteolíticas que cumplen una importante función en el desarrollo de las reacciones inherentes al metabolismo de la planta y existen varios estudios desarrollados que demuestran que las proteasas, desempeñan un rol muy importante en la patofisiología de muchas enfermedades. Se ha despertado el interés en su estudio, tanto en lo concerniente a su actividad enzimática, su efecto sobre sustratos y en lo relacionado a sus inhibidores.

La producción mundial de proteasas representa el 38 % del total de enzimas obtenidas, si a esto se adiciona la producción de renina (10 - 15 %) y otras como la papaína; CARVAJAL y otros (2010) concluyen que en la actualidad la mayor parte de la producción de enzimas está destinada a la obtención de proteasas.

Unas 20 compañías de Europa, Japón y Estados Unidos realizan la producción de enzimas, pero el mercado es dominado por 3 de ellas: Novo Nordisk (Dinamarca) con el 50% de las ventas a nivel mundial, seguida por Gist Brocades (Neatherlands) y Rhom and Haas (Alemania), este último país ha adoptado recientemente un gran interés en la investigación de la bromelina obtenida de la piña, la cual es actualmente la décima tercera enzimas más utilizada en este país (GODFREY Y REICHELTL) citado por (ELIÉCER, 2003).

En América latina existen empresas productoras de enzimas en México, Brasil, Argentina y Uruguay, muchas de las cuales son subsidiarias de empresas transnacionales, como es el caso de Pfizer en México y Brasil, y

Novo en Brasil (IZQUIERDO Y DE LA RIVA, 2000) citado por (ELIÉCER, 2003).

Una de las proteasas más producidas a nivel mundial es la bromelina la cual se obtiene de la piña, este es el segundo cultivo tropical de importancia mundial después del banano, aportando más del 20% del volumen mundial de frutos tropicales. 70% de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca por el país que la produce. Esta enzima bromelina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas. Se extrajo por primera vez del jugo de la piña a finales del siglo XIX.

Los principales países productores de bromelina a nivel mundial son Estados Unidos, Tailandia y Sudáfrica, los cuales son líderes en la producción de piña del tipo cayena y española, que son las más adecuadas para la producción de esta enzima, dado que contienen concentraciones aceptables de bromelina.

En su mayoría las empresas productoras de bromelina, realizan procesos de alto nivel, ya que trabajan bajo las normas GMP (Good Manufacturing Practices) (PULIDO, 2007).

#### **1.2.1.2 Meso**

La bromelina es una enzima proteasa contenida en la piña, en Ecuador de acuerdo a la información del Tercer Censo Nacional Agropecuario realizado por el INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) la superficie plantada de piña es de 5750 hectáreas (CASILARI e HIDALGO, 2007).

CUADRADO (2009) indica que, las principales zonas de cultivo de piña en el país se encuentran cerca de las poblaciones de Naranjito, Yaguachi, Milagro, Huaquillas, Arenillas, Pasaje, Buena Fe, Valencia, Portoviejo, Chone, El Carmen, Santo Domingo, San Lorenzo.

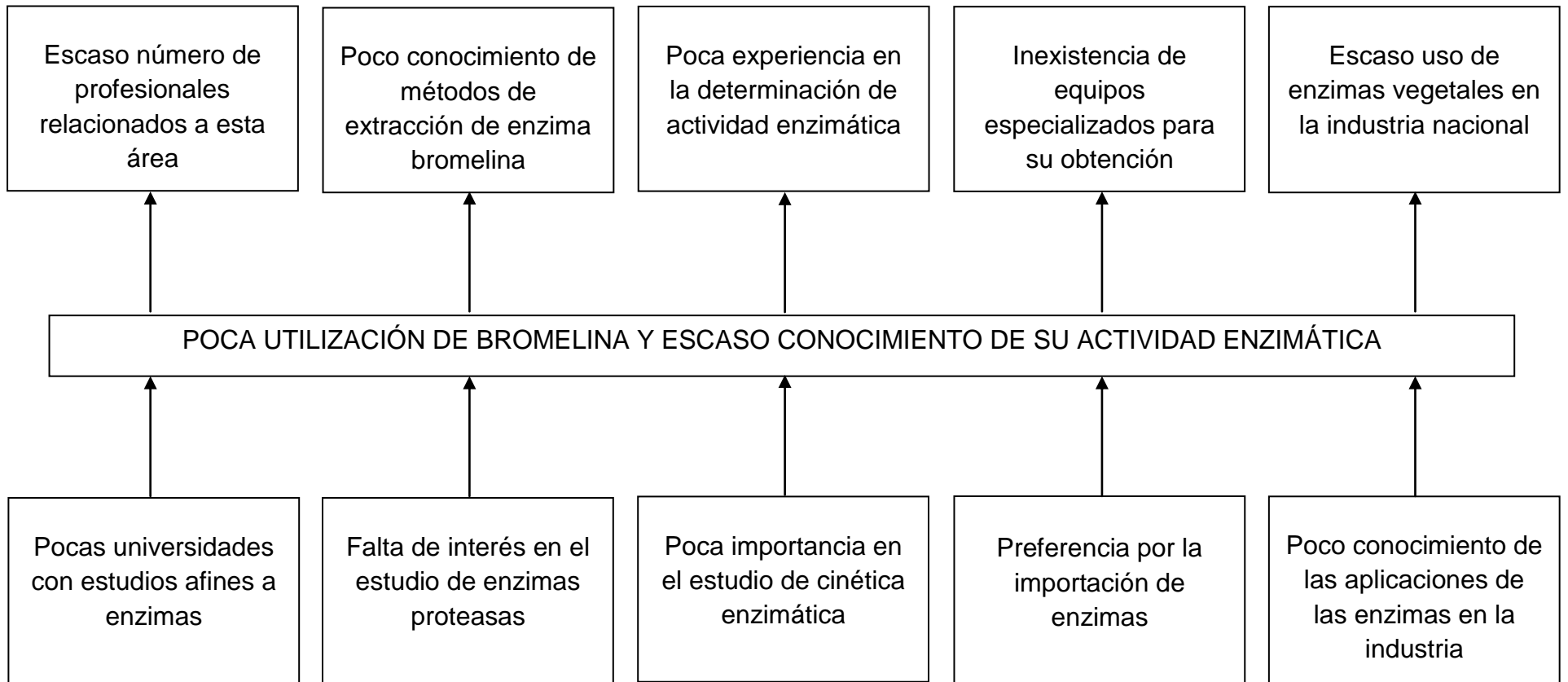
En el país no existen empresas especializadas en la producción de enzimas, sin embargo, al momento se están realizando investigaciones de enzimas proteasas de ciertas frutas, como son del babaco, hierba mora e higuerón, en la Escuela Politécnica Nacional, y de toronche y papaya en la Escuela Superior Politécnica del Litoral. En ambas instituciones se observan buenos resultados en los métodos aplicados, y pretenden continuar con el trabajo para llegar a la industrialización de las enzimas.

#### **1.2.1.3 Micro**

A nivel de Tungurahua, se realizó estudios sobre enzimas vegetales en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, sobre la obtención, y concentración de bromelina, papaína, y ficina, y la determinación de su actividad enzimática según el grado de maduración de la fruta; investigaciones realizadas para optar por el título de Ingeniero Bioquímico (ROBAYO y otros, 2011).



### 1.2.2 Análisis crítico



Elaborado por: DALGO, 2011.

### **1.2.3 Prognosis**

Al no ejecutarse la presente investigación sobre la obtención de un concentrado proteínico de bromelina y la determinación de su actividad enzimática, no se contará con una metodología realizada a nivel de laboratorio que permita la extracción y la concentración de bromelina.

Además que no se dispondrá de datos de cinética enzimática y su metodología, los cuales son necesarios para la purificación de la enzima e investigaciones posteriores.

Asimismo, no se conocerá información de los principios activos que contienen las frutas del país y su aplicación en la medicina y en la industria.

### **1.2.4 Formulación del problema**

¿Por qué hay poca utilización de bromelina y escaso conocimiento de su actividad enzimática?

### **1.2.5 Preguntas directrices**

¿Cuál es el método químico que se aplicará para la obtención de un concentrado proteínico de bromelina a partir de pulpa de piña?

¿Cómo se determinará la viscosidad de la leche y jugo de carne al adicionar el concentrado proteínico de bromelina?

¿De qué manera se establecerá la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina en los sustratos de hidrólisis, leche y jugo de carne?

### **1.2.6 Delimitación del objeto de investigación**

**Área:** Bioquímica

**Subárea:** Enzimología

**Sector:** Cinética enzimática

**Subsector:** Enzimas proteasas

**Delimitación espacial:** Laboratorio de ingeniería de procesos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

**Delimitación temporal:** Noviembre 2011 – Junio 2012.

### **1.3 Justificación**

El proyecto de investigación es de interés, ya que se conoce que la enzima bromelina tiene varias aplicaciones, es así que se utiliza como ablandadora de carnes, suplemento alimenticio, y se ha descrito que muestra varias acciones farmacológicas, entre otras. Es decir que esta enzima se utiliza en el área de la medicina y la industria. En el país, al contar con gran diversidad de frutas que poseen estos principios activos, es necesario estudiarlos y establecer métodos que permitan su obtención.

Es de importancia esta investigación pues los avances biotecnológicos impulsan a un mayor estudio en el área de enzimología, y mejoramiento de los métodos de obtención y concentración de enzimas. En la presente investigación lo que se obtuvo es un concentrado proteínico de bromelina, es decir que no se logró una enzima pura, esto debido a que los métodos para la purificación requieren de equipos de alta tecnología. El trabajo experimental se basó en la aplicación de un método químico para la

extracción, que incluye la utilización de una solución salina (NaCl) y un alcohol (etanol). También es de interés el estudio de cinética enzimática, parámetros que son necesarios para conocer el estado de las reacciones químicas, y para implementar posteriores procesos de purificación de enzimas.

En este proyecto se determinó la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina aplicando un método seleccionado, en donde los datos procedieron de mediciones de viscosidad de la acción del concentrado de enzima en muestras de leche y jugo de carne.

Esta investigación fue factible realizarse en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, ya que se implementó una metodología que permitió la obtención del concentrado proteínico de bromelina y la determinación de su actividad enzimática, sin la utilización de equipos de alta tecnología, sino más bien empleando métodos simples, pero de gran rendimiento.

El proyecto aporta con una investigación de enzimas proteasas extraídas de frutas, siendo una iniciativa para estudios posteriores en esta área.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 General**

Determinar un método para la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña (*Ananas comosus*), y la determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos.

### 1.4.2 Específicos

- Aplicar un método químico para la obtención de un concentrado proteínico de bromelina a partir de pulpa piña (*Ananas comosus*).
- Determinar la viscosidad de la leche y jugo de carne al adicionar los concentrados proteínicos de bromelina, utilizando el viscosímetro de Cannon – Fenske.
- Establecer la actividad enzimática de los concentrados proteínicos de bromelina en los sustratos de hidrólisis, leche y jugo de carne, mediante un método gráfico de regresión lineal.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

En los últimos años se ha efectuado trabajos investigativos a nivel mundial que tienen mucha relación con el tema propuesto. Así, CARVAJAL y otros (2010), indica que la piña se utilizó como planta medicinal por varias culturas nativas. La bromelina es una cisteíno-proteasa, aislada y purificada a partir de diferentes órganos de plantas de la familia *Bromeliaceae*. Como resultado de su investigación mencionan que los sistemas de purificación batch y semi-batch ofrecen simplicidad, factibilidad de escalado, alta capacidad de procesamiento de muestra, y reproducibilidad del procedimiento cromatográfico. El preparado obtenido por cromatografía de intercambio iónico es un producto heterógeno en actividades proteolíticas, con una actividad específica alta y comparable con la de otros preparados utilizados en la terapéutica (0,5 U/mg). La determinación de la masa molar por espectroscopia de masa mostró un valor de 24.500 Da. Esta identificación constituye un control de calidad de los preparados enzimáticos, lo que demuestra sus potencialidades de uso en la industria y la biomedicina.

GAUTAM y otros (2010), mencionan que la bromelina es una proteínasa principal, aislada de la piña (*Ananas comosus*). El objetivo del estudio fue comparar la cantidad y actividad de la bromelina presente en el tallo y la fruta de la planta. La bromelina fue aislada de los tallos y los frutos de las plantas de piña madura por extracción con solución de buffer acuosa amortiguada. La purificación de la enzima se llevó a cabo por centrifugación, técnica de precipitación de sales, diálisis, cromatografía de intercambio iónico y la estimación por el método de Lowry. La bromelina fue ensayada por su actividad mediante la hidrólisis de la gelatina, representado mediante el uso de unidad de digestión de gelatina. La homogeneidad de la bromelina fue confirmada por el análisis SDS-PAGE (sodio dodecilsulfato-poliacrilamida por electroforesis en gel). Se encontró que la mejor actividad es de la bromelina de fruta. Por otra parte, la cromatografía de intercambio iónico con dietilaminoetil celulosa (DEAE), mantiene la integridad estructural de la bromelina purificada y por lo tanto el producto exhibe una mejor actividad proteolítica.

En Malasia, el estudio denominado "Pilot scale extraction of proteolytic enzyme bromelain from pineapple (*Ananas comosus*)" PEI y otros (2005), mencionan que el propósito del estudio fue desarrollar un proceso de extracción de bromelina a escala piloto. El método de extracción de bromelina con base de frutas de piña en este estudio ha dado un contenido de proteína total de 9,33 mg/ml con una actividad proteolítica de 1400 GDU/ml. Un aumento en el ciclo de homogenización para aumentar la producción de enzimas ha demostrado ser exitoso. Una triple homogenización ha mostrado tres veces mayor su actividad proteolítica.

En la investigación realizada en la Habana Cuba, denominada "Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña", HERNÁNDEZ y otros (2003), mencionan que la bromelina es una proteasa aislada de órganos de plantas de piña con un amplio espectro de acciones

farmacológicas y alimenticias. Se diseñó y patentó un procedimiento de extracción de bromelina en el que se utilizaron protectores del centro activo de la enzima a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo. El perfeccionamiento de la tecnología demostró que se alcanzan rendimientos de 20,8 g de producto/kg de tallos y 3,9 g de proteínas/kg de tallos, con una actividad específica de 1,36 U/mg. El procedimiento de extracción se puede escalar y tanto en planta piloto como a escala industrial se logran rendimientos en términos de actividad superiores al 72% de los obtenidos en el laboratorio. La purificación mediante la combinación de métodos cromatográficos hizo factible el aislamiento, a partir del preparado crudo de tallo.

A nivel de América Latina también se han realizado estudios de la enzima bromelina, es así que en Brasil, FRATTINI y otros (s.f) en su investigación sobre la optimización de extracción de bromelina por micelas invertidas a base de frutas de piña, indican que la bromelina de la fruta (EC 3.4.22.5) se obtuvo a partir de extracto de frutas de la piña de las especies Perola. Con el fin de evitar la desnaturalización de la enzima en el proceso de purificación, el presente trabajo estaba preocupado por la optimización de las condiciones para la extracción líquido-líquido de micelas invertidas. En el diseño factorial fraccionado de experimentos (que se ejecuta por lotes), se encontró que el factor de purificación máximo obtenido fue de aproximadamente 3 y los mejores valores de las variables independientes: agente tensoactivo, co-solventes y concentraciones de sal, el pH de las extracciones, fueron respectivamente: 100 mm, 10% v/v, 1 M, 3,5 y 8. En términos del factor de purificación, los resultados mostraron la gran eficacia de los impulsos en el equipo de micro-columna, en comparación con la extracción de lotes y la fase dos que corresponde a la extracción acuosa de la bromelina.



GALLARDO y otros (s.f), en su investigación denominada extracción de bromelina a partir de residuos de piña, concluyen que las mejores condiciones para la extracción de la bromelina fueron con el solvente etanol, temperatura de -10 °C y durante un tiempo de reposo de 7 días. La mayor cantidad de proteínas se encuentran en la cáscara, sin embargo esta tiene la menor actividad enzimática y específica. La bromelina extraída de cáscara de piña tiene un menor costo con respecto a la de las demás partes del fruto ya que es un residuo agroindustrial. Los resultados obtenidos son prometedores para que con un mayor grado de purificación sea factible aplicar esta enzima en tratamientos biomédicos.

RAMOS y otros (s.f) en los resultados de su investigación sobre la obtención de bromelina a partir de desechos agroindustriales de la piña, indican que en los tratamientos realizados, se observó una mejor actividad específica de la bromelina, en los tratamientos que se realizaron entre: Acetona con jugo y cáscara, y vinagre con jugo y cáscara. En las coronas se observó una pequeña cantidad de proteínas pero nada de actividad específica. En cuanto a las conclusiones, establecieron que, la utilización de los desperdicios de frutos no aprovechados porque ya cumplieron su vida útil, podrían emplearse para la obtención de enzimas proteolíticas.

La generación de hidrolizados proteínicos se podría hacer in situ, o realizando extracciones a través de un proceso tecnológico con precipitaciones con disolventes como acetona y vinagre.

Las enzimas proteasas aisladas de plantas de la familia Bromeliaceae se utilizan ampliamente en la industria médica, biotecnológica y alimenticia. Los estudios realizados en los últimos años sobre la actividad contra metástasis y tumores de las cisteíno-proteasas hacen que se incremente el interés por explorar nuevas fuentes naturales de obtención de fitoproteasas. En el trabajo realizado por PÉREZ y otros. (2006), se evaluó la actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos a partir de diferentes

órganos de plantas de la familia Bromeliaceae. Se colectaron y clasificaron cinco grupos. Las plantas que se colectaron pertenecen a 3 géneros de la mencionada familia: 3 grupos son del género *Tillandsia*, 1 es del género *Guzmania* y otro del género *Hohenbergia*. Los mayores índices de actividad específica (3,3 U/mg de proteínas) se obtuvieron en los preparados obtenidos a partir de diferentes órganos de *Hohenbergia penduliflora* Mez, de cuyos extractos obtenidos se evaluó la influencia del pH de extracción y la actividad específica fue superior al realizarla a pH 3 a partir de sus tallos. En los últimos años existen muchas investigaciones encaminadas a explicar los mecanismos de activación de las cisteíno proteasas *in vivo*. Se ha demostrado claramente que la activación de estas enzimas depende del pH. Los autores sugieren un predominio de moléculas de enzima activa a pH ácido y está claro que las variaciones de pH neutro a pH ácido en las vacuolas provocan cambios en la conformación nativa de la enzima inactiva, lo que permite el procesamiento y plegamiento de la enzima activa. Las proteasas presentes en los extractos enzimáticos de *H. penduliflora* Mez, pudieran tener usos similares a las obtenidas a partir de *A. comosus* L.

A nivel nacional, en la carrera de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Técnica de Ambato existe un estudio sobre la extracción, concentración y cuantificación de la enzima bromelina de la piña, en la que ROBAYO (2011), concluye que la extracción de la enzima es eficiente al macerar la fruta, y concentrarla mediante un método de secado, a una temperatura de 30°C, que es la más eficiente ya que a esta temperatura no hay desnaturalización de la proteína. Indicó además que la mayor actividad enzimática de la bromelina, cuantificada por viscosidad, es con el grado de maduración verde.

## **2.2 Fundamentación filosófica**

Los paradigmas son realizaciones científicas universalmente reconocidas (dogmáticas) que, durante cierto tiempo proporcionan modelos de

problemas y soluciones a una comunidad científica en particular (CONTRERAS, 2004).

El presente proyecto de investigación se basa en el paradigma científico **Positivista**.

El paradigma positivista, también llamado hipotético-deductivo, cuantitativo, empírico-analista o racionalista, tiene como fundamento filosófico el positivismo. Fue creado para estudiar los fenómenos en el campo de las ciencias naturales, pero después también fue utilizado para investigar en el área de las ciencias sociales, sin tener consideración las diferencias que existen entre ambas.

La investigación positivista asume que está regido por leyes, las cuales permiten explicar, predecir y controlar los fenómenos. En consecuencia, la finalidad de las ciencias está dirigida a descubrir esas leyes, a arribar generalizaciones teóricas que contribuyan al enriquecimiento de un conocimiento de carácter universal.

Para el paradigma positivista el estudio del conocimiento existente en un momento dado conduce a la formulación de nuevas hipótesis, en las cuales se interrelacionan variables, cuya medición cuantitativa, permitirá comprobarlas o refutarlas en el proceso de investigación. Se busca una correlación o causa-efecto, donde los investigadores han de mantener una actitud neutral frente a los fenómenos. El experimento y la observación son considerados los métodos fundamentales del conocimiento científico. Los resultados y objetivos cuantificados experimentalmente, determinarán o no la validez de la predicción inicial.

Para arribar a la fiabilidad de los resultados se necesita delimitar con criterios estadísticos una muestra representativa de una determinada población. Solo así los resultados alcanzados pueden considerarse con

validez universal, aplicables a cualquier contexto y situación (GONZÁLEZ, 2003).

La obtención de un concentrado de bromelina y la determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos, se basa en el paradigma **positivista** ya que se centra en la búsqueda de nuevos conocimientos y su generalización. Además que la metodología empleada es de tipo **cuantitativa**, ya que se determinó la actividad enzimática de bromelina mediante la medición de la viscosidad en dos sustratos de hidrólisis, obteniéndose datos que son analizados para establecer el rendimiento de la metodología empleada. También se utiliza este paradigma ya que el escenario a utilizarse en la investigación es a nivel de **laboratorio**, empleando ciertas metodologías que pueden ser ejecutadas en el mismo.

Así también, la investigación se basa en el **método inductivo**, que es un modo de razonar que nos lleva: De lo particular a lo general, es decir: De una parte a un todo.

Inducir es ir más allá de lo evidente. La generalización de los eventos es un proceso que sirve de estructura a todas las ciencias experimentales, ya que éstas, como la física, la química y la biología se basan (en principio) en la observación de un fenómeno (un caso particular) y posteriormente se realizan investigaciones y experimentos que conducen a los científicos a la generalización.

En términos muy generales, consiste en establecer enunciados universales ciertos a partir de la experiencia, esto es, ascender lógicamente a través del conocimiento científico, desde la observación de los fenómenos o hechos de la realidad a la ley universal que los contiene. Resumiendo las palabras de Mill. 1973, las investigaciones científicas comenzarían con la observación de los hechos, de forma libre y carente de prejuicios. Con posterioridad, y mediante inferencia, se formulan leyes universales sobre los

hechos y por inducción se obtendrían afirmaciones aún más generales que reciben el nombre de teorías.

Según este método, se admite que cada conjunto de hechos de la misma naturaleza está regido por una Ley Universal. El objetivo científico es enunciar esa Ley Universal partiendo de la observación de los hechos. (PLANEACIÓN ESTRATÉGICA, 2009).

### **2.3 Fundamentación legal**

La ejecución de la presente investigación se fundamenta en los siguientes artículos de la Constitución política de la república del Ecuador, expedida por la Asamblea Nacional Constituyente.

## **TÍTULO II**

### **DERECHOS**

#### **Capítulo segundo**

#### **Derechos del buen vivir**

##### **Sección primera**

##### **Agua y alimentación**

**Art. 13.-** Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria.

## TÍTULO VII

### RÉGIMEN DEL BUEN VIVIR

#### Capítulo primero

#### Inclusión y equidad

##### Sección octava

##### Ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales

**Art. 386.-** El sistema comprenderá programas, políticas, recursos, acciones, e incorporará a instituciones del Estado, universidades y escuelas politécnicas, institutos de investigación públicos y particulares, empresas públicas y privadas, organismos no gubernamentales y personas naturales o jurídicas, en tanto realizan actividades de investigación, desarrollo tecnológico, innovación y aquellas ligadas a los saberes ancestrales.

El Estado, a través del organismo competente, coordinará el sistema, establecerá los objetivos y políticas, de conformidad con el Plan Nacional de Desarrollo, con la participación de los actores que lo conforman.

**Art. 387.-** Será responsabilidad del Estado:

1. Facilitar e impulsar la incorporación a la sociedad del conocimiento para alcanzar los objetivos del régimen de desarrollo.
2. Promover la generación y producción de conocimiento, fomentar la investigación científica y tecnológica, y potenciar los saberes ancestrales, para así contribuir a la realización del buen vivir, al sumak kawsay.

3. Asegurar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, el usufructo de sus descubrimientos y hallazgos en el marco de lo establecido en la Constitución y la Ley.
4. Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, el ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.
5. Reconocer la condición de investigador de acuerdo con la Ley (ASAMBLEA CONSTITUYENTE, 2008).

A nivel mundial, en el **Codex Alimentarius 2011**, se establece que la bromelina es un **aditivo alimentario**. La “Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios” (GSFA, Codex STAN 192-1995) indica que su uso está justificado únicamente si ello ofrece alguna ventaja, no presenta riesgos apreciables para la salud de los consumidores, no induce a error a éstos, y cumple una o más de las funciones tecnológicas establecidas por el Codex. Sus requisitos se indican a continuación:

- a) Conservar la calidad nutricional del alimento; una disminución intencionada en la calidad nutricional de un alimento estaría justificada en las circunstancias indicadas en el subpárrafo b) y también en otras circunstancias en las que el alimento no constituye un componente importante de una dieta normal.
- b) Proporcionar los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas especiales.

- c) Aumentar la calidad de conservación o la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas, a condición de que ello no altere la naturaleza, sustancia o calidad del alimento de forma que engañe al consumidor.
  
- d) Proporcionar ayuda en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento del alimento, a condición de que el aditivo no se utilice para encubrir los efectos del empleo de materias primas defectuosas o de prácticas (incluidas las no higiénicas) o técnicas indeseables durante el curso de cualquiera de estas operaciones.

La intención del sistema internacional de numeración de aditivos alimentarios (SIN) es que sea un sistema de denominación armonizado para aditivos alimentarios, como alternativa al uso del nombre específico.

### **Bromelina (1101(iii))**

Bromelina es un aditivo alimentario y como tal se puede utilizar en algunos alimentos en las condiciones de buenas prácticas de fabricación (BPF) establecidas en el Preámbulo de la GSFA del Codex.

### **Clases funcionales**

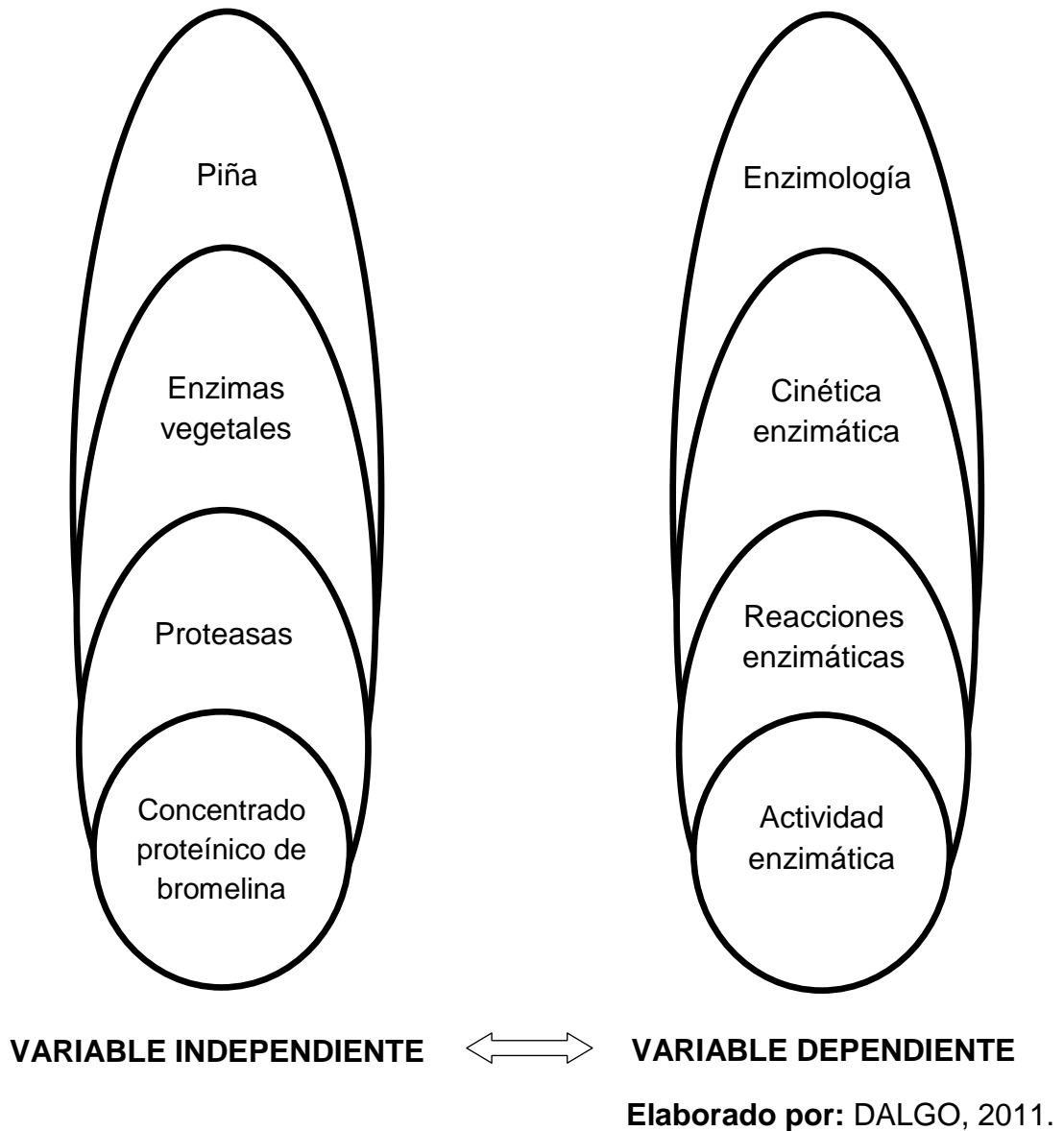
Acentuadores del sabor y aroma

Agentes de tratamiento de las harinas

Estabilizadores (CODEX ALIMENTARIUS, 2011).



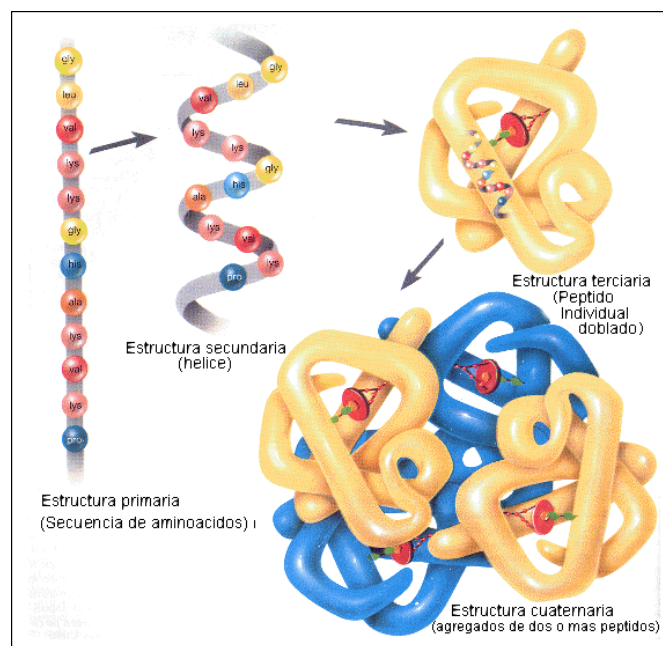
## 2.4 Categorías fundamentales



### 2.4.1 Marco teórico de la variable independiente

Las enzimas consisten en cadenas de L-aminoácidos unidos covalentemente en una secuencia definida, denominada **estructura primaria**, y enrollados en forma compleja, en una estructura zwitteriónica, y

con un centro activo, formado por relativamente pocos aminoácidos que son los responsables directos de la unión con el sustrato y que catalizan la reacción característica de cada tipo particular de enzima. La **estructura secundaria** de una enzima viene determinada por aquellas secciones de la cadena polipeptídica que adoptan estructuras bien definidas, por ejemplo en hélice  $\alpha$ ; la **terciaria** se refiere al enrollamiento de la estructura del polipéptido producido por fuerzas secundarias, como enlaces iónicos, hidrofóbicos y puentes de hidrógeno, y la **estructura cuaternaria** corresponde a la forma de asociación de ciertas enzimas complejas, usualmente intracelulares, que unen sus cadenas polipeptídicas mediante fuerzas secundarias hasta formar enzimas con multisubunidades (WISEMAN, 1985).



**Fig 1.** Niveles estructurales de las proteínas (BIXQUERT, sf).

Las enzimas son proteínas altamente especializadas que tienen como función la catálisis o regulación de la velocidad de las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos.

En una reacción catalizada por enzimas (E), los reactivos se denominan **sustratos** (S), es decir la sustancia sobre la que actúa la enzima. El sustrato es modificado químicamente y se convierte en uno o más **productos** (P). Como esta reacción es reversible se expresa de la siguiente manera:



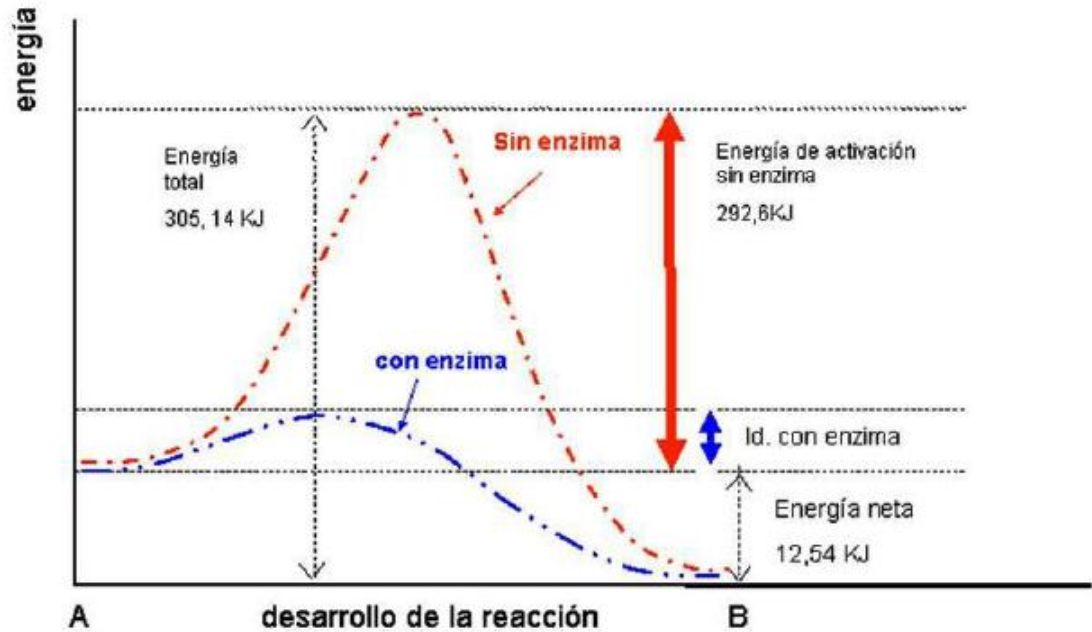
El sustrato se une al sitio activo de la enzima, y se forma un complejo enzima-sustrato. El sustrato por acción de la enzima es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato.

Mediante el incremento de la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción aumentará debido al aumento de la probabilidad de formación de complejos enzima-sustrato. Esto ocurrirá hasta que no haya más enzimas disponibles para la formación de complejos enzima-sustrato, lo que corresponde a un punto en que la velocidad ya no aumenta. Las enzimas constituyen el factor limitante.

La enzima libre se encuentra en la misma forma química al comienzo y al final de la reacción.

Las enzimas son catalizadores, y los catalizadores actúan disminuyendo la energía de activación al permitir que gran parte de las moléculas reaccionen al mismo tiempo.

El catalizador se combina con los reactantes de modo transitorio, produciendo un estado de transición de menor energía que en la reacción no catalizada. Una vez formados los productos el catalizador queda libre, y puede ser de nuevo utilizado. Las enzimas disminuyen la energía de activación, de tal forma que aumentan la velocidad de la reacción catalizada, sin afectar a las funciones termodinámicas ni a las constantes de equilibrio.



**Fig 2.** Evolución energética de una reacción química (ITESCAM, s.f).

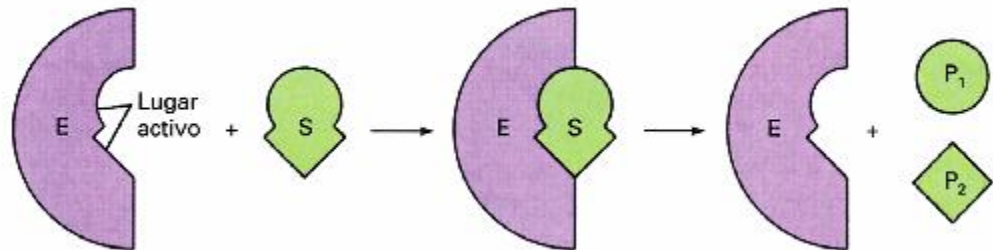
### Propiedades generales de las enzimas

Tienen la especial capacidad de acelerar las reacciones químicas, sin alterarse como consecuencia de la reacción, son específicas y solo actúan en un determinado tipo de reacción. Como todos los catalizadores, funcionan en una concentración molar mucho menor que la del reactivo sobre el cual funciona.

### Especificidad

Las moléculas del sustrato se unen a un sitio particular en la superficie de la enzima, denominado **sitio activo**, donde tiene lugar la catálisis. La estructura tridimensional de este sitio activo, donde solo puede entrar un determinado sustrato (ni siquiera sus isómeros) es lo que determina la especificidad de las enzimas. El acoplamiento es tal que E. Fisher (1894)

enunció: **"el sustrato se adapta al centro activo o catalítico de una enzima como una llave a una cerradura"**. (HIPERTEXTOS DEL ÁREA DE LA BIOLOGÍA, 2003).



**Fig 3.** Modelo llave-cerradura de Fisher (ITESCAM, s.f).

Las enzimas se clasifican en 6 grupos diferentes, dependiendo del tipo de reacción que catalice: óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, aunque los grupos 2,3 y 6 son, hablando estrictamente, transferasas que transfieren grupos sin alterar el estado de oxidación de los reactantes.

**Oxido-reductasas:** Catalizan las reacciones de óxido-reducción que implican oxigenación, como las  $C - H \rightarrow C - OH$ , o todas las eliminaciones o adiciones de átomos de hidrógeno equivalentes, por ejemplo  $CH(OH) \rightarrow C = O$ .

**Transferasas:** Intervienen en la transferencia de diversos grupos, como aldehído, cetona, acilo, azúcar, fosforilo, etc, de una molécula a otra.

**Hidrolasas:** El rango de grupos hidrolizables es muy extenso, e incluye ésteres, amidas, péptidos y otras funciones que contienen grupos  $C - N$ , anhídridos, glicósidos y otros muchos.

**Liasas:** Catalizan las reacciones de adición o formación de dobles enlaces tales como  $C = C$ ,  $C = O$  y  $C = N$ .

**Isomerasas:** Catalizan diversos tipos de isomerizaciones, incluyendo la racemización.

**Ligasas:** Enzimas denominadas frecuentemente sintetetasas, que median en la formación de enlaces  $C - O$ ,  $C - S$  y  $C - N$ .

Cada clase se subdivide posteriormente hasta que las enzimas individuales se identifican mediante un código de dos letras mayúsculas, EC y 4 cifras.

Las **proteasas** son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas (WISEMAN, 1985).

ELIÉCER (2003), establece que las proteasas son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas sustrato, se caracterizan por tener gran variedad de especificidades. De acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo se clasifican en cuatro familias: serín proteasas, asparticoproteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas.

Existen diversos ejemplos de enzimas útiles que han sido obtenidas a partir de plantas por métodos sencillos mediante procesos biotecnológicos, por ejemplo la proteasa bromelina (piña) (GASESA y HUBBLE, 1941).

La piña (*Ananas comosus*) es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las Bromeliáceas, de las cuales existen cerca de 50 géneros y alrededor de 2000 especies. Es una fruta tropical rica en vitaminas A, B, C. La composición en porcentaje de una piña típica de la variedad Cayena lisa es: Pulpa (33%), corazón (6%), cáscara (41%) y corona (20%).

La piña tiene actividad proteolítica debida a la bromelina que se activa por la cisteína, tiosulfato y glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos oxidantes y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico).

La bromelina (3.4.22.33) se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el rango de 5 a 8. Es una proteína constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre (ELIÉCER, 2003).

### **Propiedades químicas de la bromelina**

- El principal residuo amínico terminal, es la valina, y el carboxilo terminal es glicina.
- La enzima es una glicoproteína que tienen un oligosacárido por molécula, el cual está unido por covalencia a la cadena peptídica.
- La bromelina del tallo tiene un grupo sulfhidrilo reactivo por molécula, el cual es esencial para la catálisis enzimática.
- Los principales aminoácidos contenidos en la bromelina son: Arginina, ácido aspártico, serina, prolina, alanina, valina, glicina, metionina, amonio, glucosamina (PULIDO, 2007).

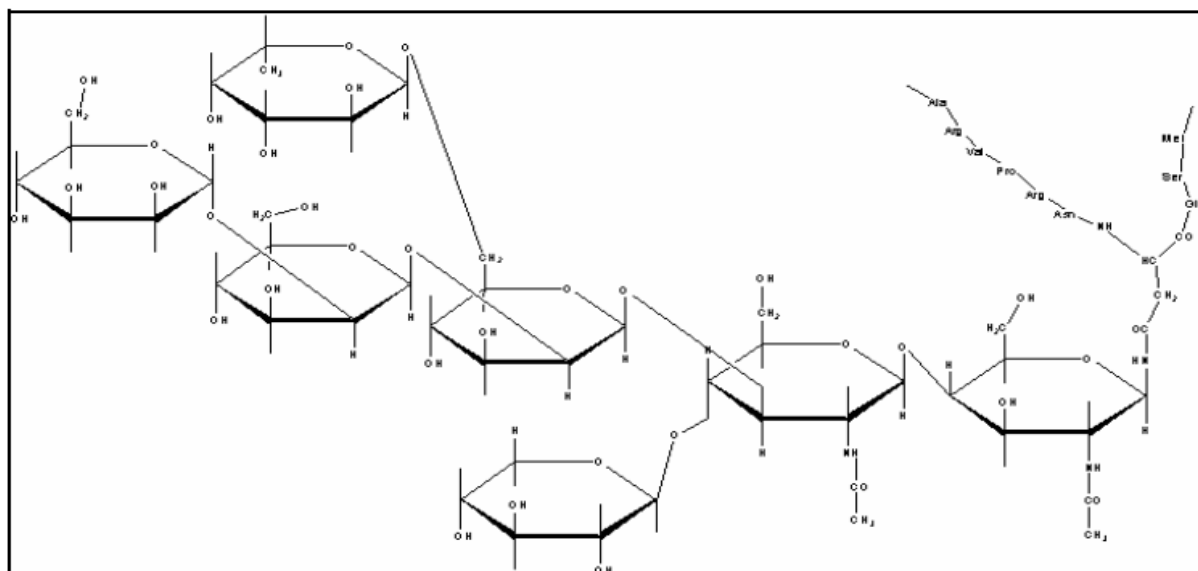
### **Propiedades físicas de la bromelina**

Las principales características físicas de la bromelina, se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades físicas de la bromelina

PROPIEDADES	TALLO DE PIÑA
Peso molecular	33000 Da
Color	Blanco
Estado	Polvo
Olor y sabor	Característico
Solubilidad	En agua
pH óptimo	7
Actividad enzimática	1200 GDU/g
Temperatura de inactivación	70°C

**Fuente:** PULIDO, 2007.



**Fig 4.** Estructura de la bromelina (PUEBLA citado por PULIDO, 2007).



## 2.4.2 Marco teórico de la variable dependiente

Los estudios cinéticos representan uno de los instrumentos empleables por el bioquímico en la investigación de la estructura y función de las enzimas, de tal forma que ha podido desarrollarse una gran variedad de complejos modelos mecanísticos, menciona (FERHT, 1977) citado por (GASESA y HUBBLE, 1941). Sin embargo, cuando se considera la aplicación tecnológica de las enzimas, los objetivos están muy claramente definidos y es a menudo suficiente limitarse al examen de los efectos netos de la acción de una enzima más que llevar a cabo un detallado estudio cinético.

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ( $V_{max}$ ). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos (GONZÁLEZ, s.f).

Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que la de la enzima, la velocidad de reacción es de orden cero respecto a los reactantes, es decir, depende solamente de la concentración de enzimas presentes. Por tanto, la velocidad de reacción es esencialmente constante hasta que haya reaccionado casi todo el sustrato, momento en que pasa a depender de la concentración de sustrato existente y es de primer orden con respecto a la concentración de sustratos (WISEMAN, 1985).

## **Actividad enzimática**

Las cantidades de enzima pueden ser expresadas en moles, como las de cualquier otro compuesto químico, o pueden ser cuantificadas en términos de actividad enzimática. La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad.

Se define la **unidad de actividad enzimática** (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml).

Recientemente, el Sistema Internacional de unidades (SI) ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama **katal** (kat). Como 1 mol son  $10^6$   $\mu\text{moles}$  y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a  $60 \times 10^6$  U (GONZÁLEZ, s.f).

## **Factores físico-químicos que pueden modificar la actividad enzimática**

Temperatura: Las enzimas son sensibles a la temperatura pudiendo verse modificada su actividad por este factor. Los rangos de temperaturas óptimos pueden llegar a variar sustancialmente de unas enzimas a otras. Normalmente, a medida que aumente la temperatura, una enzima verá incrementada su actividad hasta el momento en que comience la desnaturalización de la misma, que dará lugar a una reducción progresiva de dicha actividad.

pH: El rango de pH óptimo también es muy variable entre diferentes enzimas. Si el pH del medio se aleja del óptimo de la enzima, esta verá

modificada su carga eléctrica al aceptar o donar protones, lo que modificará la estructura de los aminoácidos y por tanto la actividad enzimática.

Concentración salina: Al igual que en los casos anteriormente mencionados, la concentración de sales del medio es crucial para una óptima actividad enzimática. Una elevada concentración o una ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya que las enzimas precisan de una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura.

Cuando se usan enzimas en la industria, su actividad siempre debe ser expresada en una forma dada, y calculada en condiciones tales que se relacionen lo más estrechamente posible con su aplicación, incluso se utilizan en análisis clínicos o en procesos bioquímicos a gran escala. Así, en algunos casos es más útil expresar la **actividad enzimática** en función de la velocidad de cambio de solubilidad o **viscosidad** de un material por unidad de peso o volumen de enzima añadido, en vez de términos más convencionales como nmoles de producto formado por mg de enzima por segundo (WISEMAN, 1985).

La viscosidad se define como la resistencia que experimenta una capa de un líquido al moverse sobre otra capa. Hay varios métodos diferentes para medir la viscosidad. El método más útil para medir viscosidades de las magnitudes que se encuentran en la mayoría de los líquidos biológicos, es el que se conoce como **método de Poiseuille**, que se basa en el uso de un aparato conocido como **viscosímetro de Cannon – Fenske**. El método consiste en medir el tiempo que tarda en fluir un volumen conocido del líquido (el que está contenido entre las marcas) a través de un capilar, de longitud y radio conocidos, bajo la acción de la gravedad (CROCKFORD y KNIGHT, 1991).



**Fig 5.** Viscosímetro de Cannon – Fenske (CORREA, 2006).

La ecuación de Poiseuille es extensamente aplicada en viscometría con tubo capilar para fluidos newtonianos, y esta dada por la fórmula:

$$v^* = \frac{\rho * h * R^2}{8L\mu}$$

**Donde:**

$\rho$  = Densidad del fluido

$h$  = Altura

$R$  = Radio

$L$  = Longitud

$\mu$  = Viscosidad

Esta ecuación es la base para la operación de los viscosímetros de tubo y capilares. Para un viscosímetro dado,  $h$ ,  $R^2$  y  $8L$  son constantes; en consecuencia, la expresión de la viscosidad puede ser escrita en la forma siguiente:

$$\mu = K * \rho * t$$

**Donde:**

**K** = Constante del viscosímetro

**$\rho$**  = Densidad del fluido

**t** = Tiempo que tarda en fluir un volumen conocido de líquido (ALVARADO, 1996).

## 2.5 Hipótesis

**Ho:** Las soluciones extractoras no conducen a la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña, medida por la actividad enzimática.

**Ha:** Las soluciones extractoras conducen a la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña, medida por la actividad enzimática.

## 2.6 Señalamiento de variables

**Variable independiente:** Concentrado proteínico de bromelina

**Variable dependiente:** Actividad enzimática

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Enfoque**

La presente investigación se enfocó principalmente en la metodología del paradigma cuantitativo, pero se complementa con la metodología cualitativa.

Al enfocarse en la investigación cuantitativa, se hace referencia a que se aplicó un método de investigación donde el objetivo fue estudiar las propiedades y fenómenos cuantitativos y sus relaciones para proporcionar la manera de establecer, formular, fortalecer, y revisar la teoría existente. La metodología cuantitativa permitió la determinación de parámetros cinéticos del concentrado proteínico de bromelina como es la actividad enzimática, la misma que fue cuantificada mediante la medición de la viscosidad, parámetro basado en teorías ya existentes y que mediante el cálculo de modelos matemáticos se pudo aceptar o no la hipótesis planteada.

La investigación se complementó con una metodología cualitativa ya que se dio la recolección de datos que son no cuantitativos, con el propósito de explorar las relaciones sociales y describir la realidad. Se aplicó este paradigma ya que se implementó nuevas metodologías para la solución del problema, y se realizó una búsqueda de documentos relacionados al tema propuesto, estableciendo así discusiones y conclusiones de los resultados obtenidos.

### **3.2 Modalidad básica de la investigación**

El proyecto se basó en la investigación **documental**, ya que se realizó consultas a través de documentos como libros, revistas, publicaciones, artículos científicos, papers o en bibliotecas virtuales, la web, entre otros. Esto con el objetivo de poseer información actualizada relacionada con el tema de estudio, necesaria para una investigación más profunda.

El proyecto de investigación se realizó en los laboratorio de la FCIAL, utilizando materiales y equipos adecuados para cumplir con los objetivos propuestos, por tal motivo, el proyecto se fundamentó también en una investigación de tipo **experimental**, en donde a más de identificar las características que se estudian; se controlan, alteran y manipulan las variables, con el fin de observar los resultados al tiempo que se procura evitar que otros factores intervengan en la observación.

### **3.3 Nivel o tipo de investigación**

El presente proyecto utiliza los siguientes tipos de investigación:

#### **Investigación aplicada**

El proyecto corresponde a una investigación aplicada, ya que se acrecentó el progreso científico, así como los conocimientos teóricos, sobre la obtención de enzimas proteasas y de su actividad frente a un sustrato determinado. Además, que los resultados obtenidos serán aplicados, utilizados, o mejorados en futuros estudios, para una posible producción de bromelina a nivel industrial en el país.

#### **Investigación experimental**

Este tipo de investigación facilita la obtención y determinación de la actividad enzimática de la bromelina ya que se realizaron ensayos a nivel de

laboratorio. El experimento realizado permitió introducir las variables de estudio, y manipularlas para controlar su aumento, disminución y así establecer los mejores parámetros, obteniendo los mejores resultados.

### **Investigación descriptiva**

Se aplicó este tipo de investigación ya que se describió detalladamente la metodología a emplearse, es decir los materiales, e instrumentos utilizados en el laboratorio, que permitieron el estudio de los parámetros cinéticos de la enzima, así como la medición de las variables que influyen sobre esta y su relación.

## **3.4 Población y muestra**

### **3.4.1 Población**

Para la presente investigación la población identificada son las siguientes variedades de piña cultivadas en Ecuador:

**Cayena Lisa:** Más conocida como Champaca o Hawaiana, utilizada mayormente en la agroindustria.

**Golden Sweet:** También conocida como MD2, la cual se caracteriza por su sabor dulce, tamaño y aroma. Esta variedad es la más exportada en Ecuador.

**Tipo peroleras:** Milagreña (UNIDAD TÉCNICA DE ESTUDIOS PARA LA INDUSTRIA, 2006).

### **3.4.2 Muestra**

La muestra utilizada fueron piñas milagreñas en estado de maduración verde, adquiridas en el mercado Sur de la ciudad de Ambato.



Se trabajó con 8 piñas de esta variedad, repartiéndolas para las 2 replicas y para cada solución extractora.

### 3.5 Operacionalización de variables

**Tabla 2.** Operacionalización de la variable independiente y dependiente

HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	ÍNDICE
Las soluciones extractoras conducen a la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña, medida por la actividad enzimática.	<b>VI:</b> Concentrado proteínico de bromelina	Humedad Materia seca	% %
	<b>VD:</b> Actividad enzimática	Viscosidad	mPa.s

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

### 3.6 Recolección de información

#### 3.6.1 Obtención del jugo de piña

**Lavado:** Se lava la fruta con agua potable para eliminar las impurezas presentes.

**Desinfección:** Utilizando alcohol al 70% se desinfecta la fruta.

**Enjuague:** Utilizando agua destilada se eliminan los residuos del alcohol.

**Obtención:** Separar la pulpa de piña de la cáscara.

**Fraccionamiento:** Utilizando un cuchillo fraccionar la pulpa en trozos de aproximadamente 2cm x 2cm.

**Molienda:** Moler los trozos de la pulpa de piña en una licuadora a velocidad alta, para obtener su jugo.

**Filtración:** Utilizando un cedazo filtrar el jugo de piña.

### 3.6.2 Extracción de bromelina

**Medición:** Con una probeta medir el volumen de jugo de piña obtenido.

**Mezcla:** Añadir etanol al 96% en la muestra 1, y NaCl al 10% en la muestra 2; ambos 1.5 veces más que el volumen de jugo de piña obtenido.

**Almacenamiento:** Almacenar en frascos de plástico las muestras extracto - etanol y extracto - NaCl en el congelador (-10°C) por 7 días.

**Centrifugación:** Utilizando la centrifuga Hatch, se centrifugan las muestras 1 y 2, colocadas en tubos de Falcon de 15ml a 4500rpm por 20 mins.

**Obtención:** Se elimina el sobrenadante de las muestras 1 y 2, y los precipitados se transfieren a vasos de precipitación.

### 3.6.3 Concentración de la bromelina

Este procedimiento se realiza para las muestras 1 y 2 (precipitado con: bromelina - etanol y bromelina – NaCl).

**Secado:** Pesar una cápsula de porcelana en la balanza analítica, y adicionar de 5 a 6g de la muestra de concentrado de bromelina. Registrar el peso.

Poner a secar las muestras en la estufa a 40°C durante 48 horas.

Sacar las muestras de la estufa y enfriarlas en un desecador durante 10 minutos.

Pesar las muestras secas, si es posible hasta peso constante, regresándolas 10 minutos a la estufa y enfriando nuevamente.

**Cálculo:** Calcular el contenido de humedad como el peso perdido de la muestra durante el secado, según la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{M_1 - M_2}{M} * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

**Donde:**

**M<sub>1</sub>** = Peso de la cápsula más muestra húmeda

**M<sub>2</sub>** = Peso de la cápsula más muestra seca

**M** = Peso de la muestra

Se determina además el porcentaje de materia seca mediante la siguiente fórmula:

$$\%Materia\ seca = 100 - \%Humedad \quad (\text{Ec.2})$$

**Almacenamiento:** Los concentrados proteínicos de bromelina obtenidos se mantienen en refrigeración a 5°C.

### **3.6.4 Determinación de la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina**

Para determinar la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina se ejecuta el siguiente procedimiento.

### 3.6.4.1 Determinación de la constante K del viscosímetro de Cannon – Fenske

**Limpieza:** Limpiar el viscosímetro de Cannon - Fenske con ácido nítrico, luego enjuagarlo con agua destilada, y secarlo con aire.

**Adaptación:** En un baño termostático a 20°C, se coloca verticalmente el viscosímetro, sujetándolo con un soporte, de modo que quede sumergido todo el bulbo superior en el agua del baño termostático.

**Colocación de la muestra:** Colocar 10ml de agua destilada y esperar 15 minutos para que el conjunto alcance la temperatura del baño.

**Medición:** Succionar el líquido por medio de una pera de succión conectada a la rama capilar hasta que este alcance la marca de aforo situada entre los dos bulbos. Dejar caer libremente el líquido y mediante un cronómetro, medir el tiempo de escurrido del agua destilada, es decir el tiempo que tarda en pasar desde el primer aforo hasta el segundo.

Efectuar una nueva medida, sin limpiar ni desmontarle del termostato. Promediar las medidas en el caso de que no superen un  $\pm 5\%$  de diferencia entre ellas.

**Cálculo:** Con el dato de tiempo de escurrido, se procede al cálculo de la constante K del viscosímetro de Cannon. Aplicando la siguiente fórmula:

$$K = \frac{\mu}{t * \rho} \quad (\text{Ec.3})$$

**Donde:**

$\mu$  = Viscosidad absoluta del agua a una temperatura dada

t = Tiempo de escurrido del agua en el viscosímetro

$\rho$  = Densidad del agua a 20°C

### 3.6.4.2 Determinación de la densidad de los sustratos proteínicos de hidrólisis

**Colocación:** Colocar las muestras de los sustratos proteínicos (leche y jugo de carne) en una probeta, colocada sobre una superficie lisa y horizontal.

**Adaptación:** Sumergir el densímetro en la muestra, impartiendo un ligero giro al soltarlo, para facilitar su puesta en reposo mientras flota apartado de las paredes de la probeta. Esperar el tiempo suficiente para que se detenga y todas las burbujas lleguen a la superficie.

**Medición:** Cuando el densímetro se detenga y flote libremente apartado de las paredes de la probeta, leer su escala. La lectura correcta es la de aquel punto de la escala en el que la superficie principal del líquido corta la escala. Determinar ese punto poniendo el ojo levemente por debajo de la superficie del líquido y subiéndolo lentamente hasta que la superficie que se ve inicialmente como una elipse se transforma en una línea recta que corta la escala del densímetro. La lectura realizada corresponde al valor de la gravedad específica (densidad relativa).

**Cálculo:** Con el dato de densidad relativa, determinar la densidad de las muestras de leche y jugo de carne, aplicando la siguiente fórmula:

$$\rho_r = \frac{\rho}{\rho_o}$$

$$\rho = \rho_r * \rho_o \quad (\text{Ec.4})$$

**Donde:**

$\rho$  = Densidad absoluta de la muestra

$\rho_r$  = Densidad relativa

$\rho_o$  = Densidad de referencia (agua a 20°C).

### **3.6.4.3 Medición de la viscosidad de la leche y jugo de carne al adicionar el concentrado proteínico de bromelina**

Este ensayo está basado en el método de Balls y Hoover, conocido como el método de coagulación de la leche, es, sin duda, uno de los métodos mas expeditos para determinar actividad enzimática de una proteasa.

#### **3.6.4.3.1 Preparación de las muestras**

**Leche:** En un vaso de precipitación colocado sobre un agitador, mezclar 15,5g de leche en polvo en 108ml de agua destilada a 40°C, y posteriormente bajar su temperatura a 20°C.

**Jugo de carne:** En un molino, moler la carne, y macerarla hasta obtener su jugo, medir 108 ml de jugo de carne y llevarlo a 20°C.

**Disolución:** En un vaso de precipitación disolver 0,1 g de concentrado proteínico de bromelina en 100 ml de vinagre natural.

**Mezcla:** Mezclar 10 ml de la disolución en los sustratos leche y jugo de carne.

**Toma de muestras:** Transferir 10 ml de muestra a un vaso de precipitación y llevarlo a congelación (baño crioscópico). Realizar este procedimiento cada 2 minutos, hasta contar con 10 muestras.

#### **3.6.4.3.2 Medición de la viscosidad**

**Medición:** Determinar el tiempo de escurrido de las muestras, como se indica en el procedimiento antes descrito para el agua destilada. Esta vez utilizando como muestras leche y jugo de carne al adicionar los concentrados proteínicos de bromelina.

**Cálculo:** Con los datos del tiempo de escurrido de las muestras, se calcula la viscosidad, utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = K * \rho * t \quad (\text{Ec.5})$$

**Donde:**

**K** = Constante del viscosímetro

**$\rho$**  = Densidad de la muestra

**t** = Tiempo de escurrido

Con los datos de viscosidad se determina la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina, utilizando un método gráfico de regresión lineal.

### **3.6.5 Diseño experimental**

Se empleó el diseño factorial  $2^2$  para la verificación de la hipótesis, así como el diseño de bloques completos, para la determinación del mejor tratamiento, debido a que se trabajó además con dos testigos.

#### **3.6.5.1 Diseño factorial $2^2$**

##### **Factores en estudio**

Factor A: Soluciones extractoras

Nivel bajo (-1) = Etanol

Nivel alto (+1) = NaCl

Factor B: Sustratos proteínicos de hidrólisis

Nivel bajo (-1) = Leche

Nivel alto (+1) = Jugo de carne

**Número de repeticiones = 2 réplicas**

**Tratamientos = 4**

(-1)(-1) = Etanol - Leche

(+1)(-1) = NaCl - Leche

(-1)(+1) = Etanol - Jugo de carne

(+1)(+1) = NaCl - Jugo de carne

**Total de unidades experimentales = 8**

**Parámetros y criterios de evaluación:** Viscosidad

Actividad enzimática

**Esquema de la distribución del experimento**

**Tabla 3.** Esquema del diseño factorial  $2^2$

Factores	Nivel bajo (-1,0)	Nivel alto (+1,0)	Tratamientos		Actividad enzimática	
					R1	R2
A: Soluciones extractoras	Etanol	NaCl	-1,0	-1,0		
			+1,0	-1,0		
B: Sustratos proteínicos	Leche	Jugo de carne	-1,0	+1,0		
			+1,0	+1,0		

**Elaborado por:** DALGO, 2012.



## Análisis de varianza: Tabla ANOVA

### 3.6.5.2 Diseño de bloques completos

**Tratamientos = 6**

T1 = Etanol - Leche

T2 = NaCl - Leche

T3 = Etanol - Jugo de carne

T4 = NaCl - Jugo de carne

T5 = Bromelina comercial - Leche

T6 = Bromelina comercial - Jugo de carne

**Número de repeticiones = 2 réplicas**

### Esquema de la distribución del experimento

**Tabla 4.** Esquema del diseño de bloques completos

Observaciones	Tratamientos	Actividad enzimática	
		R1	R2
1	T1		
2	T2		
3	T3		
4	T4		
5	T5		
6	T6		

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Análisis de varianza:** Tabla ANOVA

**Tipos de análisis estadísticos:** Tukey

Comprobación de resultados utilizando el software StatGraphics.

### **3.7 Procesamiento y análisis**

Las respuestas experimentales de viscosidad y actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina, se ordenaron y tabularon en el programa Excel, en el cual también se realizaron ciertos cálculos, y gráficos matemáticos y estadísticos.

El diseño experimental planteado, se analizó en el programa de software StatGraphics, el mismo que integra una gran variedad de análisis estadísticos y gráficos de alta resolución.

Los resultados obtenidos se discutieron en relación a datos presentados en el marco teórico, y referencias bibliográficas relacionadas.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos de la investigación se presentan en los Anexos A, B y C.

En el **Anexo A** se muestran las **tablas de resultados**, en las cuales se detallan los diferentes datos obtenidos de la experimentación realizada, así como los resultados obtenidos, los cuales fueron calculados mediante fórmulas específicas.

Es importante mencionar que en las tablas de resultados, los datos presentados corresponden a valores promedios, como producto de dos réplicas por duplicado.

En la tabla **A1** se presentan los valores de porcentaje de humedad y materia seca de los concentrados proteínicos de bromelina en etanol y NaCl. La **Ec.1** permitió la determinación del porcentaje de humedad de las muestras, es decir la cantidad de agua presente, mientras que la **Ec.2** dio a conocer el porcentaje de materia seca que permanece en la muestra posterior a la remoción del agua.

La tabla **A2** nos muestra las constantes K de cada viscosímetro de Cannon Fenske existentes en el laboratorio, las cuales fueron establecidas mediante la aplicación de la **Ec.3**, para lo cual se trabajó con datos de viscosidad ( $9,9341 \times 10^{-1}$  mPa.s) y densidad ( $998,2 \text{ kg/m}^3$ ) del agua a una temperatura de 20°C.

Con la metodología planteada se determinó la densidad y la viscosidad de los sustratos proteínicos empleados como son leche y jugo de carne, los cuales fueron calculadas mediante la **Ec.4** y **Ec.5** respectivamente. Sus valores pueden ser observados en la tabla **A3**.

Aplicando la **Ec.5** se determinó la viscosidad de la leche al adicionar el concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol, datos que pueden ser observados en la tabla **A4**; en donde se muestra además los tiempos de escurrido, el valor de la constante K del viscosímetro utilizado, y la densidad de la muestra.

Los mismos resultados se presentan en las tablas subsiguientes para las diferentes muestras utilizadas, así: Tabla **A5** – Viscosidad de la leche con concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl. Tabla **A6** – Viscosidad de la leche con bromelina comercial. Tabla **A7** – Viscosidad del jugo de carne con concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol. Tabla **A8** – Viscosidad del jugo de carne con concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl. Tabla **A9** – Viscosidad del jugo de carne con bromelina comercial.

Los valores de actividad enzimática en  $\left(\frac{\text{mPa.s}}{\text{s}}\right)$  de los sustratos leche y jugo de carne, con concentrados proteínicos de bromelina en etanol y NaCl se presentan en la tabla **A10**. Estos datos fueron obtenidos al aplicar un método gráfico de regresión lineal a las viscosidades de los tiempos de toma muestra de 360s a 720s.

El **Anexo B** corresponde a las **gráficas** realizadas en función a los resultados obtenidos.

La gráfica **B1** representa el tiempo (s) Vs. Viscosidad (mPa.s) de la muestra; es decir, que indica los cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de la bromelina extraída con etanol. Se observa además la ecuación polinómica de orden 3 ajustada en la curva de reacción enzimática.

En las gráficas subsiguientes de regresión polinómica de orden 3, se muestran las mismas representaciones para las diferentes muestras utilizadas, así: Gráfica **B3** – Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl. Gráfica **B5** – Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina comercial. Gráfica **B7** – Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol. Gráfica **B9** – Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl. Gráfica **B11** – Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina comercial.

La actividad enzimática del concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol sobre la muestra de leche se presenta en la gráfica **B2**, en donde se da la interacción del tiempo (s) con la viscosidad (mPa.s) de la muestra. En la gráfica se presenta la ecuación de regresión lineal así como el valor R cuadrado.

En las gráficas subsiguientes de regresión lineal, se muestran las mismas representaciones para las diferentes muestras utilizadas, así: Gráfica **B4** – Actividad enzimática del concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl sobre la muestra de leche. Gráfica **B6** – Actividad enzimática de bromelina comercial sobre la muestra de leche. Gráfica **B8** – Actividad enzimática del concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol sobre la muestra de jugo de carne. Gráfica **B10** – Actividad enzimática del

concentrado proteínico que contiene bromelina en NaCl sobre la muestra de jugo de carne. Gráfica **B12** – Actividad enzimática de bromelina comercial sobre la muestra de jugo de carne.

El análisis estadístico, así como los diseños experimentales aplicados a los resultados obtenidos, se presenta en el Anexo **C**.

Los resultados que se presentan en este anexo fueron realizados utilizando el software StatGraphics.

La optimización del diseño factorial  $2^2$  aplicado a los factores: soluciones extractoras y sustratos proteínicos, se presenta en la **tabla C1**, y su representación en la **gráfica C1**. Para observar de mejor manera los niveles óptimos de los factores A y B, se muestra en la **gráfica C2** una respuesta de superficie en 3D.

En la **tabla C2**, se presenta el cuadro de ANOVA como resultado del diseño de bloques completos aplicado a los 6 tratamientos, en los que se encuentran incluidos los dos testigos utilizados.

Para la determinación de los mejores tratamientos, se aplicó la prueba de comparación múltiple Tukey al 95%, los resultados obtenidos se presentan en la **tabla C3**. Gráficamente, los tratamientos y la prueba de Tukey aplicada se observan en la **gráfica C3**.

El análisis de varianza global de la actividad enzimática de las muestras con los diferentes concentrados con bromelina y bromelina comercial, se muestran en la **tabla C4**.

## **4.2 Interpretación de datos**

### **4.2.1 Humedad y materia seca de los concentrados proteínicos**

Se determinó que el concentrado de bromelina en etanol presenta un mayor porcentaje de humedad que el concentrado con NaCl. Los valores obtenidos son 8,1% y 5,6% respectivamente, lo que indica que en el concentrado con etanol se ha evaporado una mayor cantidad de agua que en la de NaCl, motivo por el cual esta última muestra presenta un mayor porcentaje de materia seca que corresponde a 94,4 en contraparte con la de etanol que corresponde a 91,9%; estos valores corresponden al residuo que queda una vez evaporada el agua libre del sistema.

Se puede mencionar entonces que la muestra de concentrado con etanol al perder mayor cantidad de agua se encuentra más concentrada, aun cuando presenta una menor cantidad de materia seca. Cabe mencionar que la diferencia es mínima entre ambos concentrados, sin embargo si se obtuvo mejores resultados con el alcohol.

#### **4.2.2 Constante K de los viscosímetros de Cannon - Fenske**

A nivel de laboratorio, se realizó la calibración de los 9 viscosímetros de Cannon – Fenske existentes, y se observó que en cada uno el tiempo de escurrido del agua es diferente, variando de 6s a 634,5s, esta variación es debido al tamaño de cada tubo capilar. Para el trabajo experimental y debido a los sustratos a utilizarse, se escogió a aquel viscosímetro que presentó un tiempo promedio de escurrido (35,5s) el cual corresponde al viscosímetro 4, con una constante K de  $2.8034 \times 10^{-5} \left( \frac{mPa \cdot m^3}{kg} \right)$ , datos que pueden observarse en la tabla A2.

#### **4.2.3 Densidad y viscosidad de los sustratos**

Para determinar la densidad y la viscosidad de las muestras es importante trabajar siempre a una temperatura establecida, en este caso se trabajó a 20°C. Como se observa en la tabla A3, la densidad del jugo de carne

$(1038 \frac{kg}{m^3})$  es mayor que el de la leche, que corresponde a  $1030 \frac{kg}{m^3}$ ,

datos que fueron calculados utilizando la Ec.4. Los valores de viscosidad en este caso son directamente proporcionales a los de la densidad ya que la viscosidad del jugo de carne ( $2,52 mPa.s$ ) también es mayor que el de la leche ( $2,30 mPa.s$ ). Se puede mencionar entonces que la muestra de jugo de carne utilizada es más densa y más viscosa que la muestra de leche. Es importante mencionar que tanto la densidad como la viscosidad son propiedades físicas que caracterizan a cada sustancia, y que la una es independiente de la otra.

#### **4.2.4 Viscosidad de los sustratos al adicionar los concentrados proteínicos de bromelina**

Para conocer si los concentrados proteínicos de bromelina en etanol y NaCl son funcionales como catalizadores, se realizó pruebas en muestras de leche y jugo de carne, para ver si existe aceleración de las reacciones de hidrolisis de los enlaces peptídicos de las proteínas de las muestras, y esto se pudo comprobar mediante el aumento de su viscosidad.

Para la determinación de la viscosidad de los sustratos con los concentrados proteínicos, se realizaron diferentes ensayos para establecer el mejor intervalo de tiempos de toma de muestra, y se comprobó que los datos más representativos son aquellos en los que se toman las muestras cada 2mins y hasta los 20mins.

Al analizar las tablas A4 y A5 se observa que en el tiempo de toma de muestra 0s, las muestras de leche ya varían su viscosidad, aumentando su valor inicial de  $2,30 mPa.s$ , a viscosidades mayores a los  $3,00 mPa.s$ , indicando que los concentrados proteínicos con bromelina si están actuando.



En estas tablas se también se observa que la mayor viscosidad que alcanza la leche con concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol (7,00 mPa.s) es mayor que la que contiene NaCl (5,67 mPa.s), lo que da a entender que el concentrado con etanol actúa de mejor forma que el NaCl sobre el sustrato leche. Y esto se comprueba también ya que la viscosidad inicial con etanol es mayor que la de NaCl, indicando que el concentrado proteínico con el alcohol se acopla más rápidamente con el sustrato. Se determina además que los valores de viscosidad son directamente proporcionales al tiempo de toma de muestra; es decir que la viscosidad aumenta conforme pasa el tiempo de reacción.

El mismo análisis se realiza para las tablas A7 y A8, en donde se observa que la viscosidad del jugo de carne es mayor cuando el concentrado proteínico que contiene bromelina en etanol actúa sobre este (7,88 mPa.s) que cuando actúa el concentrado que contiene NaCl (6,17 mPa.s).

Con los datos presentados de viscosidad se puede establecer que la mejor solución extractora es el **etanol** y el sustrato en el que mejor actúa es el **jugo de carne**, lo que significa que este alcohol es un buen agente precipitante de proteínas (bromelina), obteniéndose un concentrado de alto rendimiento que permite la ruptura de una mayor cantidad de enlaces peptídicos de las proteínas del jugo de carne, en un menor tiempo que en la leche y por lo tanto aumenta la viscosidad.

Para comprobar la efectividad de los concentrados proteínicos de bromelina realizados, se adquirió bromelina comercial, y se realizó los mismos experimentos a nivel de laboratorio. Cabe mencionar que esta bromelina no se encontraba pura, sino mezclada con otros compuestos, ya que es utilizada como ablandadora de carnes.

Al analizar la tabla A6 y A9 se puede mencionar que se da una misma tendencia de aumento de la viscosidad en función del tiempo como en los

casos anteriores, y se observa que el mejor sustrato en el que actúa es el jugo de carne con una viscosidad máxima de 9,13 mPa.s. Lo que si se observa en los testigos, es que estos alcanzan valores más altos de viscosidad, indicando que las enzimas están catalizando de mejor manera las reacciones.

Se puede indicar que los concentrados proteínicos con etanol y NaCl si actúan sobre los sustratos establecidos, puesto que se observa que la tendencia de la curva es similar a aquella curva con bromelina comercial, la diferencia que se puede notar es que esta última comienza a alcanzar su velocidad máxima desde los 360s mientras que los concentrados preparados comienzan su mayor actividad tiempo después, desde aproximadamente los 480s.

#### 4.2.5 Actividad enzimática

La actividad enzimática indica la cantidad de enzima activa presente y su nivel de actividad sobre el sustrato, es factible expresar esta actividad en función de la viscosidad. Para su determinación, se realizó una linealización, con su correspondiente ecuación a las viscosidades de los tiempos de toma de muestra de 360s a 720s, esto debido a que es en este punto donde comienza la mayor velocidad de reacción. De la ecuación  $y = ax + b$ , el valor de la pendiente ( $a$ ) corresponde a la actividad enzimática de los concentrados proteínicos al actuar sobre las muestras.

En la tabla A10 se puede observar los valores de la actividad enzimática obtenidos, en  $(\frac{mPa.s}{s})$  donde se tiene una mayor actividad (0,0068) en la muestra jugo de carne con bromelina comercial. Para las muestras de los concentrados proteínicos elaborados, se tiene la mayor actividad para el jugo de carne con bromelina en etanol (0.00605), y la menor actividad para la leche con bromelina en NaCl (0.00335). Se puede establecer entonces

que los dos solventes actúan sobre los sustratos, pero el concentrado proteínico con etanol presenta mayor actividad enzimática.

#### **4.2.6 Gráficas**

Las gráficas siempre permiten una mejor representación de los resultados obtenidos, en este caso la manifestación visual de la relación entre la viscosidad y el tiempo de toma de muestra.

##### **Curvas de reacción enzimática**

Se puede observar las curvas de reacción enzimática, en donde el concentrado proteínico comienza a actuar sobre el sustrato con una velocidad inicial, la cual se va incrementando hasta alcanzar una velocidad máxima, representando así su mayor actividad; en los últimos segundos la curva se vuelve asintótica, es decir donde la enzima comienza a inactivarse, ya que se pretende que se ha formado casi por completo el producto.

En todas las gráficas se da la misma tendencia, pero en algunas, como en el caso de las muestras de jugo de carne, se observa una mejor recta en el punto en que inicia la velocidad máxima de reacción hasta antes de volverse asintótica.

Al analizar estas gráficas, lo que representan es que el concentrado proteínico de bromelina comienza a coagular la leche, es decir que se hidrolizan las proteínas (caseína, beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas) en péptidos más simples o en último término en aminoácidos (producto), esto mediante la ruptura de los enlaces peptídicos, y por ende la viscosidad de la muestra va aumentando en función al tiempo. Lo mismo ocurre en el caso del jugo de carne, pero aquí se da la hidrólisis de las proteínas actina, miosina, colágeno, reticulina y elastina.

Se puede demostrar entonces, que con el etanol se da una mayor hidrólisis de proteínas tanto de la leche como del jugo de carne, esto debido a que su concentrado presenta buena afinidad con los sustratos. Con la solución salina también se da la hidrólisis de enlaces peptídicos, pero requiere de mayor tiempo para concluir con su función catalítica.

### **Regresión polinómica de orden 3**

En las gráficas se puede observar además la línea de tendencia del tipo polinómica de orden 3, que es la que más se ajusta a esta curva, ya que se ajusta a 4 restricciones (punto, ángulo o curvatura). En la ecuación polinómica  $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ , el primer intercepto ( $d$ ) corresponde al efecto inicial de la enzima es decir al período de reconocimiento de sustrato, el segundo ( $cx$ ) corresponde al período de atemperamiento de la enzima, el tercero ( $bx^2$ ) y el más importante ya que es donde se da la velocidad máxima de reacción y se producen la mayoría de cambios, y el cuarto ( $ax^3$ ) que es donde se produce la última curvatura, en donde esta ya tiende a volverse asintótica.

Se puede observar las ecuaciones, las mismas que son diferentes para cada solución extractora, y sustrato sobre el cual actúan, debido a que en cada minuto, cada concentrado de bromelina ya sea en etanol o NaCl actúan de diferente manera. Lo que se puede notar es que los valores de la ecuación polinómica son más altos en relación al mejor tratamiento, y viceversa.

### **Regresión lineal: Actividad enzimática**

La tendencia **lineal**  $y = ax + b$  es aplicada a las viscosidades que pertenecen a la velocidad máxima de acción de la enzima sobre el sustrato, es decir los tiempos desde 360s a 720s. En las gráficas se presenta la ecuación (en

donde la pendiente ( $a$ ) corresponde al valor de actividad enzimática) y el valor R cuadrado.

Los mejores valores de actividad enzimática son 0,0068 mPa.s/s y 0,0061 mPa.s/s que corresponden a la actividad de la bromelina comercial en jugo de carne y en leche, respectivamente. Sin embargo los concentrados proteínicos de bromelina elaborados, también presentan altos valores de actividad, como es 0,0061 mPa.s/s para el concentrado con bromelina en etanol sobre la muestra de jugo de carne. Este corresponde al mejor tratamiento, y se observa que presenta un valor muy próximo al de la bromelina comercial, sin embargo el resto de muestras presentan valores inferiores a 0,0060; lo que indica que presentan menor actividad.

Se puede establecer entonces que los valores de la viscosidad de las muestras, si permiten obtener los valores de actividad enzimática de los concentrados proteínicos de bromelina en base a una regresión lineal.

#### **4.2.7 Análisis estadístico**

Se realizó un diseño factorial  $2^2$  con el objetivo de establecer cuales son los niveles más óptimos de las soluciones extractoras y sustratos proteínicos. Se obtuvo como resultados al nivel bajo (-1,0) de las soluciones extractoras y al nivel alto (+1,0) de los sustratos proteínicos como los niveles más óptimos para la obtención de mejores resultados. Estos niveles corresponden al etanol y al jugo de carne, lo que se corrobora con los resultados presentados anteriormente, a que el etanol es la mejor solución extractora de bromelina, y actúa de mejor manera como catalizador en la reacción de hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas del jugo de carne, por ende maximizando la actividad enzimática.

En la gráfica de optimización, se observa como el etanol es una mejor solución extractora de bromelina que el NaCl, y que en el jugo de carne

actúa de mejor manera que en la leche. Cabe mencionar que entre las soluciones extractoras hay mayor diferencia significativa que entre los sustratos proteínicos.

En la gráfica de respuesta de superficie, se observa el comportamiento en tres dimensiones de la combinación entre soluciones y sustratos de nivel bajo y nivel alto. Se nota claramente que entre el nivel bajo (etanol) y el nivel alto (jugo de carne) hay una mejor interacción, que entre el resto de niveles, y esto es porque presentan una superficie amplia y una linealización.

Debido a que se presentó la oportunidad de trabajar con una bromelina comercial, se ejecutó un diseño de bloques completos para establecer cual es el mejor tratamiento; dentro de estos se involucró a la bromelina comercial y a los concentrados proteínicos elaborados. La tabla ANOVA nos permitió saber que si existe diferencia significativa de los tratamientos, puesto que  $RV > Ft$ , es decir  $1305,470 > 3,204$ , lo que significa que cada tratamiento es diferente, motivo por el cual hay variación de la actividad enzimática, puesto que un tratamiento es mejor que otro.

Como se determinó que si existe diferencia significativa, se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey con un intervalo de confianza del 95%, para establecer cual es el mejor tratamiento. Al realizar el análisis en el software StatGraphics, establecimos que el mejor tratamiento es el #6, que corresponde al testigo 2 (Actividad enzimática del jugo de carne al actuar la bromelina comercial), seguido del tratamiento 5 que corresponde al testigo 1 (Actividad enzimática de la leche al actuar la bromelina comercial). Se puede observar claramente que los mejores tratamientos son aquellos en los que interviene la bromelina comercial, sin embargo los tratamientos en los que intervienen los concentrados proteínicos de bromelina elaborados también presentan buenos resultados, ya que se observan valores de actividad enzimática próximos al de los de bromelina comercial.

De los concentrados proteínicos elaborados, se observa que el mejor tratamiento es el #3, que corresponde a la actividad enzimática del jugo de carne al actuar el concentrado proteínico de bromelina en etanol. Le sigue el tratamiento 1, posteriormente el tratamiento 4, y por último el tratamiento 2, como se observa en la tabla C3.

En la gráfica C3 se observa la representación de los seis tratamientos antes mencionados, en donde se nota que con el tratamiento 3 se obtienen muy buenos resultados, puesto que se encuentra muy cercano a los valores de los tratamientos con bromelina comercial. Se puede establecer que la diferencia existente, es debido a que las enzimas elaboradas no se encuentran purificadas ya que para esto se requiere de equipos de alta tecnología, sin embargo, los resultados obtenidos son muy satisfactorios.

Se realizó una tabla ANOVA con los datos del diseño experimental  $2^2$  y diseño de bloques completos para así poder establecer si se acepta o se rechaza la hipótesis planteada. Debido a que los valores de  $F_t$  son menores a los de  $R_v$ , se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ , indicando que las soluciones extractoras, los sustratos proteínicos, el testigo 1 y el testigo 2, si presentan diferencia significativa en la actividad enzimática.

#### **4.3 Verificación de la hipótesis**

Los valores de  $R_v$  son mayores que los de  $F_t$ , ubicándose estos en la curva de Fisher en la zona de rechazo, motivo por el cual se rechaza la Hipótesis nula que indica que las soluciones extractoras no conducen a la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña, medida por la actividad enzimática, y se acepta la hipótesis alternativa que indica que las soluciones extractoras si conducen a la obtención de un concentrado de bromelina a partir de pulpa piña, medida por la actividad enzimática.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Esta investigación ha demostrado que la piña además de poseer características nutricionales, también tiene actividad proteolítica debido a la enzima bromelina. Los resultados obtenidos de la investigación son prometedores para que con un mayor grado de purificación, la bromelina sea factible aplicar en varias áreas de la industria.
- Para la extracción de bromelina a partir de pulpa de piña se pueden utilizar algunos agentes precipitantes de proteínas, como alcoholes o sales. Esta investigación utilizó al alcohol y a la sal más común como son el etanol, y el NaCl respectivamente. Con los resultados obtenidos, se pudo concluir que ambos concentrados de bromelina actúan como proteasas, pero el concentrado con etanol presenta mayor función catalítica que el concentrado con NaCl.
- La determinación de la actividad enzimática de una proteasa es factible realizarse basándose en el método de coagulación de la leche, propuesto por Balls y Hoover, el mismo que fue aplicado a la muestra de leche, en la cual se observó que los concentrados proteínicos si



hidrolizaron los enlaces peptídicos de sus proteínas, principalmente la caseína. Este método fue adaptado al jugo de carne, y se obtuvieron buenos resultados ya que también se dio la hidrólisis de sus proteínas (actina), y esto se noto por la variación de su viscosidad.

- Consideramos como fluidos newtonianos a los sustratos utilizados, leche y jugo de carne, motivo por el cual se empleó el viscosímetro de Cannon – Fenske para la determinación de su viscosidad al adicionar los concentrados proteínicos de bromelina. Se pudo observar que existe un incremento de la viscosidad a medida que pasa el tiempo de reacción, lo que indica que los concentrados de bromelina si funcionan como catalizadores ya que efectúan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Se puede concluir que mejores resultados se obtuvieron en las muestras de jugo de carne, ya que se dio un mayor aumento de su viscosidad en menor tiempo, indicando que las enzimas se acoplaron rápidamente al sustrato.
  
- Para la comprobación de la efectividad de los concentrados proteínicos de bromelina elaborados, se aplicó el mismo procedimiento de determinación de actividad enzimática utilizando bromelina comercial, la cual no se encontraba pura, ya que es utilizada como ablandadora de carnes. Se pudo observar que las curvas de reacción enzimática presentaron la misma tendencia que las de los concentrados de bromelina elaborados, y se obtuvo mejores resultados en el jugo de carne. Se puede concluir entonces que con la metodología aplicada de obtención de enzimas vegetales si se obtienen resultados de alto rendimiento.
  
- Utilizando un método gráfico de regresión se determinó la actividad enzimática de los sustratos proteínicos en función a la variación de su viscosidad con el tiempo. Se puede concluir que existe una mayor

actividad enzimática del concentrado de bromelina en etanol sobre la muestra de jugo de carne y la de leche, mientras que valores de actividad enzimática inferiores presenta el concentrado proteínico de bromelina en NaCl. Se puede observar entonces que el valor más alto de actividad enzimática 0,0061mPa.s/s corresponde al concentrado con etanol en el jugo de carne, y este valor se encuentra muy próximo a los obtenidos con bromelina comercial, lo que indica que se obtuvieron resultados satisfactorios.

## **5.2 Recomendaciones**

- Las industrias ecuatorianas, principalmente las alimentarias, farmacéuticas y textiles, deben enfocarse en la utilización de enzimas vegetales para acelerar sus procesos industriales, y con la aplicación de la biotecnología, obtener productos de excelente calidad.
- Es importante conocer la clase de enzimas a extraer, y la función que van a desempeñar sobre el sustrato, para así utilizar las soluciones extractoras más apropiadas, permitiendo la precipitación de las proteínas deseadas. Se requiere además tener en consideración la concentración de dichos agentes precipitantes.
- Si se desea aplicar proteasas sobre otros sustratos diferentes a la leche, es necesario estudiar cómo el principio propuesto por Balls y Hoover se puede adaptar a estos sustratos, y comprobar que las enzimas provoquen la hidrólisis de los enlaces peptídicos.
- Cuando se determina la viscosidad de los sustratos, es importante utilizar viscosímetros con tamaños de bulbo capilar adecuados y que se encuentren en relación a la viscosidad de la muestra; es necesario además emplear diferentes sustratos para determinar en cual se acoplan

mejor los concentrados de bromelina, siempre tomando en cuenta la estandarización de los sustratos, para obtener datos más confiables.

- Para comprobar la efectividad de los resultados que se obtienen de una fase experimental, es importante utilizar testigos o patrones, que permitan corroborar los datos obtenidos de la experimentación. Es recomendable además utilizar paquetes estadísticos que concedan el correcto análisis de los resultados obtenidos y así poder establecer los mejores tratamientos.
- Es recomendable en próximas investigaciones realizar la purificación del concentrado de bromelina extraído con etanol, pues es el que presentó mayor actividad enzimática, y se acopló a dos sustratos diferentes. El método de purificación a emplear deberá ser seleccionado de acuerdo a las propiedades de la proteasa, y en función a las aplicaciones en las que se desee emplear.

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1 Datos informativos**

**Título:** Purificación del concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol mediante cromatografía de intercambio iónico, y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos.

**Institución Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Beneficiarios:** Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, personas interesadas en el estudio de las enzimas e industrias que deseen aplicar tecnología enzimática.

**Ubicación:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos – FCIAL.

**Tiempo estimado para la ejecución:** 8 meses

**Costo:** \$ 3685,50 aproximadamente

## 6.2 Antecedentes de la propuesta

La producción de piña en Ecuador ha evolucionado favorablemente en la última década gracias a las excelentes condiciones para el cultivo de esta fruta, en el período de 2005 a 2010 se registró un incremento del 6.40% en la superficie cosechada, mientras que la producción de la fruta fresca medida en toneladas métricas ha tenido un crecimiento del 4.09%.

Las variedades de piña (Ananás) producidas en Ecuador son las siguientes:

- Cayena Lisa, más conocida como Champaca o Hawaiana, utilizada mayormente en la agroindustria.
- Golden Sweet o también conocida como MD2, la cual se caracteriza por su sabor dulce, tamaño y aroma. Esta variedad es la más exportada en Ecuador (PROECUADOR, 2011).

Dentro de la cadena de valor de la piña, el Ecuador se encuentra, principalmente, en el eslabón agrícola y recién está incursionando en la etapa industrial (UTEPI, 2006).

La piña es una fruta tropical de la familia de las bromeliaceae la cual tiene actividad proteolítica debida a la bromelina contenida (EC 3.4.22.33), que es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Es una proteína constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. Esta fracción enzimática ácida actúa hidrolizando proteínas como la caseína, la hemoglobina y la gelatina (ELIÉCER, 2003).

La obtención de bromelina se realiza a partir de pulpa de piña, en donde los procedimientos de extracción se caracterizan en general por realizarse a bajas temperaturas, y precipitar la enzima empleando solventes orgánicos o sales (CHÁVEZ y otros, 1995).

La bromelina presenta un amplio espectro de acciones en varias áreas de la industria y a nivel de la medicina, lo que le ha convertido en una de las cisteín proteasas más estudiadas, motivo por el cual su purificación es un paso muy importante posterior a la extracción (ELIÉCER, 2003).

La purificación de enzimas consiste es una serie de procesos que permiten aislar un sólo tipo de proteína de una mezcla compleja. La purificación por cromatografía ha sido una práctica de laboratorio durante muchos años. Estos mismos procedimientos cromatográficos pueden ser empleados de forma similar para el aislamiento de cantidades muy superiores de proteínas. La cromatografía es la única metodología con la selectividad suficiente para purificar una proteína de una mezcla proteica compleja con un grado de purificación final superior al 99,8% (RODAS, 2010).

### **6.3 Justificación**

Es importante y necesario dar un mayor valor a las frutas cultivadas en nuestro país que tienen principios activos, los cuales se conocen que presentan gran cantidad de aplicaciones en diferentes áreas de la industria, y a nivel medicinal.

La piña es una de las frutas con alto valor nutricional a más de contener a la bromelina, que es una enzima proteasa con alta funcionalidad ya que hidroliza las cadenas polipeptídicas de las proteínas sustrato.

La bromelina tiene una potencial aplicación en la biotecnología, empleándose de forma general para hidrolizar proteínas y específicamente, por ejemplo, para la elaboración de medios de cultivo y la obtención de hidrolizados proteicos; en la alimentación en el ablandamiento de carnes, la hidrólisis de gelatina, la clarificación de la cerveza, hidrólisis del grano de soya y otros, mientras que en la medicina son empleadas como antiinflamatorio, digestivo, para facilitar el transporte de antibióticos en el

organismo, en la lisis de células tumorales, para eliminar tejidos necrosados; asumiendo además una creciente significación en estudios relacionados con la regulación biológica (CHÁVEZ y otros, 1995).

Debido a las varias aplicaciones que tiene la enzima bromelina, y a la disponibilidad de la piña durante todo el año en el país, se ha propuesto realizar la purificación del concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol, mediante cromatografía de intercambio iónico. Esto es importante realizar debido a que se obtuvo resultados satisfactorios en la fase de extracción y concentración de la bromelina, proponiendo que se aplique la metodología adecuada de cromatografía y así evaluar el porcentaje de purificación alcanzado de la enzima, ya que este método es ideal porque los intercambiadores celulósicos iónicos son ideales para diversas operaciones como primera etapa en varios procesos.

La creciente apertura comercial, impone al país el desafío de incorporarse de manera cada vez más intensa a las corrientes internacionales del conocimiento, el desarrollo de ciencia y tecnología, la transferencia tecnológica y la innovación.

## **6.4 Objetivos**

### **6.4.1 General**

Determinar la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina purificado.

### **6.4.2 Específicos**

- Cuantificar las proteínas del concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol, mediante el método de Lowry.

- Purificar el concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol, mediante cromatografía de intercambio iónico.
- Determinar la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina en los sustratos de hidrólisis, leche y jugo de carne, mediante variación de su viscosidad.

### **6.5 Análisis de factibilidad**

El proyecto de investigación se relaciona con la rama de la bioquímica y en particular con lo referente a la obtención de enzimas con actividad proteolítica y su aplicación, además, con la Biotecnología, la Industria Alimenticia y la Medicina.

El presente estudio es de tipo investigativo y tecnológico ya que se puede implementar una nueva metodología confiable para la obtención de un concentrado de bromelina por precipitación alcohólica, y su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, alcanzando una enzima con excelente actividad. Esto es, comprobándose su catálisis ya que acelera la hidrólisis de los enlaces peptídicos de la leche y del jugo de carne, y esto se puede determinar por la variación de su viscosidad.

La obtención de proteasas influye además en el ámbito económico ya que enzimas purificadas pueden ser empleadas en la industria para mejorar los procesos y así obtener nuevos productos de alta calidad.

Es de carácter investigativo ya que la metodología empleada y los valores de actividad enzimática obtenidos de la evaluación son importantes porque permiten continuar con estudios o contribuyen a otros tipos de investigaciones relacionadas con el tema.



**Tabla 5.** Costos de la propuesta de investigación

<b>CONCEPTO</b>	<b>VALOR (\$)</b>
<b>Recursos humanos</b>	430,00
<b>Recursos materiales</b>	
Materia prima	30,00
Reactivos	200,00
Instrumentos	350,00
Equipos	2400,00
Útiles de oficina	100,00
<b>Subtotal</b>	3510,00
<b>Imprevistos 5%</b>	175,50
<b>Total</b>	3685,50

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

## **6.6 Fundamentación**

La mayor parte de las investigaciones bioquímicas requieren la purificación, al menos parcial, de las sustancias objeto de estudio. Esto requiere generalmente un gran esfuerzo ya que una célula contiene miles de sustancias diferentes, la molécula que buscamos puede ser extremadamente inestable o encontrarse a concentraciones muy bajas.

Las separaciones cromatográficas se basan en las diferencias de carga, tamaño o afinidad de las diferentes proteínas. Uno de los métodos más habitualmente utilizados para la separación de proteínas es la cromatografía en columna, aunque también existe la cromatografía en papel y en placa.

La columna está rellena con un material sólido con las características químicas adecuadas (fase estacionaria), y una solución tamponada se hace pasar a través de la columna (fase móvil). El extracto crudo se aplica en la

parte superior de la columna y va poco a poco entrando en la columna con la fase móvil. Cada proteína migrará a distinta velocidad según su grado de afinidad por la fase estacionaria.

Generalmente estas cromatografías se realizan de una forma semiautomática, la fase móvil se hace pasar a la columna a través de una bomba peristáltica y un colector de fracciones va recogiendo el eluyente que sale de columna. Este colector hace que el tubo vaya cambiando cada cierto número de gotas o de volumen. Después hay que localizar en que tubo o tubos está la proteína que se pretende purificar.

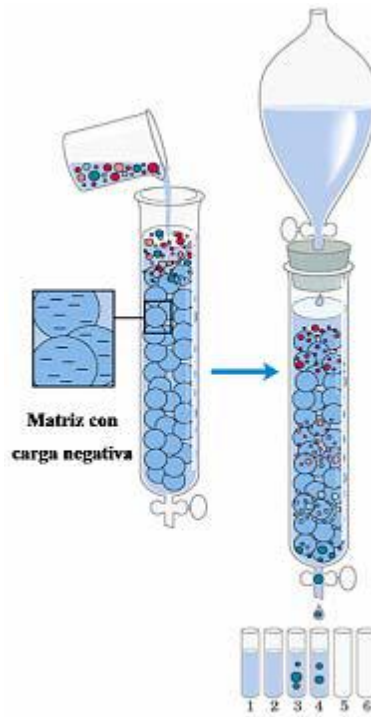
El tipo de cromatografía que se propone utilizar para la purificación del concentrado de bromelina es la de intercambio iónico, debido a que presenta características como: Alta resolución, de fácil uso, resultados altamente reproducibles y de bajo costo.

### **Cromatografía de intercambio iónico:**

En ella, la columna está rellena con un soporte al que van unidos grupos cargados positivamente (intercambio aniónico) o negativamente (intercambio catiónico). Estos grupos cargados normalmente están neutralizados por iones del tampón. Estos iones son reversiblemente reemplazados por las proteínas con más tendencia a unirse al soporte. Las proteínas cargadas pueden por lo tanto unirse a intercambiadores catiónicos o aniónicos dependiendo de su carga neta. Las proteínas más cargadas se unirán más fuertemente al intercambiador y por lo tanto serán más difíciles de eluir. La afinidad con la que una proteína se une a un intercambiador iónico depende de la fuerza iónica del medio, debido a la competencia entre los grupos cargados de la proteína y los iones de la fase móvil.

Una vez pegadas las proteínas, para eluirlas (retirarlas) de la columna, se suele ir subiendo la fuerza iónica de la fase móvil (aumentando la

concentración de sal, NaCl), de esta forma se eluyen primero las proteínas mas débilmente retenidas y cuando la fuerza iónica sea mayor saldrán las proteínas más cargadas y por lo tanto más retenidas.



**Fig 6.** Cromatografía de intercambio iónico (ITESCAM, s.f).

### 6.7 Metodología

Para la purificación del concentrado con bromelina extraído con etanol, y la determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos, se seguirá el siguiente modelo operativo:

**Tabla 6.** Modelo operativo (Plan de acción)

<b>FASES</b>	<b>METAS</b>	<b>ACTIVIDADES</b>	<b>RESPONSABLES</b>	<b>RECURSOS</b>	<b>PRESUPUESTO</b>	<b>TIEMPO</b>
1. Formulación de la propuesta	Purificar el concentrado proteínico de bromelina y determinar su actividad enzimática en sustratos proteínicos.	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnico Económicos	450	2 meses
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta	Pruebas preliminares de la purificación del concentrado de bromelina	Investigador	Humanos Técnico Económicos	600	1 mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Determinar la viscosidad de los sustratos al aplicar la enzima	Investigador	Humanos Técnico Económicos	2500	3 meses
4. Evaluación de la propuesta	Comprobación de la metodología implementada	Determinación de la actividad enzimática	Investigador	Humanos Técnico Económicos	135	2 meses

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

## 6.8 Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto de investigación Ing. Juan Alvarado y Egda. Violeta Dalgo F.

**Tabla 7.** Administración de la propuesta

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLE
Determinación de la actividad enzimática del concentrado proteínico de bromelina por viscosidad	Aplicación de métodos espectrométricos de alto costo	<p>Concentrado de bromelina con alto nivel de actividad sobre los sustratos.</p> <p>Datos confiables de la actividad enzimática.</p> <p>Optimización de la metodología planteada.</p>	<p>Cuantificar las proteínas del concentrado de bromelina.</p> <p>Purificar el concentrado de bromelina.</p> <p>Utilizando ecuaciones lineales, evaluar la actividad enzimática del concentrado en función a la variación de su viscosidad.</p>	<p>Investigadores:</p> <p>Ing. Juan Alvarado</p> <p>Egda. Violeta Dalgo</p>

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

## 6.9 Previsión de la evaluación

**Tabla 8.** Previsión de la evaluación

<b>PREGUNTAS BÁSICAS</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
<b>¿Quiénes solicitan evaluar?</b>	Estudiantes de la facultad, interesados en el área de enzimología e industrias que deseen aplicar tecnología enzimática.
<b>¿Por qué evaluar?</b>	Provee información técnica de importancia para la extracción y purificación de enzimas vegetales.
<b>¿Para qué evaluar?</b>	Para establecer la actividad enzimática de la bromelina sobre los sustratos
<b>¿Qué evaluar?</b>	Catálisis de la bromelina sobre los sustratos
<b>¿Quién evalúa?</b>	Tutor del proyecto  Calificadores
<b>¿Cuándo evaluar?</b>	Todo el tiempo, desde las pruebas preliminares hasta la fase final de experimentación
<b>¿Cómo evaluar?</b>	Mediante instrumentos de evaluación
<b>¿Con qué evaluar?</b>	Experimentación  Datos bibliográficos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, R. 2011. Estudio de la variación de la actividad enzimática proteolítica del látex de babaco (*Vasconcellea heilbornii cv babaco*) en función de la edad del fruto. 86pp. **Disponible en:** <http://biblioteca.epn.edu.ec/catalogo/fulltext/CD-3656.pdf> **Fecha:** 2012-04-08.

AGUIRRE, E., CASTILLO, P. (2009). Extracción y Estudio Comparativo de las Enzimas Proteolíticas del Fruto Toronche (*Carica-Stipulata*) y de la Papaya (*Carica-Papaya*) y su Aplicación en la Industria Alimenticia. 7pp. **Disponible en:** <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/7532/1/Extraccion%20y%20Estudio%20Comparativo%20de%20las%20Enzimas%20Proteol%C3%ADticas.pdf> **Fecha:** 2012-01-05.

ALVARADO, J. 1996. Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. 519pp. Ed. Radio comunicación. Ambato – Ecuador. Págs. 182 – 185.

ASAMBLEA CONSTITUYENTE. 2008. Constitución 2008. Montecristi, Ecuador. 218pp.

BIXQUERT, P. (s.f). Estructura, función y síntesis de las proteínas. **Disponible en:** <http://www.robertexto.com/archivo19/proteinas.htm> **Fecha:** 2012-03-28.

CARVAJAL, C., MÁRQUEZ, M., PÉREZ, A., CHÁVEZ, M., HERNÁNDEZ, M. 2010. Caracterización cinética de un preparado semipurificado de bromelina para uso antitumoral. **Disponible en:** [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962010000200004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962010000200004&script=sci_arttext) **Fecha:** 2011-11-10.

CASILARI, I., HIDALGO, R. 2007. Proyecto de exportación de mermelada de mango con trocitos de piña al mercado europeo. **Disponible en:** <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3720/1/6247.pdf>

**Fecha:** 2011-11-10.

CHÁVEZ, M., MÁRQUEZ, M., HERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, G., SANTOS, R., GONZÁLEZ, J., CARVAJAL, C. 1995. Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña. 14pp. **Disponible en:** <http://es.scribd.com/doc/53945445/Bro-Me-Lin-A> **Fecha:** 2012-06-08.

COCHRAN, W & COX, G. 1974. Diseños experimentales. Tercera edición. Ed. Trillas. México. Págs. 120 – 131, 176 – 191.

CODEX ALIMENTARIUS. 2011. Norma general del CODEX para los aditivos alimentarios. CODEX stan 192-1995. 297pp. **Disponible en:** [http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS\\_192s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf) **Fecha:** 2011-11-22

CONTRERAS, R. 2004. El paradigma científico según Kuhn. Desarrollo de las ciencias: Del conocimiento artesanal hasta la ciencia normal. 9pp. **Disponible en:** [http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/ricardo/PDF/Paradigma\\_Cientifico\\_seg\\_un\\_Kuhn.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/ricardo/PDF/Paradigma_Cientifico_seg_un_Kuhn.pdf) **Fecha:** 2011-11-10.

CORREA, M. & CORREA, R. Técnica y calidad instrumental 1. 2006. **Disponible en:** [http://www.cecylt6.ipn.mx/materiales/Tecn\\_Calid\\_Instrum\\_I\\_Ecol/sitio/aa0650.html](http://www.cecylt6.ipn.mx/materiales/Tecn_Calid_Instrum_I_Ecol/sitio/aa0650.html) **Fecha:** 2012-03-28.

CROCKFORD, H., KNIGHT, S. 1991. Fundamentos de físico química. Vigésima edición. Compañía editorial continental. México. Págs. 68 – 73.



CUADRADO, J., IZURIETA, K., PALACIOS, R. (2009). Fomento del sector agroindustrial de la piña en pequeñas y medianas inversiones. 9pp.

**Disponible**

**en:**

<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/450/1/823.pdf> **Fecha:** 2012-03-28.

ELIÉCER, J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales.

**Disponible**

**en:**

<http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Ar11.pdf> **Fecha:** 2011-11-10.

FÉLIX, R. 2008. Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuierón (*Ficus apollinaris*).

**Disponible**

**en:**

<http://biblioteca.epn.edu.ec/catalogo/fulltext/CD-1335.pdf> **Fecha:** 2011-11-10.

FRATTINI, A., FISCHER, G., TAMBOURGI, E. (s.f). Optimizing bromelain extraction by reversed micelles from pineapple fruit. 6pp. **Disponible en:**

[http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/icheap8-](http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/icheap8-pres07/icheap8webpapers/258%20Frattini%20Fileti.pdf)

[pres07/icheap8webpapers/258%20Frattini%20Fileti.pdf](http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/icheap8-pres07/icheap8webpapers/258%20Frattini%20Fileti.pdf) **Fecha:** 2011-11-18.

GACESA, P; HUBBLE, J. 1941 Tecnología de las enzimas. Segunda edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza – España. Págs. 36-37, 52- 57.

GALLARDO, L., SÁNCHEZ, A., MONTALVO, C., ALONSO, A. (s.f). Extracción de bromelina a partir de residuos de piña. 9pp. **Disponible en:**

<http://www.uppuebla.edu.mx/Profesores/BIOTECNOLOGIA/AlejandroAlonso/bromelina.pdf> **Fecha:** 2011-11-13.

GAUTAM, S., MISHRA, S., DASH, V., GOYAL, A., RATH, G. 2010. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelian from stem and fruit of pineapple plant. 10pp. **Disponible en:**

<http://www.pharm.chula.ac.th/tjps/ContentVol34No2/V34-2Art3%20pp67-76.pdf> **Fecha:** 2011-11-18

GONZÁLEZ, A. 2003. Los paradigmas de investigación en las ciencias sociales. 11pp. **Disponible en:** [http://www.cenit.cult.cu/sites/revista\\_islas/pdf/138\\_12\\_Alfredo.pdf](http://www.cenit.cult.cu/sites/revista_islas/pdf/138_12_Alfredo.pdf) **Fecha:** 2011-11-18

GONZÁLEZ, J. (s.f). Cinética Enzimática. **Disponible en:** <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#kmb> **Fecha:** 2011-11-23.

HERNÁNDEZ, M., CHÁVEZ, M., BÁEZ, R., CARVAJAL, C. MÁRQUEZ, M., MORRIS, H., SANTOS, R., GONZÁLEZ, J., QUESADA, V., RODRÍGUEZ, C. 2003. Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). 3pp. **Disponible en:** <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2003/20/3/BA002003RP180-182.pdf> **Fecha:** 2011-11-13.

HIPERTEXTOS DEL ÁREA DE LA BIOLOGÍA. 2003. Mecanismo de acción de las enzimas. **Disponible en:** <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/enzimas.htm#Enzimas> **Fecha:** 2011-11-10.

ITESCAM. (s.f). Tema 7: Enzimas. 10pp. **Disponible en:** <https://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r60942.PDF> **Fecha:** 2012-02-28.

ITESCAM. (s.f). Purificación de proteínas. **Disponible en:** <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r46007.PDF> **Fecha:** 2012-05-20

LAGUNA, J. 1976. Bioquímica. Segunda edición. Ed. La prensa mexicana. México. Págs. 38 – 49.

PEI, M., BAHARIL, S., AISHAH, N., YU, L., MAJID, A., ADIBAH, F. 2005. Pilot scale extraction of proteolytic enzyme bromelain from pineapple (*Ananas comosus*). **Disponible en:** <http://eprints.utm.my/5270/> **Fecha:** 2011-11-18.

PÉREZ, A., CARVAJAL, C., TORRES, M., MARTÍN, M., PIÑA, D., TRUJILLO, R., LORENZO, J., NATALUCCI, C., HERNÁNDEZ, M. 2006. Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*. **Disponible en:** [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol11\\_2\\_06/pla03206.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol11_2_06/pla03206.htm) **Fecha:** 2011-11-18

PLANEACIÓN ESTRATÉGICA. 2009. Método inductivo y deductivo. **Disponible en:** <http://planeacionestrategica.blogspot.es/1236115440/> **Fecha:** 2011-11-22

PROECUADOR. 2011. Perfil de piña ecuatoriana. 26pp. **Disponible en:** <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2011/11/PROEC-P2011-PINA-ECUATORIANA.pdf> **Fecha:** 2011-12-08

PULIDO, A. 2007. Estudio técnico – económico para la fabricación de bromelina. 51pp. **Disponible en:** <http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/7327/1/PULIDO%20SALINAS.pdf> **Fecha:** 2011-12-18

RAMOS, L., LUNA, S., LÓPEZ, F. (s.f). Obtención de bromelinas a partir de desechos agroindustriales de la piña. 1pp. **Disponible en:** [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA\\_I/CARTEL/CI-4.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_I/CARTEL/CI-4.pdf) **Fecha:** 2011-11-18.

ROBAYO, F. (2011). Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la bromelina a partir de la piña. Tesis de Ingeniería Bioquímica, Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. 60pp.

ROBAYO, F., DE LA CRUZ, C., VILLAVICENCIO, C., ALVARADO, J. 2011. Variación de la actividad enzimática de tres proteasas de origen vegetal, medida en leche. Revista de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Vol. 19. Págs. 90 – 95.

SINGH, P & HELDMAN, D. 1998. Introducción a la ingeniería de los alimentos. 544pp. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza – España. Pág. 502

UNIDAD TÉCNICA DE ESTUDIOS PARA LA INDUSTRIA (UTEPI). 2006. Piña – Estudio agroindustrial en el Ecuador. **Disponible en:** [http://www.unido.org/fileadmin/user\\_media/Publications/Pub\\_free/Pina\\_estudio\\_agroindustrial\\_en\\_el\\_Ecuador.pdf](http://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Pina_estudio_agroindustrial_en_el_Ecuador.pdf) **Fecha:** 2011-12-08

WISEMAN, A. 1985. Manual de Biotecnología de los Enzimas. Segunda edición. Ed. Acribia S.A. Zaragoza – España. Págs. 48 – 63.

**ANEXOS**

# **ANEXO A**

## **TABLAS DE RESULTADOS**

**Tabla A1.** Valores de humedad y materia seca de los concentrados proteínicos de bromelina extraídos con etanol y NaCl.

<b>Muestra</b>	<b>* Humedad (%)</b>	<b>* Materia seca (%)</b>
<b>Concentrado de bromelina en etanol</b>	8,1	91,9
<b>Concentrado de bromelina en NaCl</b>	5,6	94,4

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A2.** Constante K de los viscosímetros Cannon - Fenske para la medida de viscosidad.

<b>Viscosímetro</b>	<b>* Tiempo de escurrido del agua t (s)</b>	<b>Viscosidad <math>\mu(mPa.s)</math></b>	<b>Densidad <math>\rho(\frac{kg}{m^3})</math></b>	<b>Constante K <math>K(mPa.\frac{m^3}{kg})</math></b>
1	634,5	9,9341E-01	998,2	1,5685E-06
2	6,0	9,9341E-01	998,2	1,6587E-04
3	294,0	9,9341E-01	998,2	3,3851E-06
4	35,5	9,9341E-01	998,2	<b>2,8034E-05</b>
5	72,5	9,9341E-01	998,2	1,3727E-05
6	33,0	9,9341E-01	998,2	3,0158E-05
7	75,5	9,9341E-01	998,2	1,3182E-05
8	78,8	9,9341E-01	998,2	1,2638E-05
9	35,0	9,9341E-01	998,2	2,8434E-05

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.



**Tabla A3.** Densidad y viscosidad de la leche y jugo de carne.

<b>Sustrato</b>	<b>Densidad</b> $\rho(\frac{kg}{m^3})$	<b>Viscosidad</b> $\mu(mPa.s)$
Leche	1030	2,30
Jugo de carne	1038	2,52

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A4.** Viscosidad de la leche al adicionar el concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	116,3	2,8034E-05	1030	3,36
120	122,0	2,8034E-05	1030	3,52
240	133,3	2,8034E-05	1030	3,85
360	146,3	2,8034E-05	1030	4,22
480	164,3	2,8034E-05	1030	4,74
600	187,5	2,8034E-05	1030	5,41
720	211,0	2,8034E-05	1030	6,09
840	223,0	2,8034E-05	1030	6,44
960	234,5	2,8034E-05	1030	6,77
1080	238,8	2,8034E-05	1030	6,89
1200	242,3	2,8034E-05	1030	7,00

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado.

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A5.** Viscosidad de la leche al adicionar el concentrado proteínico de bromelina extraído con NaCl.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	106,8	2,8034E-05	1030	3,08
120	113,5	2,8034E-05	1030	3,28
240	125,3	2,8034E-05	1030	3,62
360	137,0	2,8034E-05	1030	3,96
480	147,8	2,8034E-05	1030	4,27
600	162,8	2,8034E-05	1030	4,70
720	178,5	2,8034E-05	1030	5,15
840	185,3	2,8034E-05	1030	5,35
960	190,8	2,8034E-05	1030	5,51
1080	193,5	2,8034E-05	1030	5,59
1200	196,3	2,8034E-05	1030	5,67

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A6.** Viscosidad de la leche al adicionar bromelina comercial.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	142,5	2,8034E-05	1030	4,12
120	154,5	2,8034E-05	1030	4,46
240	164,8	2,8034E-05	1030	4,76
360	184,5	2,8034E-05	1030	5,33
480	209,5	2,8034E-05	1030	6,05
600	239,5	2,8034E-05	1030	6,92
720	264,5	2,8034E-05	1030	7,64
840	280,0	2,8034E-05	1030	8,09
960	290,5	2,8034E-05	1030	8,39
1080	290,8	2,8034E-05	1030	8,40
1200	291,0	2,8034E-05	1030	8,40

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A7.** Viscosidad del jugo de carne al adicionar el concentrado proteínico de bromelina extraído con etanol.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	126,8	2,8034E-05	1038	3,69
120	135,5	2,8034E-05	1038	3,94
240	147,0	2,8034E-05	1038	4,28
360	162,8	2,8034E-05	1038	4,74
480	182,0	2,8034E-05	1038	5,30
600	207,8	2,8034E-05	1038	6,05
720	237,0	2,8034E-05	1038	6,90
840	252,3	2,8034E-05	1038	7,34
960	262,5	2,8034E-05	1038	7,64
1080	267,5	2,8034E-05	1038	7,79
1200	270,8	2,8034E-05	1038	7,88

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A8.** Viscosidad del jugo de carne al adicionar el concentrado proteínico de bromelina extraído con NaCl.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	112,5	2,8034E-05	1038	3,27
120	119,0	2,8034E-05	1038	3,46
240	127,3	2,8034E-05	1038	3,70
360	141,3	2,8034E-05	1038	4,11
480	157,0	2,8034E-05	1038	4,57
600	176,0	2,8034E-05	1038	5,12
720	192,8	2,8034E-05	1038	5,61
840	200,5	2,8034E-05	1038	5,84
960	204,5	2,8034E-05	1038	5,95
1080	208,5	2,8034E-05	1038	6,07
1200	212,0	2,8034E-05	1038	6,17

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A9.** Viscosidad del jugo de carne al adicionar bromelina comercial.

Tiempo de toma de muestra t (s)	* Tiempo de escurrido t (s)	Constante K $K(mPa \cdot \frac{m^3}{kg})$	Densidad $\rho(\frac{kg}{m^3})$	Viscosidad $\mu(mPa \cdot s)$
0	166,3	2,8034E-05	1038	4,84
120	177,5	2,8034E-05	1038	5,17
240	189,5	2,8034E-05	1038	5,51
360	207,3	2,8034E-05	1038	6,03
480	230,5	2,8034E-05	1038	6,71
600	261,0	2,8034E-05	1038	7,60
720	290,5	2,8034E-05	1038	8,45
840	303,0	2,8034E-05	1038	8,82
960	312,5	2,8034E-05	1038	9,09
1080	313,5	2,8034E-05	1038	9,12
1200	313,8	2,8034E-05	1038	9,13

\* Valores promedios de dos réplicas y por duplicado

**Fuente:** Laboratorio de Ingeniería de Procesos

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

**Tabla A10.** Valores de la actividad enzimática de los sustratos de hidrólisis con concentrados proteínicos de bromelina.

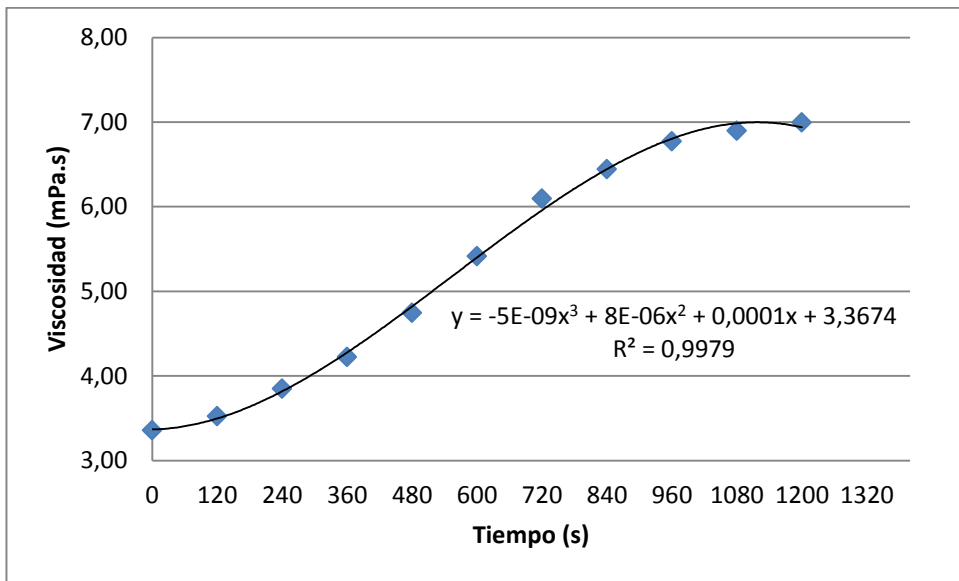
<b>Sustrato</b>	<b>Actividad enzimática (<math>\frac{mPa.s}{s}</math>)</b>		
	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Promedio</b>
Leche – Bromelina en etanol	0,0052	0,0053	0,00525
Leche – Bromelina en NaCl	0,0034	0,0033	0,00335
Leche – Bromelina comercial	0,0065	0,0065	0,00650
Jugo de carne – Bromelina en etanol	0,0061	0,0060	0,00605
Jugo de carne – Bromelina en NaCl	0,0042	0,0042	0,00420
Jugo de carne – Bromelina comercial	0,0068	0,0068	0,00680

**Elaborado por:** DALGO, 2012.

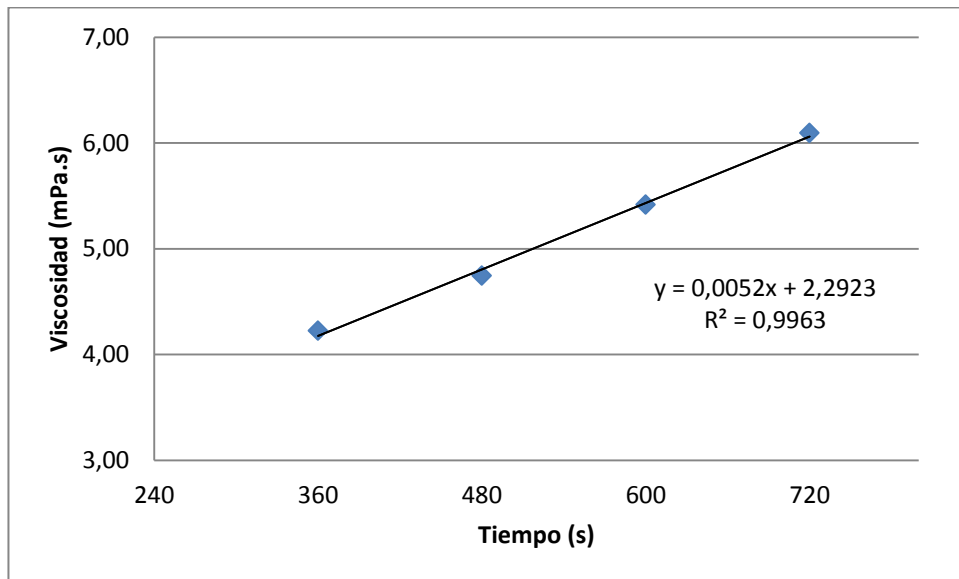


**ANEXO B**

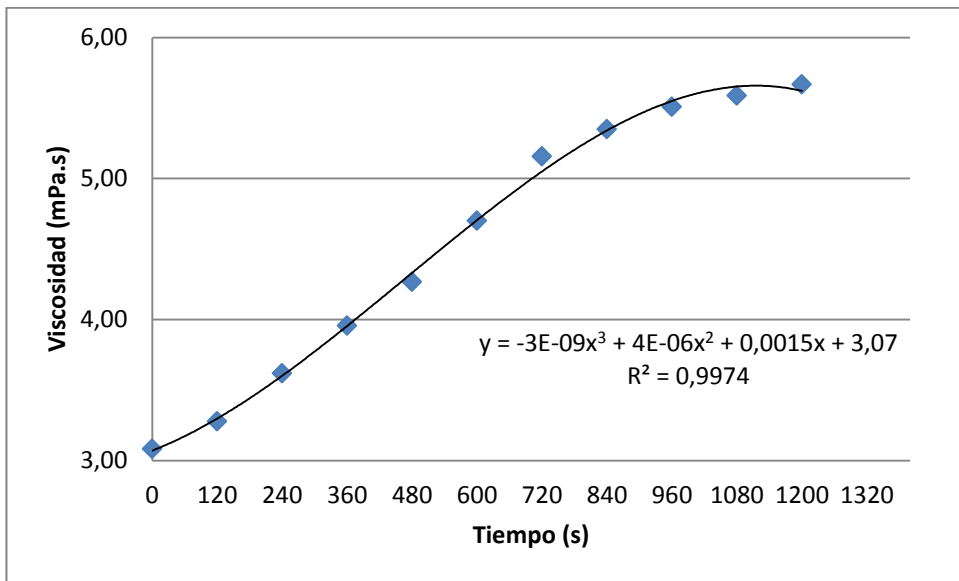
**GRÁFICAS**



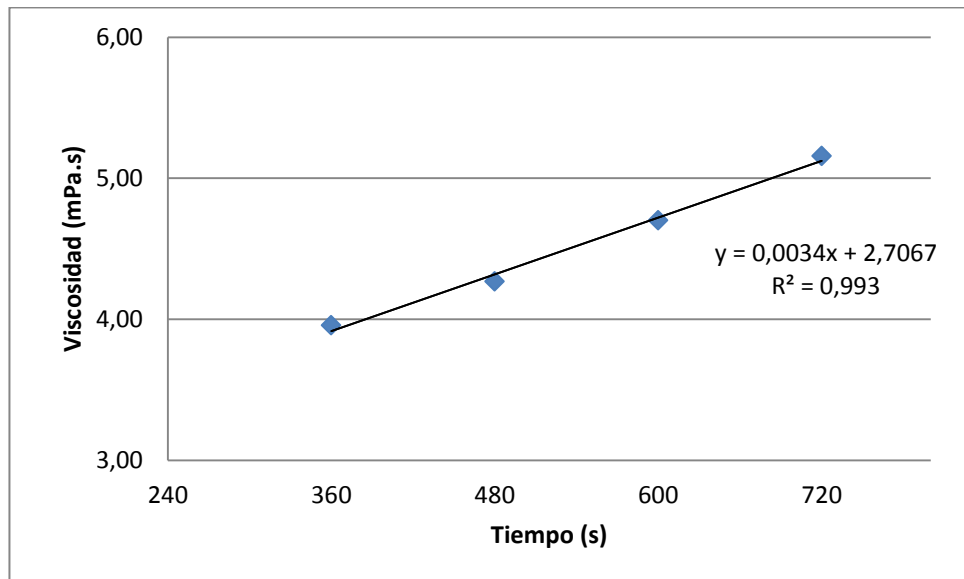
**Gráfica B1.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



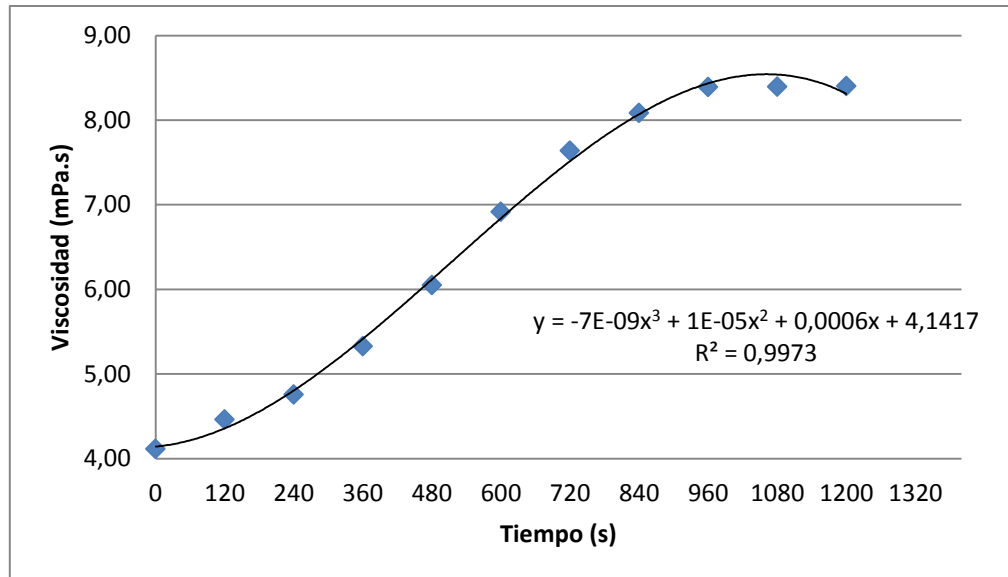
**Gráfica B2.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación lineal.



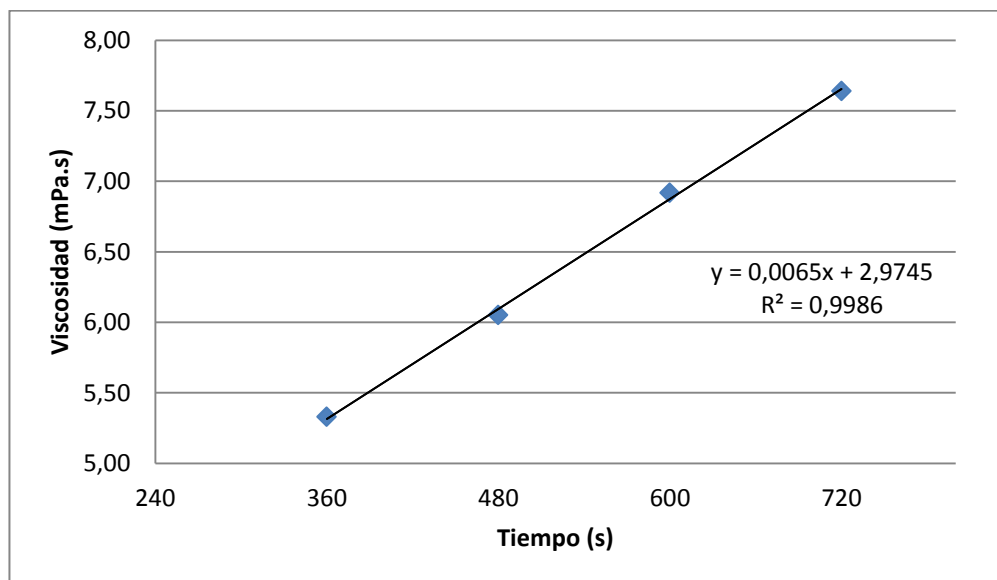
**Gráfica B3.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



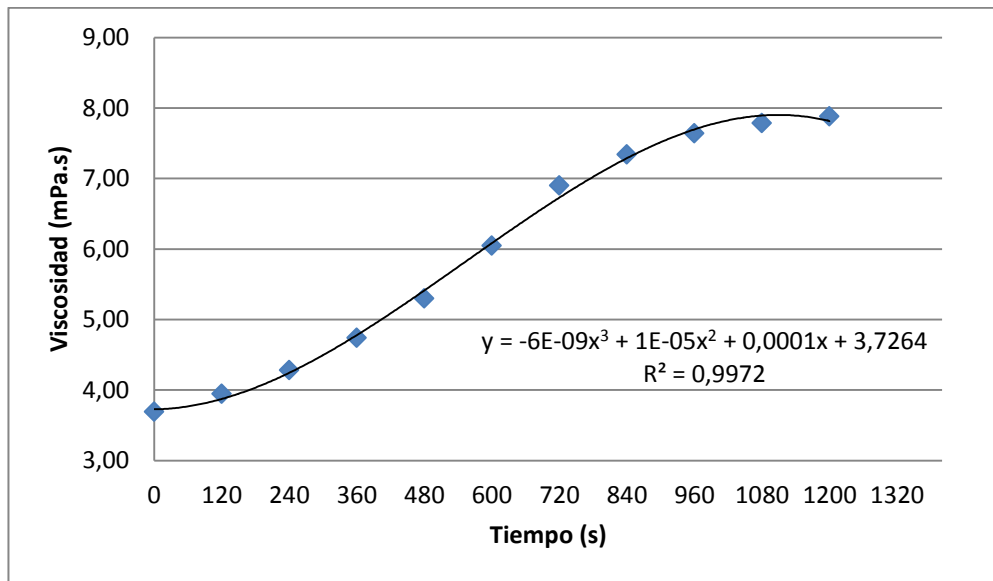
**Gráfica B4.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación lineal.



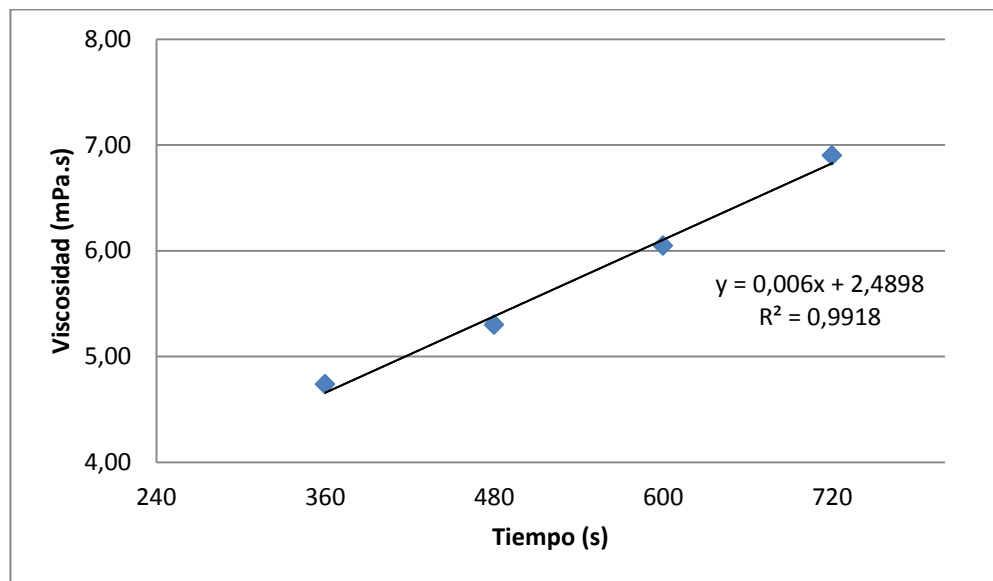
**Gráfica B5.** Cambios de la viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



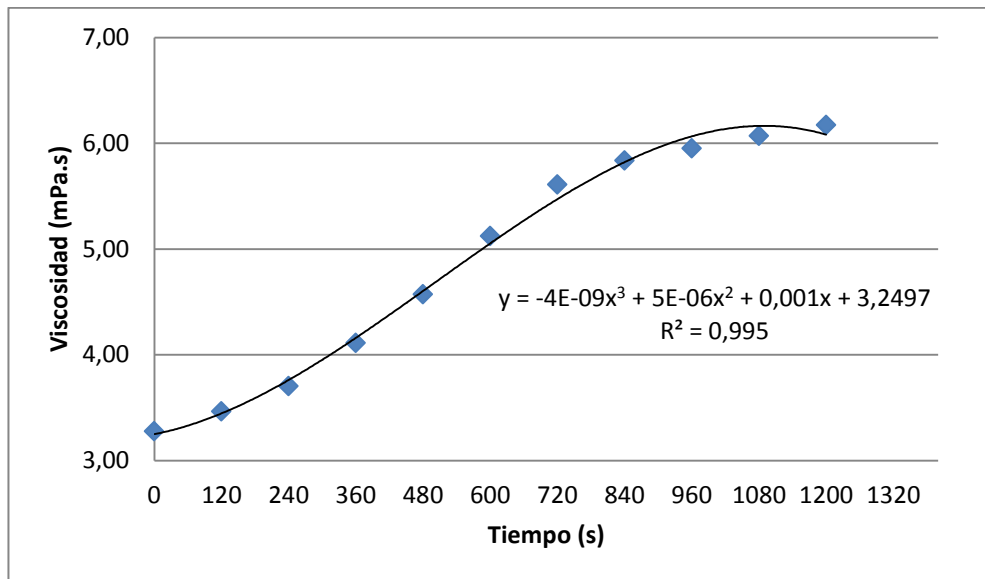
**Gráfica B6.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad de la leche en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación lineal.



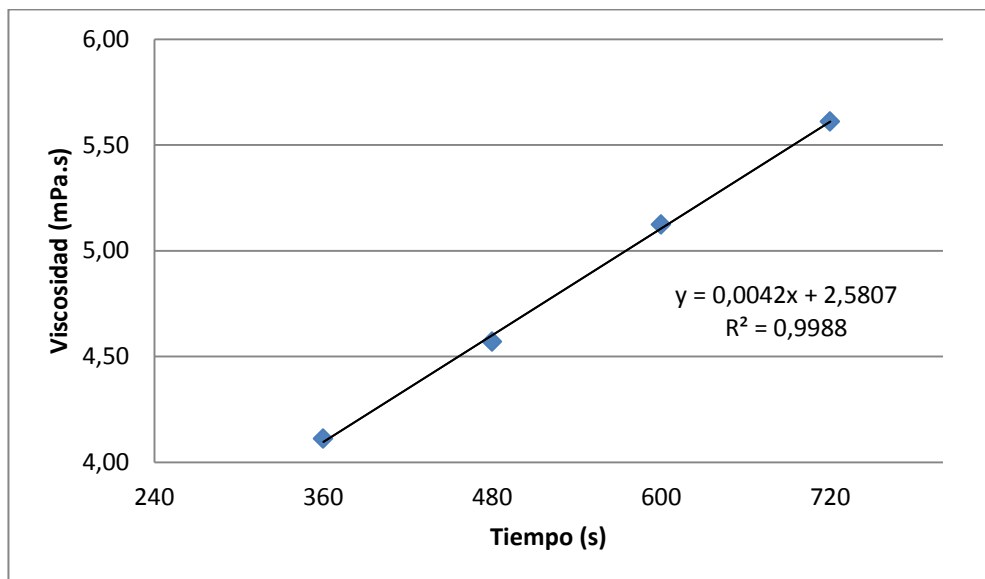
**Gráfica B7.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



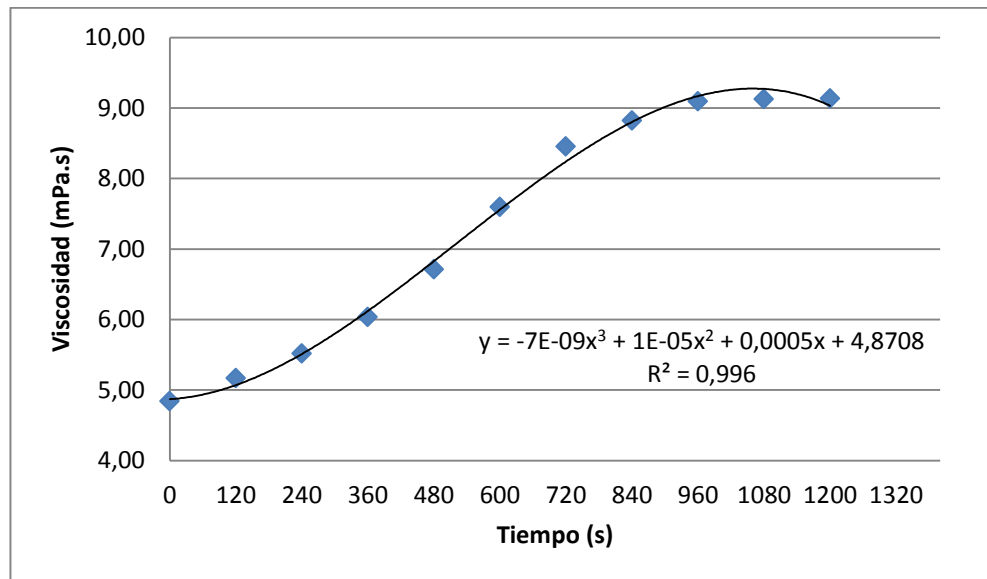
**Gráfica B8.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con etanol, con la correspondiente ecuación lineal.



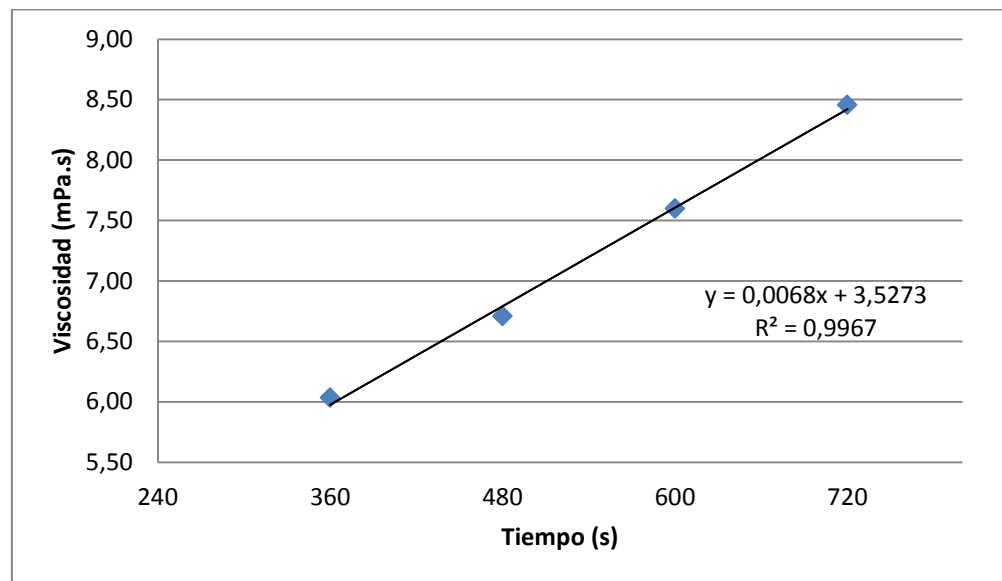
**Gráfica B9.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



**Gráfica B10.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina extraída con NaCl, con la correspondiente ecuación lineal.



**Gráfica B11.** Cambios de la viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación polinómica de regresión.



**Gráfica B12.** Determinación de la actividad enzimática mediante pruebas de cambios de viscosidad del jugo de carne en función del tiempo por efecto de bromelina comercial, con la correspondiente ecuación lineal.

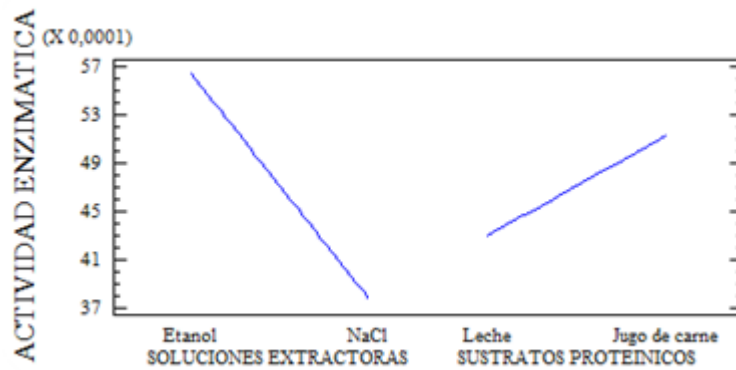
**ANEXO C**

**ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO**

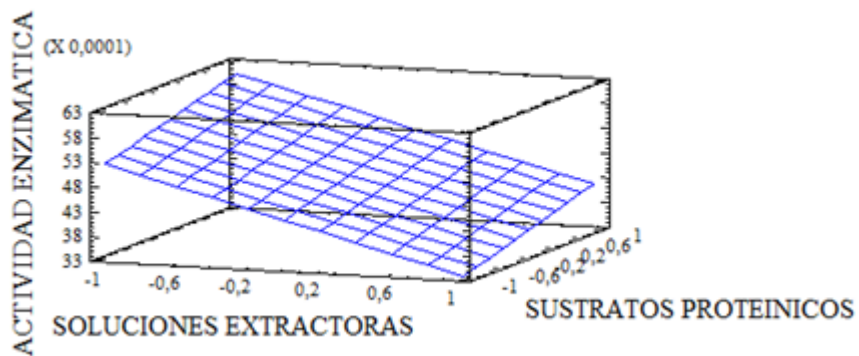


**Tabla C1.** Optimización del diseño factorial 2<sup>2</sup>

FACTOR	NIVEL BAJO (-1,0)	NIVEL ALTO (+1,0)	ÓPTIMO
Soluciones extractoras	Etanol	NaCl	-1,0
Sustratos proteínicos	Leche	Jugo de carne	1,0



**Gráfica C1.** Optimización del diseño factorial 2<sup>2</sup>



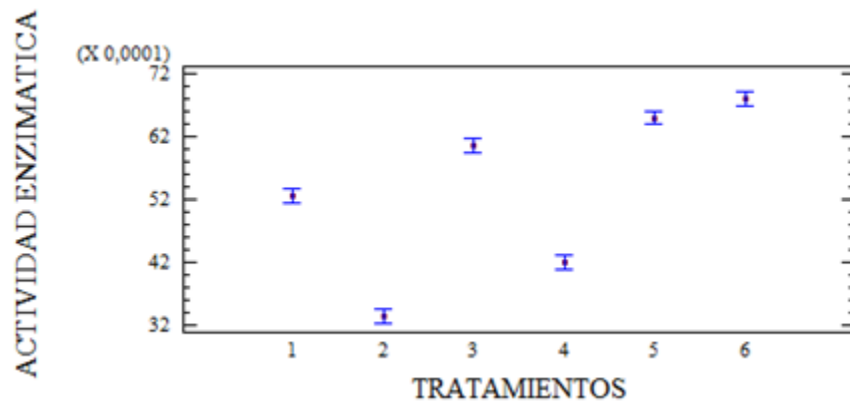
**Gráfica C2.** Respuesta de superficie

**Tabla C2.** Diseño de bloques completos

FUENTE DE VARIACIÓN FV	SUMA DE CUADRADOS SC	GRADOS DE LIBERTAD GL	CUADRADOS MEDIOS CM	RAZÓN DE VARIANZA RV	Ft
A: Observaciones	8,333E-10	1	8,333E-10	0,294	4,844
B: Tratamientos	1,849E-05	5	3,699E-06	1305,470	3,204
Residuo	1,417E-08	5	2,833E-09		
Total	1,851E-05	11			

**Tabla C3.** Prueba de comparación múltiple Tukey al 95% para los diferentes tratamientos

TRATAMIENTOS		$\overline{AE}$	GRUPOS HOMOGENEOS
Jugo de carne – bromelina comercial	6	0,0068	A
Leche – bromelina comercial	5	0,0065	B
Jugo de carne – etanol	3	0,0061	C
Leche – etanol	1	0,0053	D
Jugo de carne – NaCl	4	0,0042	E
Leche – NaCl	2	0,0034	F



**Gráfica C3.** Prueba de Tukey al 95% para los tratamientos

**Tabla C4.** Cuadro de análisis de varianza

FUENTE DE VARIACIÓN FV	SUMA DE CUADRADOS SC	GRADOS DE LIBERTAD GL	CUADRADOS MEDIOS CM	RAZÓN DE VARIANZA RV	Ft
<b>A:</b> Soluciones extractoras	7,031E-06	1	7,031E-06	2556,818	4,844
<b>B:</b> Sustratos proteínicos	1,361E-06	1	1,361E-06	495,000	4,844
<b>AB:</b> Soluciones * Sustratos	1,250E-09	1	1,250E-09	0,455	4,844
Testigo 1	4,273E-06	1	4,273E-06	1553,787	4,844
Testigo 2	5,828E-06	1	5,828E-06	2119,104	4,844
Réplicas	1,250E-09	1	1,250E-09	0,455	4,844
Error	1,375E-08	5	2,750E-09		
Total	1,851E-05	11			

**ANEXO D**

**FOTOGRAFÍAS**

## OBTENCIÓN DEL JUGO DE PIÑA



**Fot D1.** Selección de la piña



**Fot D2.** Fraccionamiento



**Fot D3.** Molienda



**Fot D4.** Jugo de piña

## EXTRACCIÓN DE BROMELINA



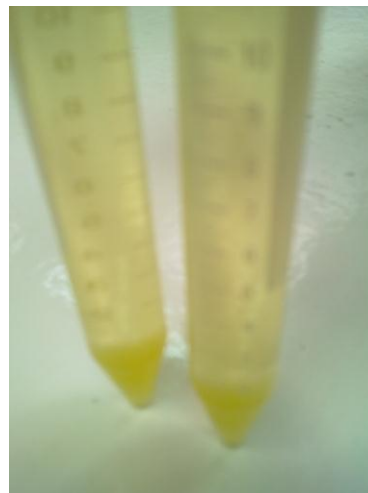
**Fot D5.** Jugo de piña con NaCl y etanol



**Fot D6.** Congelación



**Fot D7.** Centrifugación



**Fot D8.** Precipitados

## CONCENTRACIÓN DE LA BROMELINA



**Fot D9.** Precipitados en NaCl y etanol



**Fot D10.** Pesado



**Fot D11.** Secado



**Fot D12.** Concentrados de bromelina en NaCl y etanol

## PREPARACIÓN DE LA LECHE DESHIDRATADA



**Fot D13.** Pesado de la leche



**Fot D14.** Mezcla en agua a 40°C



**Fot D15.** Densidad de la leche



## VISCOSIDAD DE LA LECHE CON LOS CONCENTRADOS PROTEÍNICOS QUE CONTIENEN BROMELINA



**Fot D16.** Adición del  
concentrado proteínico en la  
leche



**Fot D17.** Muestras en  
congelación



**Fot D18.** Medición de la  
viscosidad de la leche

## OBTENCIÓN DEL JUGO DE CARNE



**Fot D19.** Molienda de la carne



**Fot D20.** Obtención del jugo



**Fot D21.** Filtración

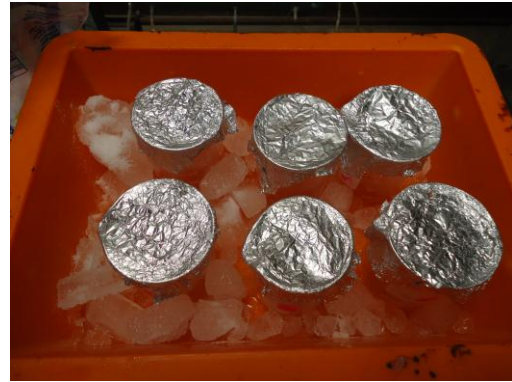


**Fot D22.** Densidad del jugo de carne

## VISCOSIDAD DEL JUGO DE CARNE CON LOS CONCENTRADOS PROTEÍNICOS QUE CONTIENEN BROMELINA



**Fot D23.** Adición del  
concentrado proteínico en el  
jugo de carne



**Fot D24.** Muestras en  
congelación



**Fot D25.** Medición de la  
viscosidad del jugo de carne