

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE BROMELINA A PARTIR DE LOS
DESPERDICIOS DE LAS PLANTAS EMPACADORAS
DE PIÑA.

266

CARLOS MARIANO OROPEZA SALIN

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS: TDSII
ASG: [REDACTED]
FECHA: 1975
PROC: M-25B



QUIMICA

Jurado asignado originalmente:

Presidente: Natalia Salcedo Olavarrieta
Vocal: Ninfa Guerrero Fernandez
Secretario: Rubén Berra García Coss
Primer Suplente: Angela Sotelo López
Segundo Suplente: Guillermo Rendón Padilla

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica, División de Estudios
Superiores, Facultad de Química.

Sustentante:

Carlos Mariano Oropeza Salín

Asesor del tema:

Ing. Rubén Berra García Coss

INDICE

	Pag.
I.- OBJETIVO	4
II.- GENERALIDADES	4
III.- ANTECEDENTES	17
IV.- MATERIALES Y METODOS	18
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	22
VI.- CONCLUSIONES	26
VII.- RESUMEN	27
BIBLIOGRAFIA	29

I.- OBJETIVO

Por lo general las enzimas proteolíticas que se usan en la industria mexicana son importadas de diferentes países, significando esto para México una fuga importante de divisas (Tabla I). México cuenta con los recursos naturales necesarios para la obtención de enzimas proteolíticas, no obstante, en la actualidad su explotación es mínima.

El objeto de este trabajo es el estudio de la obtención de la enzima proteolítica bromelina a nivel industrial a partir de los desperdicios de las plantas empacadoras de piña.

II.- GENERALIDADES

Las enzimas proteolíticas se han usado desde hace siglos en los campos de la industria y la medicina, así como en la preparación de alimentos. Sin embargo sólo en años recientes su uso ha sido incrementado debido a la obtención de nuevas preparaciones enzimáticas, así como al conocimiento de nuevos usos que se les pueden dar a estas enzimas.

Las enzimas proteolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en plantas como en microorganismos y animales. De origen animal las proteasas más usadas son renina, pepsina, erepsina y pancreatina; de origen vegetal se obtienen principalmente papaína, bromelina y ficina. También se usan

TABLA I

IMPORTACION DE ENZIMAS PROTEOLITICAS (1).

	1 9 7 0		1 9 7 1		1 9 7 2		1 9 7 3	
	Kg	\$	Kg	\$	Kg	\$	Kg	\$
Bromelina	665	1,077,698	528	569,276	838	1,154,522	955	1,793,755
Papaína	25,597	2,055,240	21,281	2,266,588	20,972	2,618,574	34,139	4,475,801
Mezcla cruda de tripsina, ribonucleasa y quimotripsina.	795	3,028,886	555	2,469,969	35	137,339	202	754,029
Mezcla cruda de tripsina y quimotripsina.	6	117,276	-	-	50	221,850	9	167,120
Tripsina	117	1,844,765	122	1,435,035	167	1,244,286	89	235,674
Quimotripsina	33	973,862	50	862,113	51	713,270	22	656,557
Pepsina	605	265,422	1,261	578,078	1,017	622,658	653	228,125
Extracto de - cuajo	13,586	2,240,360	22,443	2,621,404	16,098	3,209,433	11,037	3,640,641
Proteasas	21,086	2,529,788	2,510	331,208	1,081	199,409	22,029	1,037,530
Total	72,965	15,378,158	62,050	12,126,194	49,422	11,643,542	82,391	15,902,831

proteasas de origen vegetal y fungal.

La renina (2) es probablemente la proteasa que se usa y produce en mayor escala, siguiéndole en importancia la papaína. Aunque la ficina es una enzima muy activa, sus preparados presentan frecuentemente olor fuerte y su producción es menor.

La producción de bromelina también es baja, pero puede incrementarse y sustituir parcialmente el uso de la papaína.

Los primeros usos que tuvieron las enzimas proteolíticas fueron aplicaciones empíricas, es decir, su aplicación era indirecta, mediante el uso de materiales que las contenían, pero sin tener conocimiento de la presencia de las enzimas, ni de su relación con el efecto deseado.

Con el paso de los años se descubrieron las enzimas y se les pudo relacionar directamente con el efecto proteolítico antes atribuido al material crudo donde se les encuentra. Chittenden (3) a fines del siglo XIX pudo aislar enzimas proteolíticas del jugo de la piña.

Con el conocimiento de la existencia de las enzimas proteolíticas y de sus fuentes de obtención, se inició el desarrollo de preparaciones enzimáticas con gran actividad, estandarizadas, solubles y de olor aceptable.

Estos preparados enzimáticos y las técnicas desarro-

lladas para su aplicación han sustituido casi totalmente a los materiales y métodos usados tradicionalmente.

A continuación se ilustra con algunos ejemplos la aplicación tradicional de las enzimas proteolíticas y la diferencia de métodos usados tanto en el pasado como en el presente.

APLICACIONES TRADICIONALES

a) CURTIDO DE PIELES (2).- En el proceso de curtido se acostumbraba introducir la piel en un baño preparado con estiercol. El estiercol contiene bacterias productoras de enzimas proteolíticas, las cuales al actuar sobre la piel incrementan su permeabilidad y la hacen más suave. Actualmente se acostumbra el uso de enzimas proteolíticas estandarizadas, lo cual permite controlar las condiciones del proceso y evitar olores desagradables en la piel.

b) ABLANDAMIENTO DE CARNES (2).- Si una canal de venado es colgada durante una semana, se permite la acción de sus propias enzimas proteolíticas, las catepsinas. Estas están presentes en cada célula y actúan sobre la carne suavizándola. Se dejan transcurrir más días y se desarrollan hongos en la canal, los cuales también producen enzimas proteolíticas y éstas producen un grado mayor de ablandamiento, el cual es deseado por los gourmets.

Sin embargo durante el tiempo que está colgada la ca-

nal hay pérdida de agua, significando esto pérdida de peso, lo cual no es deseable. Esto se evita si se aplica a la carne una solución de enzima proteolítica (4), lo cual se puede hacer inyectando la solución al animal antes del sacrificio o sumergiendo las piezas de carne en la solución después de haber sido atravesadas de lado a lado con púas, para permitir el contacto entre la solución y el interior de la pieza.

c) USOS MEDICINALES (2).- En algunos países tropicales sus habitantes han usado jugo o latex de las plantas para combatir parasitosis producidas por nematelmintos, así como para la curación de heridas supurantes.

NUEVAS APLICACIONES

Además de las aplicaciones tradicionales, las enzimas proteolíticas tienen muchas otras aplicaciones que han sido desarrolladas recientemente. Algunos ejemplos son los siguientes:

a) INDUSTRIA DE LA PINTURA (5).- Las enzimas proteolíticas se usan para mejorar la estabilidad de emulsificantes proteicos usados en pinturas elaboradas a base de latex.

b) INDUSTRIA DE PRODUCTOS DE HNEVO (2).- En la producción de clara de hnevo deshidratada, ésta, antes de ser secada por aspersion, se trata con enzimas proteolíticas para reducir su viscosidad. También se

usan para digerir parcialmente a la yema de huevo para que al congelarle no gelifique.

c) INDUSTRIA DE LA LECHE (2).- Las enzimas proteolíticas se usan para estabilizar la leche contra oxidación.

d) INDUSTRIA CERVEZERA (2).- La mayor cantidad de las enzimas proteolíticas provenientes de las plantas se usa en la elaboración de cerveza. Estas enzimas son añadidas al final del proceso de elaboración, para hidrolizar ciertos complejos tanino-proteína. Tales complejos si se dejan en la cerveza se hacen insolubles y producen turbidez cuando se enfría. La enzima ideal para esta operación lo es aquella que al hidrolizar la proteína no lo hace totalmente, sino sólo hasta polipéptidos. Los polipéptidos son necesarios para la retención de espuma y para el sabor.

e) CAMPO DE LA MEDICINA (2).- En este campo las enzimas proteolíticas se usan ampliamente. Pueden reducir inflamaciones pues cambian la permeabilidad de los capilares. También se ha usado específicamente tripsina para disolver coágulos al ser inyectada en el flujo sanguíneo. Bromelina y papaína han sido utilizadas para solubilizar mucosidades producidas al tomar impresiones con rayos X en el útero. Las enzimas proteolíticas sirven además para aliviar dolores ordinarios de la menstruación, aplicandolas como solución irrigadora en la vagina.

Como antihelmíntico (6), se usa bromelina. Esta enzima ha sido considerada como capaz de degradar tejido cicatrizado, lo cual sustituiría la acostumbrada intervención quirúrgica en cirugía plástica. Sin embargo en 1969 Korlof y colaboradores (7) reportaron que no hay efecto de la enzima en lesiones en tejido blando.

Hasta aquí se ha hablado en forma general de las enzimas proteolíticas. En adelante se tratará en particular de la bromelina, cuya obtención industrial es el motivo de este trabajo.

LA BROMELINA

La bromelina es una enzima proteolítica endopeptidasa (8) que ha sido estudiada desde fines del siglo pasado. Los primeros en hacerlo fueron Marcano y Chittenden, quienes encontraron actividad proteolítica en el jugo de la piña.

Chittenden (3) en 1894 pudo precipitar dos enzimas del jugo de piña, con cloruro de sodio. Una de ellas insoluble en agua y capaz de cuajar la leche y otra soluble y con poder proteolítico.

PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LA BROMELINA

a) PESO MOLECULAR

Murachi y colaboradores (9) reportaron en 1964 que la mayoría de la actividad proteolítica puede ser purificada como un componente de peso molecular a-

proximado de 33,000, determinado por ultracentrifugación. Ota y colaboradores (10) en 1964, reportaron peso molecular de la bromelina de 33,000, obtenido mediante análisis cuantitativo del grupo N-terminal.

Feinstein y Whitaker (11), también en 1964, reportaron los pesos moleculares de cinco componentes de la bromelina (ver más adelante incisos j y k), los encontraron en un rango de 18,000 a 22,000, que difieren del peso molecular de 33,000 reportado por Murachi y por Ota, debido a la pérdida de un 45% de la molécula por autólisis. Este fragmento residual tuvo la misma composición de aminoácidos reportada por Ota y colaboradores.

b) SITIO ACTIVO (12)

La bromelina como otras proteasas entre ellas papaína y ficina dependen del grupo tiol de un residuo de cisteína para su actividad enzimática. Husain y Lowe en 1970 estudiaron la secuencia de aminoácidos alrededor de cisteína e histidina en el sitio activo en bromelina, papaína y ficina, encontrandolas muy semejantes (Cuadro I).

c) GRUPO PROSTETICO

A diferencia de papaína y ficina, la bromelina es una glucoproteína que contiene un grupo prostético carbohidratado. Yasuda, Takahashi y Murachi (13) en 1970, reportaron su estructura y composición (Cua-

CUADRO I SECUENCIAS DE AMINOACIDOS ALREDEDOR DE LOS RESIDUOS DE CISTEINA
E HISTIDINA EN EL SITIO ACTIVO EN BROMELINA, PAPAINA Y FICINA (12).

Asn-Gln-Asp-Pro-Cis-Gli-Ala-Cis*Trp	BROMELINA
Pro-Val-Lis-Asn-Gln-Gli-Ser-Cis-Gli-Ser-Cis*Trp	PAPAINA
Pro-Ile-Arg-Gln-Gln-Gli-Gln-Cis-Gli-Ser-Cis*Trp	FICINA
His*Ala-Val-Tre-Ala-Ile-Gli-Tir	BROMELINA
Val-Gli-Pro-Cis-Gli-Asn-Lis-Val-Asp-His*Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gli-Tir	PAPAINA
Tre-Gli-Pro-Cis-Gli-Tre-Ser-Leu-Asp-His*Ala-Val-Ala-Leu	FICINA

dro II).

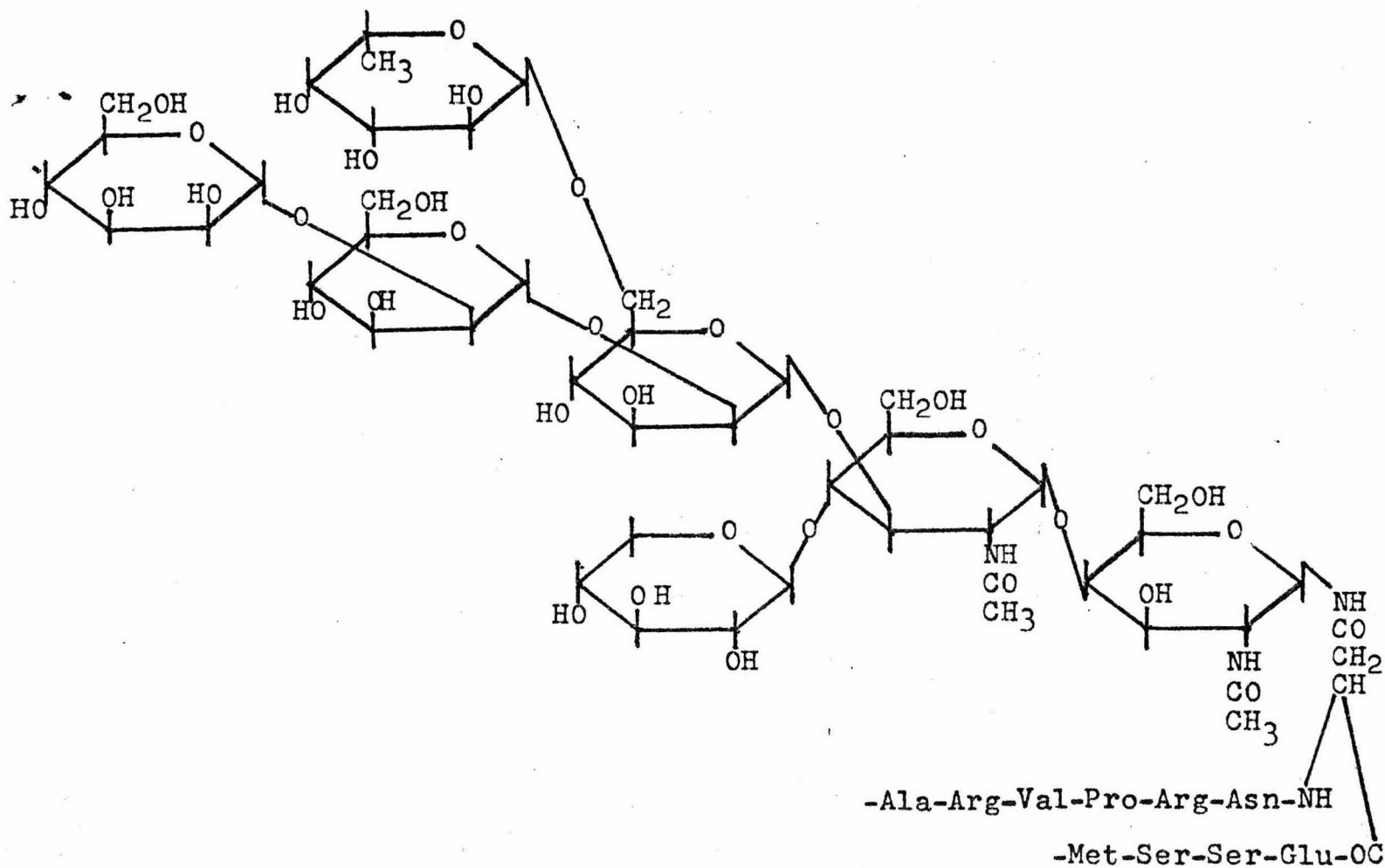
d) ESTABILIDAD

Caldwell (14) en 1905 reportó la presencia de dos enzimas proteolíticas en el jugo de la piña. Una de ellas activa en medio alcalino, algo más resistente a agentes tóxicos y en cantidad dos veces mayor que la otra, la cual presentó actividad en medio ácido y que se destruía por calentamiento a 65°C en solución salina. En 1931 Eckert y Kruess (2) estudiando diversas formas de preservar la bromelina, reportaron su destrucción a las temperaturas comunes de pasteurización ($75^{\circ}\text{--}80^{\circ}\text{C}$). Sin embargo Balls, Thompson y Kies (15) en 1941 reportaron que la enzima es estable cuando el calentamiento no es mayor de 60°C . La estabilidad de la enzima a altas temperaturas varía según el pH en que se encuentre. Si la enzima es calentada cuando el medio es alcalino y hay desnaturalización, ésta es parcialmente reversible. Esto se debe a que la enzima es estable, aunque inerte, a pH alcalino e inestable pero activa cuando el medio es ácido.

Respecto a la variación de la actividad relacionada con el tiempo, Balls, Thompson y Kies encontraron que prácticamente no hay variación después de conservar una solución de enzima en refrigeración durante diez días. En 1968 F. Monsalvas (16) reportó que el jugo de piña puede conservarse en refrigeración sin perder actividad proteolítica indefinidamente si es adicionado con benzoato al 0.2%.

CUADRO II

ESTRUCTURA DEL GRUPO PROSTETICO DE BROMELINA (13)



e) AUTODIGESTION (14)

En preparaciones frescas de enzima no se encuentran compuestos tales como peptonas, leucina y tirosina. Al obtener preparaciones de la enzima, éstas contienen proteínas asociadas a la bromelina. Si se deja una preparación en solución a 25° - 26° C, después de algunas horas comienzan a aparecer peptonas, leucina y tirosina, debido a la digestión de las proteínas asociadas. Cuando éstas han sido digeridas, se inicia la autodigestión, la cual es más lenta. Por lo tanto una preparación de bromelina en solución, mientras más pura esté, más rápido se presentará la autodigestión cuando las condiciones la favorezcan.

f) INHIBIDORES

Puesto que la bromelina necesita del grupo tiol de la cisteína para su actividad y dicho grupo puede ser oxidado a cistina, perdiendo con ello su actividad, es necesario el uso de activadores, los cuales deberán reducir el grupo oxidado a su forma tiol.

TABLA II		ACTIVADORES PARA BROMELINA
Activador	<u>actividad con activador</u> actividad sin activador	
0.04 M Cisteína	1.6 / 1.12	
0.1-0.5 M NaCN	1.1 / 1.06	
0.1 M H ₂ S	1.06	

Greenberg y Winnick (17) en 1940 reportaron el uso de cisteína, cianuro de sodio y ácido sulfhídrico como activadores para bromelina (Tabla II).

h) ACTIVIDAD SINTETICA (18)

Además de hidrolizar uniones peptídicas, las enzimas proteolíticas también pueden sintetizarlas.

En la bromelina también se ha encontrado actividad sintética. Al igual que la papaína, puede catalizar la unión peptídica entre carbobenzoglicina y anilina.

i) CUAJADO DE LA LECHE

Las enzimas que cuajan la leche se encuentran prácticamente en todas las variedades de tejidos. Y parece ser una regla general que todas las enzimas proteolíticas poseen esta habilidad (19) (20). Este es el caso de la bromelina, su poder para cuajar la leche fué reportado por Caldwell (14) en 1905. También se ha reportado la misma actividad para papaína y ficina.

j) PATRON ELECTROFORETICO

El patrón electroforético de la bromelina de tallo es complejo. Las preparaciones comerciales contienen de ocho a cinco picos. La mayor parte de la actividad proteolítica está asociada a tres picos con punto isoeléctrico entre 9.2 y 11. La actividad restante está asociada a un pico con punto isoeléctrico igual a 5. Este patrón fué obtenido por Heinicke y Gortner (2)

en 1957, quienes designaron a las cuatro diferentes enzimas de acuerdo con el valor de pH en el cual presentaban actividad proteolítica óptima. Bromelina pH 4.5 y bromelina pH 5.5 hidrolizan gelatina y albumina de huevo. Las otras dos enzimas, bromelina pH 7 y bromelina pH 8.5 hidrolizan caseína, hemoglobina desnaturalizada y lactalbumina.

k) FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION CROMATOGRÁFICA

Los primeros trabajos para fraccionar y purificar la bromelina de tallo fueron los realizados por Murachi y Neurath (21) quienes en 1960 separaron dos enzimas proteolíticas por cromatografía en columna de Duolite CSN 1.

En 1962 El-Gharbawi y Whitaker (22) por cromatografía en columna de Bio Rex 70 pH=6.1, separaron la bromelina en cinco fracciones diferentes. También usando electroforesis de zona con Sephadex G-75 separaron cinco componentes. Las propiedades de estos cinco componentes presentaron similitud en su absorbancia a 280 nm, en su actividad específica hacia caseína a pH=7 y en su habilidad para cuajar la leche. Pero presentaron diferente comportamiento en cromatografía en Bio Rex 70, en electroforesis en Sephadex G-75 y acetato de celulosa, en su absorbancia a 260 y 292, en su estabilidad al calor, en su inhibición por iodo-acetamida, en su actividad sobre α benzoyl-L-argininamida y en su actividad sobre caseína a diferentes valores de pH.

Minami, Doi y Hata (23) en 1971 por medio de la técnica de enfoque isoeléctrico, lograron fraccionar la bromelina de tallo en dos componentes. Uno de ellos es una proteína básica con punto isoeléctrico de 9.45 y en mayor cantidad que la otra con punto isoeléctrico de 4.7.

FUENTE DE OBTENCION DE LA BROMELINA

La bromelina se halla presente en la planta de la piña (Ananas comosus). La piña pertenece a la familia de las Bromeliáceas (24), todas las plantas de esta familia contienen proteasas y la piña es la única comestible. Se cree que la piña proviene originalmente del sur de Brasil y Paraguay, y se extendió ampliamente en las regiones tropicales de América antes de que fuera descubierta por los españoles (25). La piña es una planta herbácea cuya vida es de 4 a 6 años. Los terrenos más convenientes para su cultivo son los que están al nivel del mar (24). Hay muchas variedades de piña pero las más importantes son Pernambuco y Cayena. La primera es más rica en enzima y la segunda es la más ampliamente cultivada (15).

La planta tarda en fructificar de 10 a 18 meses, y desde que aparece el fruto, éste tarda en desarrollarse cuatro meses (24).

LA BROMELINA EN LA PLANTA DE LA PIÑA

En la planta de la piña la mayor concentración de proteasa se encuentra en su tallo maduro en la par-

te inferior. En el mismo tallo, la parte central posee más enzima que la parte exterior o corteza (2).

Balls, Thompson y Kies (15) en 1941 reportaron un aumento de actividad proteolítica en el jugo del fruto, conforme éste va madurando, a diferencia de la papaína en la papaya, que decrece su actividad con respecto al tiempo.

En 1959 en México, Ahuja (26) trabajando con bromelina precipitada de jugo de piña de diferentes edades, reportó que durante el primer mes la actividad es alta, disminuyendo durante el segundo y el tercer mes, para aumentar nuevamente en el cuarto, que es el último mes de su período de maduración.

En 1965 Gortner y Singleton (27) estudiaron la relación entre la actividad proteolítica en pulpa y la edad del fruto. Encontraron que en los primeros días después de que aparece el fruto, no hay actividad, pero conforme el fruto se desarrolla la actividad va aumentando. Pero en las últimas dos semanas del período de maduración (la cual alcanza 120 días después de que aparece el fruto), la actividad disminuye. A estos últimos quince días se les denomina: "período final de maduración". Gortner y Singleton consideran que la caída en actividad en este período puede deberse a la transformación de la bromelina en otra proteína con diferente papel metabólico, como el de enzima productora de sabor.

III.- ANTECEDENTES

El objeto de este trabajo como se mencionó anteriormente, es el estudio de la obtención de la enzima proteolítica bromelina a partir de los desperdicios de las plantas empacadoras de piña. Antes de iniciar este estudio habían sido reportados otros trabajos concernientes con el tema, y los cuales, nos han servido como base.

En su artículo "Bromelin properties and commercial production" que apareció en 1941, Balls, Thompson y Kies (15) sugieren la posibilidad de obtener la bromelina a nivel industrial, a partir del jugo de piña de baja calidad, para poder competir con material proteolítico barato. El jugo de alto grado sería muy caro para este propósito. Por lo tanto es conveniente usar como materia prima desperdicio industrial. Consideran ellos, sin embargo, que la mayor desventaja sea tal vez la cantidad de enzima presente en el jugo, ya que es pequeña.

En 1959 J. Ahuja (26) sugirió las ventajas y posibilidades de utilizar el fruto que se desperdicia en las plantas empacadoras, por no llenar los requisitos de carácter técnico, al igual aquel que no tenga aceptación comercial.

Para aislar la enzima del jugo, que se obtiene por prensado del tejido del fruto, Balls y colaboradores propusieron la precipitación de la enzima con alcohol etílico o con sulfato de amonio, sin embargo de esta

forma el producto se obtiene bastante contaminado con el sulfato, lo cual no es conveniente debido a que sus principales usos son en la industria alimenticia. Otro inconveniente del sulfato de amonio es la cantidad necesaria para la precipitación de la enzima, ya que es alta y no haría costeable su uso en base a la poca cantidad de enzima presente en el jugo.

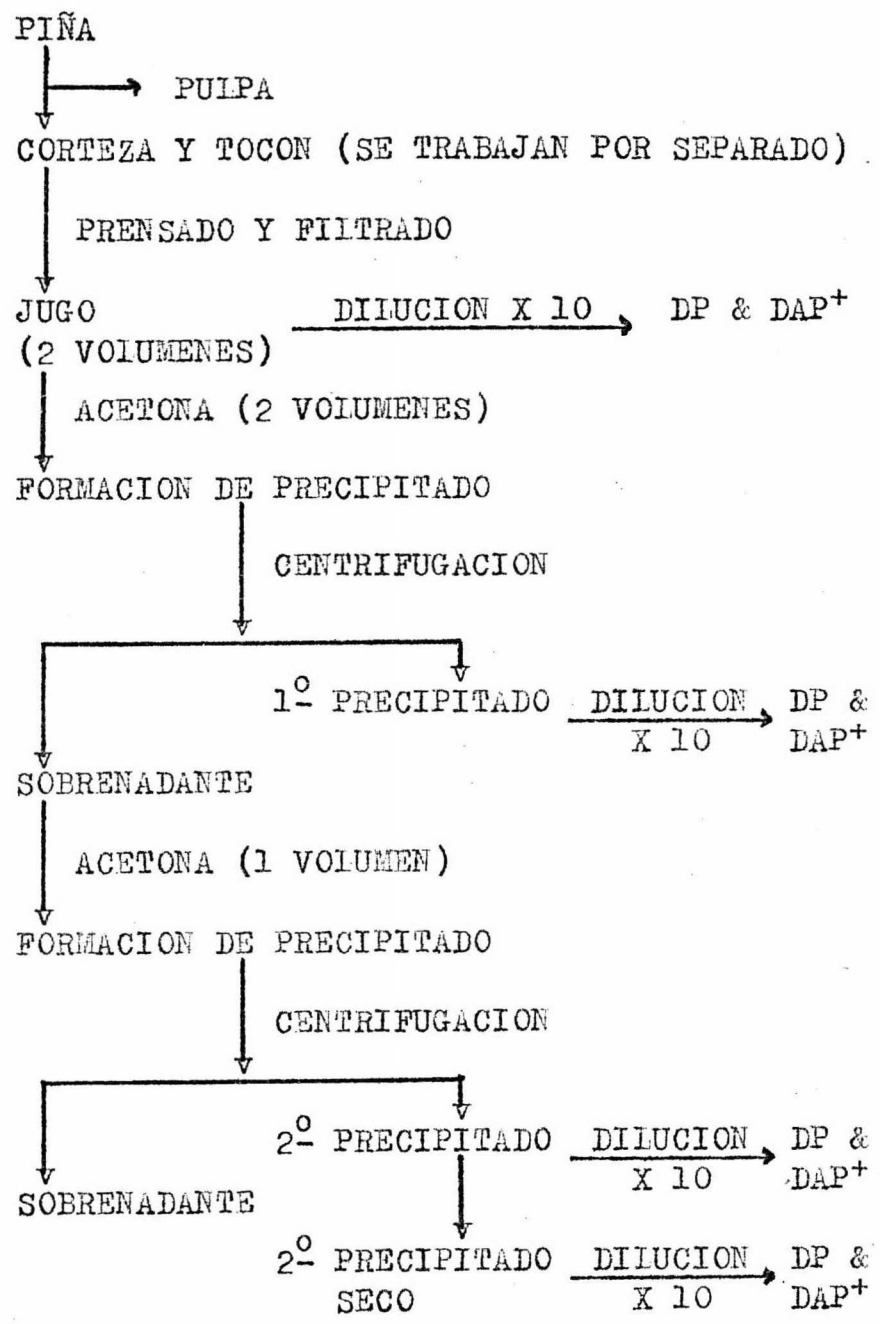
En 1957 Heinicke y Gortner (2) reportaron el uso de acetona como el precipitante más conveniente si se trata de obtener bromelina en grandes cantidades, es decir a nivel industrial. La precipitación la efectuaron agregando dos volúmenes de acetona a dos volúmenes de jugo, obtuvieron un precipitado que presentó baja actividad proteolítica y poca estabilidad. Este primer precipitado fué descartado. Entonces a la fase líquida se agregó un tercer volumen de acetona y precipitó la principal fracción enzimática. Se colectó por centrifugación y se secó. La acetona puede recuperarse por destilación del sobrenadante.

IV.- MATERIALES Y METODOS

OBTENCION DE LA ENZIMA

En la obtención industrial de bromelina a partir de la piña, el uso de material de alto grado tal como la pulpa del fruto o jugo de calidad para envasar, no es conveniente, ya que resultaría incosteable debido a la poca cantidad de enzima presente, por lo tanto es recomendable usar material de desperdicio. Para este

CUADRO III PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE BROMELINA



(+) Determinación de proteínas y determinación de actividad proteolítica.

trabajo seleccionamos como materia prima para la obtención de bromelina, el desperdicio de las plantas empacadoras de piña, que resulta del enlatado de la pulpa del fruto. Este desperdicio consiste en la cáscara o corteza y el tocón.

Este material es por supuesto barato y la cantidad de piña procesada al año es igual al 10% de la producción total en el país (Tablas III y IV).

Como no fué posible disponer de una cantidad apropiada de material de desperdicio proveniente de las compañías empacadoras, debido a que trabajan la piña por temporadas, se compraron piñas en el mercado con características semejantes, como peso y edad del fruto. Las piñas fueron de la variedad Cayena y provenientes del Estado de Veracruz. Los cortes que se hicieron a las piñas fueron similares a los realizados en la industria. Se utilizaron 30 piñas con peso cercano a 2000 g y el pH de los jugos se encontró en el rango de pH=3.6 y pH=4, que corresponde según los resultados de Ahuja (26), a frutos próximos a alcanzar su madurez. Se trabajó cada piña por separado.

OBTENCION DEL JUGO.- Se realizaron los cortes necesarios en las piñas para obtener la corteza y el tocón. A estos dos elementos se les extrajo el jugo por prensado (7 ton) en una prensa Carver para laboratorio, modelo C-12 (Fred S. Carver Inc., Menonee Falls, Wisc.). El jugo obtenido fué filtrado a través de gasa y se

TABLA III

PRODUCCION DE PIÑA EN LA REPUBLICA
MEXICANA EN 1971 Y 1972 (28).

AÑO	PRODUCCION (TONS)		
	CON FERTILIZANTE	SIN FERTILIZANTE	TOTAL
1971	261,207	26,975	288,182
1972	187,545	15,712	203,257

TABLA IV PIÑA PROCESADA EN LA
REPUBLICA MEXICANA (29).

AÑO	TONS
1970	37,681
1971	35,562
1972	31,186
1973	38,042

le determinó su valor de pH en un aparato pHmeter-300 Metrohm (Switzerland).

Es importante indicar que estas operaciones y las que se mencionen a continuación se efectuarón por se parado tanto para las muestras de jugo de corteza co mo para las correspondientes de tocón.

PRECIPITACION DE LA ENZIMA.- Para precipitar la enzima del jugo se usó el método descrito por Heinicke y Gortner (2) en 1957, este método se aplico de la siguiente forma:

A dos volúmenes de jugo fuerón añadidos dos volúmenes de acetona (calidad industrial), obteniendose así el primer precipitado, que presentó baja actividad proteolítica. Este precipitado se separó por cen trifugación a 2000 rpm por 10 minutos en una centrifuga MSE modelo LR-6. A la solución del sobrenadante se le agregó otro volúmen de acetona, resultando una mezcla final de dos volúmenes de jugo y tres volúmenes de acetona, obteniendose un segundo precipitado, que contiene la mayor parte de la enzima. Este preci pitado se separó también por centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos. Después de separado este segundo precipitado fué secado por liofilización en un equipo para liofilización Virtis modelo 1014 OBA.

Tanto a estos precipitados (primero, segundo y segun do seco) como al jugo entero, se les determinó contenido de proteínas y actividad proteolítica. Para

esto los precipitados fueron redissueltos en un volumen diez veces mayor que el volumen del jugo del cual provenían. El jugo también fué diluido diez veces.

DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas fué realizada de acuerdo al método de Lowry (30).

Reactivos:

a) Reactivo A, formado por 40 partes de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N; y una parte de tartrato de sodio y potasio al 2% y CuSO_4 al 1% (estas dos últimas soluciones mezcladas en volúmenes iguales).

b) Reactivo B, reactivo de Folin Ciocalteu (diluido a dos volúmenes con agua).

El método consiste en poner la muestra en un volumen de 0.5 ml en un tubo de ensaye, al que se agregan 5 ml de reactivo A. Se dejan transcurrir 10 minutos y se añaden 0.5 ml del reactivo B. Después de 30 minutos se determina la absorbancia de la mezcla reactiva a 715 nm en un Espectrofotómetro Zeiss modelo 45309.

Para obtener una curva estándar como referencia, se utilizó albumina bovina.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA

El método usado se basó en la digestión de caseína,

reportada por Northrop y Kunitz (31) y Kunitz (32), con el uso de activadores y quelantes reportado por Minami, Doi y Hata (23). El procedimiento fué el siguiente:

En un tubo de ensaye se pusieron 2.3 ml de caseína 0.6% en buffer fosfatos 0.05 M (pH=7), 0.1 ml de cisteína 0.25 M y 0.2 ml de EDTA 0.25 M. Tanto a esta mezcla como a la solución que contiene la enzima, a la cual se le quería determinar actividad proteolítica, fueron introducidos en un baño de temperatura controlada J. M. Ortiz a 37°C por separado, para que se equilibrara la temperatura, durante 5 minutos. Después de transcurrido este tiempo se agregaron 0.3 ml de la solución enzimática a la mezcla contenida en el tubo de ensaye y se permitió la reacción durante 20 minutos dentro del baño. Para parar la reacción se añadieron 4 ml de ácido tricloroacético al 5%. Después de 30 minutos de reposo, se filtró el contenido del tubo y se le determinó su absorbancia a 280 nm en un Espectrofotómetro Zeiss modelo 45309.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el laboratorio, así como la discusión correspondiente.

RENDIMIENTO DE TEJIDO Y JUGO

La proporción promedio de pulpa, corteza y tocón ob-

tenida por el método usado, así como los mililitros de jugo obtenidos por kilogramo de tejido en corteza y tocón, se presentan en la tabla V.

TABIA V

	PIÑA ENTERA	CORTEZA	TOCON	PULPA
gramos	2020	840	210	970
% en gramos	100	41	11	48
<u>(ml jugo)</u> <u>(Kg tejido)</u>	-	485	715	-

De acuerdo a la tabla V, se puede contar con un 50% del peso total de piña procesada anualmente, el cual es de más de 30,000 toneladas (Tabla IV). Esto significa que es posible contar con 15,000 toneladas de materia prima al año.

VALOR DE pH EN EL JUGO

En los jugos obtenidos los valores de pH se encontrarán en el rango de pH=3.5 y pH=4.

De acuerdo con los datos proporcionados por J. Ahuja (26) respecto a la relación del valor de pH del jugo con la edad del fruto, los valores que obtuvimos corresponden a frutos cuya edad fué de 3 a 4 meses y próximos a madurar.

CONTENIDO PROTEICO Y ACTIVIDAD PROTEOLITICA

En la tabla VI se presentan los resultados de contenido de proteínas y actividad proteolítica. Comparando éstos con la actividad proteolítica de bromelina comercial (Merck), medida con el mismo método.

A partir de los resultados que aparecen en la primera columna de la tabla VI y que corresponden a mg de proteína por 100 ml de jugo, y de los resultados en ml de jugo por Kg de tejido, de la tabla V, se calcularon los miligramos de proteína obtenidos, por kilogramo de tejido, tanto para corteza como para tocón, resultando de 273 mg/Kg en ambos casos. También para ambos casos la cantidad de proteínas corresponde al 50% en peso del precipitado.

En esta tabla se presentan también los resultados de actividad proteolítica del primer precipitado, que tanto para corteza como para tocón, fué el 15% de la actividad proteolítica del segundo precipitado, ya sea como actividad específica o como actividad proteolítica expresada como miligramos de caseína desdoblados por mililitro de jugo por minuto. Esto está de acuerdo con lo que reportaron Heincke y Gortner (2) en 1957. Ellos indicaron que el primer precipitado que se obtiene presenta baja actividad proteolítica. Debido a esto no es conveniente hacer una sola precipitación, ya que la actividad específica disminuiría, además de la inestabilidad de este primer precipitado.

Debido a que en el segundo precipitado se obtiene la mayor parte de la actividad enzimática, la actividad específica aumenta de 3.8 en jugo a 12.5 en el segundo precipitado en el caso de corteza y de 3,5 a 13.35 en el caso de tocón.

Cuando el segundo precipitado fué secado por liofilización, se obtuvo un polvo blanco de aspecto semejante a bromelina comercial, y la actividad específica disminuyó el 13% en ambos casos. La preparación enzimática seca puede conservarse en refrigeración indefinidamente, además de que facilita su manejo.

La actividad específica del segundo precipitado seco, en corteza y tocón, aunque disminuyó, fué sin embargo mucho mayor (casi el doble) que la obtenida con bromelina comercial, en las mismas condiciones de ensayo.

En la tabla VI-a se presentan los resultados de actividad específica en cada una de las piñas usadas.

También se determinó la actividad proteolítica en cinco muestras de segundo precipitado de jugo de corteza antes y después de diez días de almacenamiento en refrigeración. Las muestras no fueron secadas, sino que se redisolviéron y se almacenaron en solución. Los resultados se presentan en la tabla VII.

Como se puede observar, la actividad proteolítica, en estas condiciones, prácticamente no varió. Esto ya había sido reportado anteriormente por Balls, Thompson y Kies (15).

TABLA XVI ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y CONTENIDO DE PROTEINAS.

CORTEZA	PROTEINA mg/100 ml jugo	ACTIVIDAD PROTEOLITICA <u>mg Caseína desdoblada</u> ml/min	% DE ACTIVIDAD CON RESPECTO A JUGO	ACTIVIDAD ESPECIFICA <u>mg Caseína desdoblada</u> mg proteína / min
JUGO ENTERO	306	11.65	100	3.8
1er PRECIPITADO	49.6	1.23	10.6	2.48
2do PRECIPITADO	56.3	8.0	68	12.57
2do PRECIPITADO SECO	56.3	6.8	58	10.85
TOCON				
JUGO ENTERO	233	8.15	100	3.5
1er PRECIPITADO	39.4	0.925	11.3	2.35
2do PRECIPITADO	38.3	5.1	62.5	13.35
2do PRECIPITADO SECO	38.3	4.45	55	11.6
BROMELINA COMERCIAL				6.0

TABLA VI-a

ACTIVIDAD ESPECIFICA (EN CADA PIÑA).

mg Caseína desdobladaml/min

PIÑA	CORTEZA				TOCON			
	PRECIPITADOS 1°	2°	2°SECO	JUGO	PRECIPITADOS 1°	2°	2°SECO	JUGO
1	2.6	12.5	10.2	3.5	2.0	13.8	11.2	2.5
2	3.1	15.2	13.0	4.1	2.6	13.3	11.5	3.0
3	2.5	10.7	9.3	3.9	2.5	11.0	8.8	2.8
4	1.3	8.7	6.4	2.8	1.6	9.8	8.5	2.7
5	1.9	10.2	7.8	2.7	2.2	10.0	7.6	3.3
6	1.6	9.3	7.8	2.3	1.8	10.1	8.5	2.7
7	2.3	11.0	8.6	2.4	1.3	7.6	6.0	2.8
8	2.3	10.8	9.2	3.1	2.1	11.5	9.5	1.1
9	2.9	13.0	11.4	3.7	3.6	12.9	10.3	4.1
10	1.4	15.8	12.6	4.2	2.3	16.1	14.0	3.7
11	2.1	16.8	14.3	4.7	2.4	14.4	12.5	4.3
12	3.0	15.0	13.0	5.4	2.5	17.5	14.2	4.2
13	1.8	14.2	12.5	4.4	2.8	16.6	14.5	3.7
14	2.8	12.8	10.4	3.9	3.3	17.7	16.0	4.7
15	3.6	14.7	11.8	4.5	3.5	15.7	13.7	5.5
16	3.8	14.0	12.5	4.4	3.1	13.7	11.8	3.9
17	1.6	10.5	8.8	3.8	1.4	11.0	10.0	3.8
18	1.7	10.7	8.2	3.9	1.8	11.2	10.7	2.4
19	2.4	11.3	10.0	3.4	2.0	12.0	10.8	4.3
20	3.1	10.3	8.5	4.5	2.0	12.4	11.3	3.9
21	2.6	15.4	9.0	3.2	1.7	15.5	15.0	4.4
22	1.3	13.5	13.0	5.3	1.3	10.1	9.6	3.3
23	3.1	10.3	10.0	4.1	2.3	11.1	10.0	2.7
24	3.5	12.0	8.5	4.2	3.3	16.7	14.7	5.0
25	3.8	15.4	11.3	3.8	2.5	14.0	13.0	3.5
26	2.4	11.9	10.8	3.0	3.0	19.5	16.8	3.9
27	2.6	14.0	8.7	3.3	2.3	15.2	12.7	3.3
28	2.5	13.3	12.4	3.5	2.7	13.2	11.5	2.5
29	1.9	11.0	10.8	3.7	2.8	15.4	14.0	4.0
30	3.5	12.7	11.7	3.9	1.8	11.8	10.0	3.6

TABIA VII DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE BROMELINA EN SOLUCION AIMACENADA EN REFRIGERACION.

DIAS	ACTIVIDAD PROTEOLITICA <u>mg Caseína desdoblada</u> ml/min	%
0	9.0	100
10	8.8	97

VI.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar presentan un panorama bastante alentador desde los puntos de vista de disponibilidad de materia prima, rendimiento, calidad de la enzima (actividad específica) y su estabilidad.

A continuación se presentan algunas consideraciones económicas:

Tomando en cuenta que se obtienen 273 g de proteína por tonelada de tejido procesada, que corresponden a 540 g de precipitado total y que 5 g de extracto comercial para fines bioquímicos, con un contenido de 50% de proteínas, tienen un valor en el mercado de \$195.00 m.n., el valor del producto obtenido por tonelada, 540 g de precipitado, sería por consiguiente alrededor de \$20,000.00 m.n.

La cantidad de acetona utilizada durante el procesamiento de una tonelada de materia prima sería de 750 lts, con valor aproximado de \$6,000.00 m.n. (\$8.00 m.n./lt). A esto le agregamos el 30% del valor del producto por tonelada como costo de producción y obtenemos un costo total de fabricación de \$12,000.00 m.n. El costo de la materia prima considerando que actualmente se desperdicia, se propondría inicialmente de $\$ 5 / K$ (\$50.00/ton).

Por lo tanto, puede obtenerse el 66% de ganancia so-

lo del extracto enzimático. Existe también la posibilidad de vender el extracto proteico del primer precipitado, como también se podría aprovechar el bagazo obtenido del prensado de la materia prima, como alimento para ganado.

Como se mencionó anteriormente, éste es un estudio preliminar y los puntos que necesitan un estudio más a fondo son:

- a) Estudio económico de la planta procesadora.
- b) La posible sustitución de acetona como precipitante, por otro más económico.
- c) La obtención de subproductos.

VII.- RESUMEN

La compra de enzimas proteolíticas en nuestro país provoca una gran fuga de divisas. México es productor fuerte de piña (Tabla III), sin embargo parte de la producción se desperdicia o se procesa, obteniéndose de utilidad solo el 50% del peso total de la fruta. Debido a que el desperdicio industrial y agrícola causa problemas significantes en el área, este estudio presenta la posibilidad de utilizar este desperdicio como materia prima para la obtención de la enzima proteolítica bromelina. Los resultados obtenidos son alentadores, obteniéndose extractos baratos de gran actividad, superior a la

actividad del extracto comercial. Desde luego este es sólo un estudio preliminar.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anuario de Comercio Exterior (1970-71-72-73),
Secretaria de Industria y Comercio.
- 2.- Heincke, R. M. y Gortner, W. A.,
Economic Botany, 11, 225 (1957).
- 3.- Chittenden, R. H.,
J. Physiol., 15, 249-310 (1894).
- 4.- Mier, G. y Rhodes, V. S.,
Food Tech., 16, 111-113 (1962).
- 5.- Ronai, K. S. y Weisbert, S. M.,
Ind. & Eng. Chem., 46, 774-777 (1954).
- 6.- Berger, J. y Asenjo,
Science, 90, 299 (1939).
- 7.- Korlof, B., Ponten, B. y Ugland, O.,
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 3, 27-29 (1969).
- 8.- Whitaker, J.,
An Introduction to Enzymology.
Editado por el autor.
- 9.- Murachi, T., Yasui, M. y Yasuda, Y.,
Biochemistry, 3, 49 (1964).
- 10.- Ota, S., Moore, S. y Stein, W.H.
Biochemistry, 3, 180 (1964).
- 11.- Feinstein, G. y Whitaker, J.,
Biochemistry, 3, 1050 (1964).
- 12.- Husain, S. S. y Lowe, G.,
Biochem. J., 117, 341-6 (Ap-1970).

- 13.- Yasuda, Y., Takahashi, N. y Murachi, T.,
Biochemistry, 9(1), 25-32 (1970).
- 14.- Caldwell, J. S.,
Botanical Gazette, 39, 409 (1905).
- 15.- Balls, A. K., Thompson, R. R. y Kies, M. W.,
Ind. & Ing. Chem., 33, 950 (1941).
- 16.- Monsalvas, F.,
Philippine J. Anim. Ind., 24 (1/4), 11-27 (1963).
- 17.- Greenberg, D. M. y Winnick, T.,
J. Biol. Chem., 135, 761-787 (1940).
- 18.- Bergman, M. y Conrat, F.,
J. Biol. Chem., 119, 707 (1937).
- 19.- Balls, A. K. y Hoover, S. R.,
J. Biol. Chem., 121, 737 (1937).
- 20.- Whitaker, J. R.,
Food Tech., 13-2, 86-88 (1959).
- 21.- Murachi, T. y Neurath, H.,
J. Biol. Chem., 235, 99 (1960).
- 22.- El-Gharbawi, M. y Whitaker, J. R.,
Biochemistry, 2, 476 (1963).
- 23.- Minami, Y., Doi, E. y Hata, T.,
Agr. Biol. Chem., 35, 1419-1430 (1971).
- 24.- Sanchez, G. C.,
El Cultivo de la Piña.
Ed. Agr. Trucco, México, D. F. (1947).
- 25.- Popenoe, J.
Econ. Bot., 16, 138-139 (1962).

- 26.- Ahuja, J. C.,
Tesis Profesional, ENCB, IPN (1959).
- 27.- Gortner, W. A. y Singleton, V. L.,
J. Food Sci., 30, 24-29 (1965).
- 28.- Expedientes del Depto., de Planeación Agrícola,
Cosechas Frutales (1971-1972),
Dirección General de Agricultura, SIC.
- 29.- Revista de Estadística (1970-71-72-73),
Dirección General de Estadística, SIC.
- 30.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y
Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 31.- Northrop, J. H. y Kunitz, M.,
J. Gen. Physiol., 16, 313 (1932).
- 32.- Kunitz, M.,
J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947).