

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

F. E. S. "ZARAGOZA"

"OBTENCIÓN DE BROMELINA A
PARTIR DE LOS DESECHOS DE LA
PIÑA, DESARROLLANDO PARA ESTO
UN PROCESO CRIOGÉNICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

"INGENIERO QUÍMICO"

P R E S E N T A:

MA. MAGDALENA FLORES SÁNCHEZ

ASESOR: I. Q. EDUARDO VÁZQUEZ ZAMORA

MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260116



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES *ZARAGOZA*
DIRECCION DE LA CARRERA
DE INGENIERIA QUIMICA
OF/082/023/97

C. María Magdalena Flores Sánchez
P r e s e n t e .

En respuesta a su solicitud de asignación de jurado para el Examen Profesional, le comunico que la Jefatura a mi cargo ha propuesto la siguiente designación:

Presidente: I.B.Q. Lorenzo Rojas Hernández


Vocal: I.Q. Eduardo Vázquez Zamora

Secretario: I.Q. Alejandro Rogel Ramírez

Suplente: Quím. Cecilia Sugina Matsubara Oda

Suplente: Quím. Miki Otani Imura

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., 5 de Agosto 1997



Ing. Magín Enrique Juárez Villar
Director de la Carrera

Irm

Este trabajo esta dedicado a todas aquellas personas quienes de alguna u otra forma contribuyeron a la realización del mismo; hablo de técnicos, laboratoristas y amigos a quienes no menciono para no olvidar omitir algún nombre, pero ustedes saben quienes son.

*A mi madre con amor, por haberme dado la vida y haberme
guiado en los primeros peldaños de mi formación.*

*A mis hermanas con cariño, por su confianza y constantes
palabras de aliento.*

*A mi esposo con infinito amor y como muestra de mi
agradecimiento por brindarme siempre su apoyo,
paciencia y comprensión.*

*A mis hijos, Laurita y Omar, por ser mi aliciente de
superación y por haberme cedido parte del tiempo que
debí haber dedicado a su cuidado.*

*A mis sindicales y profesores, con admiración y
respeto, por haberme transmitido sus conocimientos
y por sus valiosos comentarios para el mejoramiento
de este escrito.*

*Muy especialmente al I.Q. Rhuando Vázquez Zamora por haber
aceptado asesorarme y por su invaluable amistad.*

*A Dios, por haberme permitido llegar a una de las metas
fijadas en mi vida.*

A todos, gracias.

I N D I C E

RESUMEN	1
OBJETIVO.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	5

PARTE 1: GENERALIDADES

CAPÍTULO 1. LAS ENZIMAS.....	6
1.1. DEFINICIÓN.....	8
1.2. NATURALEZA.....	8
1.3. ESPECIFICIDAD.....	9
1.4. NOMENCLATURA.....	9
1.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	10
1.6. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.....	11
1.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	18
1.8. ENZIMAS COMO CATALIZADORES.....	18
1.9. APLICACIONES PRÁCTICAS DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES.....	19
1.9.1. APLICACIONES INDUSTRIALES.....	20
1.9.1.1. INDUSTRIA DE LA PINTURA.....	20
1.9.1.2. INDUSTRIA DE PRODUCTOS DE HUEVO.....	20
1.9.1.3. INDUSTRIA DE LA LECHE.....	20
1.9.1.4. INDUSTRIA CERVECERA.....	21
1.9.1.5. OTRAS INDUSTRIAS.....	21
1.9.2. APLICACIONES MÉDICAS.....	23
1.9.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.....	24
1.10. ENZIMAS INMOVILIZADAS.....	30
1.11. FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS.....	31
1.11.1. ORIGEN VEGETAL.....	31
1.11.2. ORIGEN ANIMAL.....	33
1.11.3. ORIGEN MICROBIANO.....	33
1.12. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS	34
1.13. LEGISLACIÓN EN EL EMPLEO DE LAS ENZIMAS.....	36
1.14. CONTROL Y SEGURIDAD EN LAS ENZIMAS.....	41

CAPÍTULO 2. LA CRIOGENIA.....	42
2.1. DEFINICIÓN.....	42
2.2. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS CRIOGÉNICOS.....	42
2.2.1. NITRÓGENO.....	42
2.2.2. DIÓXIDO DE CARBONO.....	43
2.2.3. OXÍGENO.....	45
2.2.4. ANHÍDRIDO SULFUROSO.....	46
2.2.5. PROTOXIDO DE NITRÓGENO.....	46
2.2.6. ARGÓN LÍQUIDO.....	47
2.2.7. NEÓN LÍQUIDO.....	47
2.2.8. OTROS FLUIDOS CRIOGÉNICOS NO DERIVADOS DEL AIRE.....	48
2.3. VENTAJAS DE LA CONGELACIÓN CRIOGÉNICA CON NITRÓGENO LÍQUIDO RESPECTO A LA CONGELACIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO LÍQUIDO.....	52
2.4. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DEL NITRÓGENO LÍQUIDO.....	54
2.5. CONDICIONES ESPECIALES DE ALMACENAMIENTO DE NITRÓGENO LÍQUIDO PARA CONGELACIÓN.....	55
2.6. MANEJO DE LÍQUIDOS CRIOGÉNICOS.....	56
2.6.1. SEGURIDAD EN LA UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO LÍQUIDO Y GASEOSO.....	56
2.6.2. SEGURIDAD EN LA UTILIZACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO.....	59
CAPÍTULO 3. CARACTERÍSTICAS DE LA PIÑA.....	62
3.1. ASPECTOS GENERALES DEL FRUTO.....	62
3.2. APROVECHAMIENTO DE LOS DESECHOS DE LA PIÑA..	64
3.2.1. JARABE DE AZÚCAR.....	64
3.2.2. SALVADO DE PIÑA.....	65
3.2.3. ÁCIDO CÍTRICO.....	65
3.2.4. BROMELINA.....	65
2.2.5. VINAGRE.....	66

PARTE 2: ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1. LAS PROTEASAS.....	70
CAPÍTULO 2. LA BROMELINA.....	74
CAPÍTULO 3. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA QUE SE BUSCA " BROMELINA ".....	79
3.1. CARACTERÍSTICAS.....	79
3.2. PROPIEDADES.....	79
3.2.1. PESO MOLECULAR.....	79
3.2.2. SITIO ACTIVO.....	80
3.2.3. GRUPO PROSTÉTICO.....	80
3.2.4. ESTABILIDAD.....	80
3.2.5. AUTODIGESTIÓN.....	81
3.2.6. ACTIVIDAD SINTÉTICA.....	82
3.2.7. INHIBIDORES.....	82

PARTE 3: MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

CAPÍTULO 1. MÉTODOS TRADICIONALES DE PRODUCCIÓN DE BROMELINA...	84
1.1. MEDIANTE EL MICROORGANISMO <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ...	84
1.1.1. EQUIPO UTILIZADO.....	84
1.1.1.1. FERMENTADOR.....	84
1.1.1.2. INCUBADORA CON AGITACIÓN.....	85
1.1.2. MEDIO DE MANTENIMIENTO	85
1.1.3. MEDIO DE CRECIMIENTO.....	85
1.1.4. MEDIOS DE INDUCCIÓN.....	86
1.1.5. INDUCCIÓN DE LA PROTEASA BROMELINA....	87
1.1.6. OBTENCIÓN DE LA PROTEASA BROMELINA....	87
1.2. MEDIANTE LA PRECIPITACIÓN DEL JUGO DE LA PIÑA.....	88
1.2.1. OBTENCIÓN DE BROMELINA DEL FRUTO FRESCO DE LA PIÑA.....	88
CAPÍTULO 2. FASE EXPERIMENTAL.....	89
2.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO.....	89
2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA....	91
2.3. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE BROMELINA EN EL LABORATORIO....	92
CAPÍTULO 3. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PROCESO CRIOGÉNICO A NIVEL PLANTA PILOTO.....	94
3.1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE BROMELINA.....	94
3.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.....	95
3.3. DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO.....	98
3.4. LISTADO DE EQUIPO.....	99
3.4.1. RECIPIENTE DE ALMACENAMIENTO ATMOSFÉRICO.....	99
3.4.2. ALIMENTADOR.....	100
3.4.3. BANDA TRANSPORTADORA.....	101
3.4.4. MOLINO DE MARTILLOS.....	102
3.4.5. TANQUE DE ALIMENTACIÓN.....	103
3.4.6. TANQUES CON AGITACIÓN.....	104
3.4.7. FILTRO PRENSA.....	105
3.4.8. CENTRÍFUGA.....	106
3.4.9. BOMBAS CENTRÍFUGAS.....	107

PARTE 4: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1.	APROVECHAMIENTO DEL FRUTO DE LA PIÑA.....	108
4.2.	CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	109
4.3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	115

	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	116
--	-------------------------------------	-----

	BIBLIOGRAFÍA.....	118
--	-------------------	-----

RESUMEN

Este trabajo plantea una alternativa para darle un uso más provechoso a todo aquel desperdicio proveniente de la industrialización de la piña, el cual corresponde a por lo menos el 40 % del fruto⁽¹⁾; y cuya finalidad es desarrollar una modificación a los procesos que se han escrito con anterioridad por parte de diversos autores⁽³²⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾ para en un futuro, hacer posible la producción a nivel industrial de la enzima vegetal *bromelina*. Para ello, se creó una nueva metodología en donde los factores principales para desarrollarla, fueron la pulverización y el empleo de nitrógeno líquido; dicho fluido criogénico permitió trabajar en un rango de temperatura comprendido entre -45°C y -160°C . También se usó etanol como medio de extracción y ácido pirogálico como agente precipitante. El proceso consistió en congelar los desechos de la piña (cáscara y tocón) a una temperatura de aproximadamente -160°C inmediatamente se pulverizó y se extrajo la enzima con etanol enfriado a -90°C , se precipitó la enzima con pirogalol para finalmente liberarla nuevamente con etanol.

Los resultados obtenidos son alentadores, pues la enzima obtenida de esa forma representa una gran cantidad y alta actividad; aunque también debe mencionarse que trae consigo ciertas impurezas las cuales no fueron identificadas experimentalmente. A partir de la experimentación a nivel laboratorio, se sugiere desarrollar la metodología a nivel planta piloto, considerando los factores que influyen para llevar el proceso de un nivel a otro, y en cuya brecha los resultados pueden variar.

OBJETIVO

Con el fin de obtener los máximos rendimientos en la obtención de la enzima vegetal **bromelina** (aproximadamente el 50 % en relación a la cantidad obtenida por el método tradicional que parte del jugo fresco de la piña), desarrollar un proceso a partir de los desechos de la industrialización de la piña, empleando bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

La industria conservera en general y las empacadoras de piña en particular han presentado siempre el problema de que la materia prima principal deja un alto porcentaje de residuos (especialmente cáscara) que en ocasiones son destinados a la producción de alcohol y vinagre; y en algunos casos, se utiliza como alimento para ganado, esto si es que no se desperdicia totalmente. Por ejemplo, en el proceso del enlatado de la piña se desechan grandes cantidades de residuos. En estos quedan comprendidos las cáscaras, los corazones fibrosos, las partes obtenidas de la limpieza de los cilindros de piña, los residuos de los extractores de jugo, y las coronas. Con el despuntado de la fruta no solamente se separa la parte no utilizable, sino que se corta cierta cantidad de pulpa adicional, lo cual disminuye el rendimiento de la pulpa aprovechable en una proporción del 1 al 1.5 por ciento. Las cáscaras, puntas, corazones y los trozos obtenidos de la limpieza de los cilindros representan aproximadamente el 40 por ciento del peso de la piña industrializada⁽⁷⁾.

El fruto de la piña y sus subproductos siempre han sido objeto de estudio y se han obtenido nuevos enfoques respecto a su aprovechamiento; tal es el caso de la *bromelina*, una enzima de origen vegetal que se halla presente en la planta de la piña (*Ananas comosus*). Según estudios realizados, la mayor concentración de la proteasa se encuentra en su tallo maduro en la parte inferior; y en el mismo tallo es en la parte central donde se encuentra la mayor cantidad de bromelina, más que en la parte exterior o corteza⁽¹⁹⁾.

A pesar de que hace algún tiempo se sugirió la posibilidad de obtener *bromelina* a nivel industrial a partir del fruto que se desperdicia en las emparadoras, así como la cáscara y tocón de los mismos, y encontrándose que la calidad de los extractos enzimáticos era aceptablemente buena, se encontró también que el método de obtención no era atractivo, dado que la cantidad obtenida era muy baja⁽³²⁾.

Basando todos los estudios en los antecedentes que se tenían al respecto y que describían a la *bromelina* como una enzima proteolítica capaz de competir favorablemente con la papaína, dado que sus características son muy similares y sus aplicaciones pueden ser las mismas (con la ventaja de que la *bromelina* puede obtenerse de diferentes partes de la planta de la piña sin dañar el valor comercial del fruto); se ha planeado desarrollar un proceso criogénico de obtención, el cual permita aprovechar al máximo toda la materia prima considerando la cantidad y calidad de la enzima.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha comprendido mejor la importancia de la ciencia y tecnología. En México, la falta de tecnologías adecuadas y su correcta aplicación por los productores industriales y distribuidores, provoca que un cierto porcentaje de los productos alimenticios se pierdan por descomposición microbiológica, química y física, lo cual repercute en pérdidas económicas que frenan el progreso del país. Se debe enfocar no solo a los aspectos de producción, distribución y conservación, sino también a la búsqueda de desarrollo o adaptación de tecnologías para encontrar la forma de aprovechar al máximo los recursos naturales; y así mismo, rescatar los desechos y subproductos que deja la industrialización de alimentos, evitando las mermas o pérdidas.

En este trabajo, lo que se pretende es que a partir de una necesidad como lo es, en este caso, el uso de enzimas vegetales, se desarrolle un proceso, en el cual sabiendo de las ventajas que implica el empleo de bajas temperaturas (-45 a -190°C), permita utilizar los desperdicios de la industrialización de la pifa para su aprovechamiento en la elaboración de la enzima vegetal *bromelina* y producirla industrialmente en el país, dejando de importarla como hasta ahora se ha hecho; y así aprovechar al máximo los recursos naturales y abundantes con los que cuenta el país.

PARTE 1

GENERALIDADES

CAPÍTULO 1. LAS ENZIMAS

Uno de los principales campos de investigación con respecto a la fermentación es el enzimático. Las enzimas se pueden producir por fermentación y sirven para digerir muchos de los desperdicios que contribuyen a la contaminación.

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de la biotecnología, la atención se ha enfocado a los avances de los aspectos genéticos y técnicos de la fermentación. Sin embargo, los biotecnólogos consideran que las técnicas de extracción y purificación de proteínas es una parte inseparable del proceso biotecnológico global. A medida que se ha avanzado en el uso de enzimas inmovilizadas, gran parte de los mecanismos de la cinética enzimática clásica han tenido que readaptarse, ello ante las exigencias particulares de la formación de productos en cada proceso.

Las enzimas se compran y se venden en función de su actividad más que de su peso. No es necesario usar una enzima muy purificada o modificada, solo cuando lo exija un proceso particular, ya que el trabajar con estas enzimas resulta muy costoso. Por otra parte, la presencia de inhibidores podría dificultar la predicción del efecto de la enzima, especialmente en su cinética; es aquí donde se decide si el proceso puede llevarse a gran escala o no. La gran especificidad de la acción de las enzimas y las condiciones tan moderadas en las cuales funcionan, les confiere una decidida ventaja sobre los catalizadores químicos ordinario (por ello, en numerosos sectores se ha desarrollado considerablemente el uso de preparaciones enzimáticas). Por otra parte, su alta inestabilidad cuando están en solución, son un obstáculo en su recuperación después de haber sido utilizadas. En la práctica, la mayor parte de las operaciones industriales se realiza en forma discontinua, en lotes, con la renovación de la enzima en cada ciclo.

Algunas de las aplicaciones de las enzimas se encuentran en bioquímica clínica, industria alimentaria, industria química, control biológico de la contaminación, etc. A este tipo de sustancias se les conoce como materias primas clave, dado que su uso minimiza el costo económico de un proceso dado, donde el uso reiterado de estos procedimientos origina una parte de la demanda industrial global de enzimas.

Las enzimas no solo tienen la propiedad de acelerar reacciones bioquímicas, sino que también tienen la virtud de efectuar la catálisis selectiva de una reacción con preferencia a otras posibles reacciones que podrían producirse entre las mismas sustancias.

En sistemas biológicos constituyen la base de las reacciones complejas y variadas que caracterizan a los fenómenos vitales. Las funciones del metabolismo interno y de la vida de relación (locomoción, reproducción, etc.), se rigen por la actividad de innumerables enzimas responsables de que las reacciones se lleven a cabo en condiciones favorables para el individuo, sin liberaciones bruscas de energía, a temperaturas fijas, en un pH determinado, a una concentración salina, etc., particularmente constantes.

Los sistemas enzimáticos, en general están formados por la enzima propiamente dicha (apoenzima), el sustrato o los sustratos, un grupo prostético (coenzima) y sustancias activadoras. La estructura formada por la apoenzima y la coenzima se denomina haloenzima; con cierta frecuencia se reconocen sistemas enzimáticos que no tienen grupo prostético o activadores reconocidos.

1.1. DEFINICIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica que intervienen en todas las reacciones metabólicas energéticamente posibles, que ellas aceleran por activación específica y permiten alcanzar rápidamente el estado de equilibrio de la reacción sin modificarlo; por ello, son clave en la biotecnología y bioindustria. Son ellas quienes en la ingeniería microbiológica, catalizan las reacciones metabólicas y aseguran su regulación. De igual forma impulsan la ingeniería genética para realizar las modificaciones del equipamiento enzimáticos de ciertos microorganismos con vista a hacerlos aptos para la biosíntesis de metabolitos interesantes.

Las enzimas cuya acción ocasiona la desintegración de un enlace de carbono a carbono en el sustrato, y con lo cual originan la desintegración de su esqueleto de carbono, se llaman *desmolosas*.

Las sustancias cuya transformación química es acelerada por influjo de una enzima, se llaman *sustratos*.

1.2. NATURALEZA

Todas ellas son macromoléculas que corresponden a la clase de las proteínas globulares. Algunas son haloproteínas constituidas únicamente por un encadenamiento de ácidos aminados; otras son heteroproteínas, que poseen una parte no proteica, el cofactor, necesario para la actividad catalítica y asociado más o menos fuertemente a la proteína

1.3. ESPECIFICIDAD

La mejor descripción que se conoce de la especificidad enzimática, es la de Emil Fischer, quién comparó el sustrato y la enzima a la cerradura y la llave. Tal analogía es particularmente notable si se considera la especificidad estereoquímica de las enzimas. Una enzima tiene la propiedad de distinguir entre la estructura de dos moléculas cuando una es la "imagen en el espejo" de la otra. Esto indica no solo una estructura compleja molecular de la propia enzima, sino también que su actividad es consecuencia de alguna de esas complejidades estructurales⁽⁴⁸⁾.

1.4. NOMENCLATURA

Las enzimas conocidas más antiguas, conservan nombres arbitrarios asignados por sus descubridores. Pepsina, tripsina y diastasas (amilasas) son términos antiguos que han subsistido. En francés, la voz "diastasa" adquirió la connotación de enzima. Fueron generalmente aceptados los nombres ingleses y alemanes terminados en *in* (en español *ina*). Después se acordó dar a las enzimas el nombre del sustrato con el sufijo *asa*, método de nomenclatura que ha sido bastante satisfactorio y que actualmente se usa; así, una enzima que actúa sobre las proteínas se denota *proteasa*⁽⁴⁸⁾.

Existen muchas excepciones a esta práctica y, por lo tanto, no puede considerarse una regla general. Algunas enzimas se denominan de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Debido al rápido desarrollo de la química de las enzimas, existe una gran confusión terminológica. Hay otros casos en los cuales a un tipo único de enzima se le han dado diversos nombres.

En 1961, la Unión Internacional de Bioquímica adoptó el sistema de clasificación y nomenclatura propuesto por su comisión de enzimas que constituye con respecto a los sistemas anteriores un punto de vista más uniforme, preciso y descriptivo.

El sistema se basa en la reacción química catalizada que es la propiedad específica que caracteriza a cada enzima, las cuales se agrupan en clases, porque catalizan procesos semejantes y en subclases que especifican con mayor exactitud la reacción particular considerada.

1.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La Comisión sobre enzimas ha definido una unidad internacional de actividad enzimática, denominada *katal*, cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo bajo las condiciones experimentales estándar. Esta es una unidad de valor elevado; por ello se utilizan más corrientemente submúltiplos de ella: *microkatal* (μkat), *nanokatal* (nkat) y *picokatal* (pkat), que valen respectivamente 10^{-6} , 10^{-9} y 10^{-12} katal (kat)⁽²⁵⁾.

Las enzimas pueden presentarse bajo la forma pura, o bajo la forma de preparaciones enzimáticas más o menos purificadas. Con frecuencia es interesante determinar la actividad enzimática de una cantidad unitaria de preparación enzimática no purificada. Se refiere entonces la actividad, sea a 1 kilogramo de proteína, sea a una molécula gramo, así se define una actividad específica, katal por kilogramo de proteínas y una actividad molar, katal por mol de enzima.

1.6. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS

La clasificación más primitiva de enzimas fué la de organizadas y no organizadas, ésta clasificación se basaba en la observación de que algunas enzimas como la *peptasa*, actúan en ausencia de células, mientras que otras, como la *zimasa*, parece que solo llevan a cabo la fermentación alcohólica del azúcar en presencia de células vivas de levadura. En 1897 Buchner descubrió que un extracto exento de células libres de levadura provocaba la fermentación y quedó abandonada la clasificación primitiva.

Las enzimas se clasifican actualmente en *intracelulares*, cuando su actividad se lleva a efecto dentro de las células vivas, y *extracelulares*, cuando actúan en la parte exterior. En los animales superiores las enzimas de la digestión las secretan órganos especiales dispuestos en el tubo digestivo, y esta forma de digestión es extracelular; en las plantas se realiza la digestión en cualquier parte de las mismas y es fundamentalmente intracelular.

El creciente conocimiento de la actividad química de las enzimas ha permitido trazar un sistema de clasificación que distribuye todas las enzimas en cuatro categorías:

1) Enzimas que catalizan la separación de agua (*hidrolasas e hidrasas*).

2) Enzimas que catalizan la transferencia de electrones (*oxidasas y dehidrogenasas*).

3) Enzimas que transportan un radical de una molécula a otra (*transferasas*).

4) Enzimas que rompen o forman un enlace C-C sin transferencia de grupo (*desmolasas*).

En la Tabla 1, se presenta una lista de las enzimas que pertenecen a cada clasificación⁽¹⁾.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS

ENZIMAS HIDROLÍTICAS

<i>NOMBRE</i>	<i>SUSTRATO</i>	<i>PRODUCTOS FINALES</i>
I. ESTERASAS.	Esteres	Acidos + alcoholes
1.- Lipasas		
a) Lipasa ticínica	Grasas	Acidos grasos + glicerina
b) Lipasa pancreática	Grasas	Acidos grasos + glicerina
2.- Esterasa de la colina	Esteres de colina	Colina + ácido
3.- Colesterasa	Esteres de colesterol	Colesterol + ácidos grasos
4.- Clorofilasa	Clorofila	Clorofila + fitol
5.- Lecitinasa A	Lecitina	Lisolecitina + ácido graso
6.- Lecitinasa B	Lisolecitina y lecitina	Glicerofosfato + ácido graso
7.- Fosfatasa		
a) Monofosfatasa		
* Nucleotidasa	Nucleótidos	Nucleósidos + H_3PO_4
* Glicerofosfatasa	Glicerofosfatos	Glicerina + H_3PO_4
* Colina fosfatasa	Fosforilcolina	Colina + H_3PO_4
* Fitasa	Fitatos	Inositol + H_3PO_4
b) Hexosa difosfatasa	Fructosa-1,6-difosfato	Fructosa-6-fosfato + H_3PO_4
c) Adenosina trifosfatasa	Trifosfato de adenosina	Adenosina difosfato + H_3PO_4
d) Hexoquinasa (sintetizante)	ATP + glucosa o frutosa	ADP + Hexosa-6-fosfato
8.- Pectasa	Pectina	Ácido péctico + MeOH
9.- Tanasa	Tanino	Glucosa + ácido gálico
10.- Polinucleotidasas		
a) Ribonucleasa	Ácido nucleico de la levadura	Nucleótidos
b) Timonucleodepolimerasa	Ácidos timonucleicos	Nucleótidos

II. CARBOHIDRASAS.

A. Glucosidasas y sacaridasas

1.- β -fructofuranosidasas (Invertasa) (Sucrasa)	Sacarosa Rafinosa Gencianosa Estaquiosa	Fructosa + glucosa Fructuosa + melibiosa Fructosa + gencibiosa Fructosa + trisacárido
2.- α -Galactosidasas a) Melibiasa	Melibiosa	Glucosa + galactosa
3.- β -Galactosidasas a) Lactasa	Lactosa	Glucosa + galactosa
4.- Glucosidasas a) Maltasa b) Trehalasa c) Melecitasa	Maltosa Trehalosa Melecitosa	Glucosa Glucosa Glucosa + fructosa
5.- β -Glucosidasas (emulsina) a) Celobiasa b) Gencibiasa c) Amigdalasa d) Prunasina e) Salicinas	Celobiosa Gencibiosa Amigdalina Prunasina Salicina	Glucosa Glucosa Glucosa + peunasina Glucosa + d-mandelonitrilo Glucosa + saligenina
6.- Tioglucosidasas a) Singrasa (+ una sulfatasa)	Sinigrina	Glucosa + allisotiocianato + $KHSO_4$
7.- Nucleosidasas a) Purina nucleosidasas b) Pirimidina nucleosidasas	Nucleósidos purínicos Nucleósidos pirimidínicos	Pentosa + bases purínicas Pentosa + bases pirimidínicas

B. Polisacaridasas

1.- Amilasas a) α -Amilasa (licuante) b) β -Amilasa (sacarificante)	Almidón Almidón	Dextrinas Maltosa
2.- Inulasa	Inulina	Fructosa
3.- Celulasa	Celulosa	Celobiosa
4.- Liquenasa	Liquenina	Celobiosa
5.- Citasas a) Hexosanasas b) Pentosanasas	Hexosanas Pentosanas	Azúcares simples Azúcares simples
6.- Citinasa	Citina	1-Acetilglucosamina
7.- Protopectinasa	Pectinas nativas	Pectinas solubles
8.- Pectinasa (pectolasa)	Ácido péctico y pectinas solubles	Galactosa + ácido galacturónico

III. PROTEASAS.

1.- Pepsina	Proteínas nativas	Proteosas y peptonas
2.- Tripsina	Prot. nativas, proteosas, peptonas	Polipéptidos y aminoácidos
3.- Quimotripsina	Prot. nativas, proteosas, peptonas	Polipéptidos y aminoácidos
4.- Papaina	Proteínas nativas	Polipéptidos y aminoácidos
5.- Bromelina	Proteínas nativas	Polipéptidos y aminoácidos
6.- Ficina	Proteínas nativas	Polipéptidos
7.- Catepsina	Proteínas nativas	Proteosas y peptonas
8.- Renina	Caseína	Paracaseína

IV. PEPTIDASAS.

1.- Polipeptidasas	Polipéptidos	Péptidos y aminoácidos
a) Aminopolipeptidasas	Polipéptidos c/grupos amino libres	Péptidos y aminoácidos
b) Carboxipeptidasas	Polipéptidos c/grupos carboxilos libres	Péptidos y aminoácidos libres
2.- Dipeptidasas	Dipéptidos	Aminoácidos
3.- Prolipeptidasas	Péptidos de prolina	Prolina + péptidos
a) Prolinasa	Péptidos de prolina con el enlace prolina CO-NH péptido	Prolina + péptidos
b) Prolidasa	Péptidos de prolina con el enlace N-CO péptido	Prolina + péptidos
4.- Hipuricasa (histozima)	Acido hipúrico	Acido benzoico + glicina

V. AMIDASAS.

1.- Alantoinasa	Alantoína	Acido glioxílico + urea
2.- Asparaginasa	Asparagina	Acido aspártico + NH ₃
3.- Glutaminasa	Glutamina	Acido glutámico + NH ₃
4.- Histidasa	Histidina	Acido glutámico + ácido fórmico + NH ₃
5.- Ureasa	Urea	CO ₂ + NH ₃
6.- Benzamidasa (sintetizante)	Acido benzoico + NH ₃	Benzamida

VI. AMINASAS.

A. Nucleína desaminasas		
1.- Adenasa	Adenina	Hipoxantina + NH ₃
2.- Adenosina desaminasa	Adenosina	Hipoxantosina + NH ₃
3.- Desaminasa del ácido adenilico	Ácido adenilico	Ácido inosina-5-fosfórico + NH ₃
4.- Citidina desaminasa	Citidina	Uridina + NH ₃
5.- Guanasa	Guanina	Xantina + NH ₃
6.- Guanosina desaminasa	Guanosina	Xantosina + NH ₃
7.- Desaminasa de ácido guanilico	Ácido guanilico	Ácido xantilico + NH ₃
B. Otras aminasas		
1.- Arginasa	Arginina	Ornitina + urea
2.- Aspartasa	Ácido aspártico	Ácido fumárico + NH ₃
3.- Canavanasa	Canavanina	Canalina + urea

ENZIMAS OXIDANTES

I. OXIDASAS

A. Oxidasas férricas		
1.- Catalasa	Peróxido de hidrógeno	Agua + O ₂
2.- Peroxidasa	H ₂ O ₂ + sustrato aromático	H ₂ O + sustrato oxidado
3.- Citocromo oxidasa	Citocromo C reducido	Citocromo C oxidado
4.- Citocromo peroxidasa	H ₂ O ₂ + citocromo C reducido	H ₂ O + citocromo C oxidado
B. Oxidasas cúpricas		
1.- Tirosinasa (monofenol oxidasa)	Tirosina Catecol p-Cresol Fenol	Dihidroxifenilalanina o-Quinona Homocatecol Catecol
2.- Lacasa (polifenol oxidasa)	Hidroquinona Pirogalol	Quinona Purpurogalina
3.- Ácido ascórbico oxidasa	Ácido ascórbico	Ácido dehidroascórbico

II. DESHIDROGENASAS

A. Flavoproteínas (contienen riboflavina)		
1.- Fermento amarillo de Warburg y Christian	Coenzima 2 reducida	Coenzima 2 oxidada
2.- Diaforasa (Flavoproteína Straub)	Coenzima 1 o 2 reducida	Coenzima oxidada
3.- Xantina oxidasa (enzima Scharbinger)	Xantina hidratada	Ácido úrico
4.- D-aminoácido oxidasa	D-aminoácido	a-Cetoácido + NH ₃ + H ₂ O ₂
5.- L-aminoácido oxidasa	L-aminoácido	a-Cetoácido + NH ₃ + H ₂ O ₂
B. Deshidrogenasas que contienen coenzima 1 ó 2 (compuestos de nicotinamina)		
1.- Glucosa deshidrogenasa	Glucosa	Ácido glucónico
2.- Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa	Hexosa-6-fosfato	Ácido fosfohexónico
3.- a-Glicerofosfato deshidrogenasa número 1	a-Glicerofosfato	Ácido 3-fosfoglicérico
4.- Aldehído fosfoglicérico deshidrogenasa	Aldehído 3-fosfoglicérico + fosfato	Ácido 1,3-difosfoglicérico
5.- Láctico deshidrogenasa (animal)	Ácido láctico	Ácido pirúvico
6.- Isocítrico deshidrogenasa	Ácido isocítrico	Ácido a-cetoglutarico + CO ₂
7.- Máfico deshidrogenasa	Ácido málico	Ácido oxalacético
8.- Glutámico deshidrogenasa	Ácido glutámico	Ácido a-cetoglutarico + NH ₃
9.- Fosfogluconico deshidrogenasa	Ácido fosfogluconico	Ácido fosfo-a-cetohexónico
10.- Alcohol deshidrogenasa	Alcoholes	Aldehídos o acetonas
11.- B-hidroxibutírico deshidrogenasa	Ácido B-hidroxibutírico	Ácido acetoacético

C. Deshidrogenasas que transfieren electrones al citocromo

1.- Succínico deshidrogenasa	Ácido succínico	Ácido fumárico
2.- α -Glicerofosfato deshidrogenasa número 2	α -Glicerofosfato	Aldehído 3-fosfoglicérico
3.- Fórmico deshidrogenasa	Ácido fórmico	$\text{CO}_2 + 2\text{H}$
4.- Láctico deshidrogenasa (de la levadura)	Ácido láctico	Ácido pirúvico

III. OTRAS ENZIMAS OXIDANTES

1.- Monoamina oxidasa, tiramina oxidasa	Monoaminas	Aldehídos + $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$
2.- Diamina oxidasa (histaminasa)	Diaminas	Aldehídos + $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$
3.- Uricasa	Ácido úrico	Alantoína + CO_2
4.- Luciferasa	Luciferina	Luciferina oxidada + $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{luz}$
5.- Dopa oxidasa	L-3,4-Dihidroxi-fenilalanina	Melanina
6.- Glucosa oxidasa (de los hongos)	D-glucosa	Ácido glucónico + H_2O_2
7.- Lipoxidasa	Ácidos grasos no saturados	Peróxidos de ácidos grasos
8.- Ácidos grasos oxidasa	Ácidos grasos	Ácido acetoacético

DESMOLASAS

I. DESMOLASAS QUE REQUIEREN COCARBOXILASA (TIAMINA PIROFOSFATO)

1.- Carboxilasa	Ácido pirúvico	Acetaldehído + CO_2
2.- α -Cetoglutárico carboxilasa	Ácido α -cetoglutárico	Semialdehído succínico + CO_2
3.- Pirúvico cetolasa	Ácido pirúvico + acetaldehído	Acetoina
4.- Pirúvico deshidrogenasa	Ácido pirúvico	Ácido láctico + ácido acético + CO_2

II. DESMOLASAS QUE REQUIEREN FOSFATO DE PIRIDOXAL

A. Aminoácidos descarboxilasas

1.- Tirosina descarboxilasa	Tirosina	Tiramina + CO_2
2.- Lisina descarboxilasa	Lisina	Cadaverina + CO_2
3.- Arginina descarboxilasa	Arginina	Agmatina + CO_2
4.- Ornitina descarboxilasa	Ornitina	Putrescina + CO_2

B. Transaminasas (transferencia de grupos amino desde l-aminoácidos a un cetoácido)

1.- Glutámico-aspártico transaminasa	Ácido glutámico+ácido oxalacético	Ácido α -cetoglutárico + ác. ascórbico
2.- Glutámico alanina transaminasa	Ácido glutámico + ácido pirúvico	Ácido α -cetoglutárico alanina
3.- Cisteico-aspártico transaminasa	Ácido cisteico ácido oxalacético	Ácido aspártico + ác. B-sulfopirúvico

III. OTRAS DESMOLASAS

1.- Aldolasa	Fructosa-1,6-difosfato	Fosfato de dihidroxiacetona + aldehído fosfoglicérico
2.- Oxalacético	Acido oxalacético	Acido pirúvico + CO ₂
3.- Carboligasa	Acido pirúvico	Diacetilo + H ₂ O ₂
4.- Fosforilasa	Glucosa-1-fosfato	Almidón o glucógeno + H ₃ PO ₄

TRANSFERASAS

1.- Glioxalasa (requiere glutatión)	Glioxales	Hidroxiácidos
2.- Fumarasa	Acido fumárico	Acido l-málico
3.- Aconitasa	Acido cítrico	Acido l-isocítrico
4.- Aldehído mutasa (reacción de cannizzaro)	Aldehidos + H ₂ O	Acido + alcohol
5.- Acido láctico racemasa	Acido l- ó d-láctico	Acido dl-láctico
6.- Carbónico anhidrasa (contiene Zn)	H ₂ CO ₃ ó carbonatos	CO ₂ + H ₂ O

1.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Toda reacción enzimática necesita una fijación previa al sustrato(s) en la parte de la apoenzima que asegure la especificidad en cuanto a los sustratos. Después intervienen en la reacción propiamente dicha, que es catalizada por los elementos del sitio activo. Los mecanismos de reacción que intervienen pueden diferir según la naturaleza de la enzima.

El objeto de la cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento. Se propone en particular, establecer las relaciones que existen entre la velocidad de la reacción enzimática y las concentraciones del sustrato (S) y de la enzima (E), así como la influencia de algunos factores tales como: pH, Temperatura, Presencia de efectores y Eventualmente actividad del agua.

1.8. ENZIMAS COMO CATALIZADORES

Las reacciones catalizadas por enzimas conducen a cierto equilibrio aunque la reacción haya avanzado tanto hacia un lado que parezca una reacción completa. La reacción puede efectuarse en una u otra dirección, según las concentraciones manejadas. Si el producto de una reacción es excretado por la célula o ésta lo almacena en un compartimiento separado y así lo elimina del sistema, entonces la catálisis enzimática puede continuar en una dirección, bien sea la de descomposición o de síntesis.

1.9. APLICACIONES PRÁCTICAS DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES

Las enzimas se usaron como catalizadores de varias reacciones muchos siglos antes de que fuese conocida su naturaleza química exacta. La descripción de los agentes que producen la fermentación es anterior a nuestro conocimiento de la existencia de las enzimas en las células vivas. Procesos tales como la panificación, fermentación, la fabricación de cervezas, alcohol y vinos se conocen desde la antigüedad. Tales procesos se caracterizan usualmente por la velocidad de progreso baja de tal forma que no siempre han adoptado los avances tecnológicos y científicos en la misma extensión que otras industrias más dinámicas e innovadoras, tal como la industria química⁽³⁹⁾.

Las enzimas disponibles comercialmente pueden dividirse en tres clases, en función de estabilidad, precio y pureza. Las enzimas utilizadas a gran escala, como la glucosa isomerasa, son relativamente baratas y se suministran en grandes cantidades, aunque con frecuencia se utilizan en una forma relativamente impura para los estándares bioquímicos. Muchas enzimas ampliamente usadas en cantidades menores, particularmente en análisis clínicos, como la glucosa oxidasa y la colesterol oxidasa, son razonablemente puras, aunque su existencia es pequeña comparada con las enzimas industriales. También son más caras por los elevados costos de capital y producción asociadas con la necesidad de emplear una serie de técnicas de purificación de comparativamente baja capacidad y eficiencia. En tercer lugar, las enzimas especializadas, producidas para emplearse en la investigación, cuya pureza es variable, son de muy limitada disponibilidad, y usualmente extremadamente caras, lo cual hace imposible las pruebas a gran escala.

1.9.1. APLICACIONES INDUSTRIALES⁽³⁹⁾

Existen una gran variedad de enzimas disponibles comercialmente que difieren en la fuente biológica, actividad, pureza, formas físicas, y características tales como pH y temperatura óptima. En particular los fabricantes ofrecen un número considerable de amilasas y proteasas de calidad y actividad consistente.

La presencia de enzimas contaminantes en algunos casos pueden tener efectos benéficos.

1.9.1.1. INDUSTRIA DE LA PINTURA

Las enzimas proteolíticas se usan para mejorar la estabilidad de emulsificantes proteicos usados en pinturas elaboradas a base de látex.

1.9.1.2. INDUSTRIA DE PRODUCTOS DE HUEVO

En la producción de clara de huevo deshidratada, ésta, antes de secarse 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 congelarse no gelifique.

1.9.1.3. INDUSTRIA DE LA LECHE

Las enzimas proteolíticas se usan para estabilizar la leche de la oxidación. Una de las aplicaciones más antiguas de las enzimas, todavía en uso, es el empleo de la renina para fabricar queso. La enzima coagula la caseína de la leche y forma un paracaseinato cálcico insoluble. El preparado comercial de renina, rennet, se obtiene del cuajar de la ternera.

Las sustancias conservadoras, como el ácido bórico, ácido benzoico y grandes cantidades de cloruro sódico, se añaden a veces a los preparados enzimáticos para evitar su descomposición por los agentes bacterianos. La mayor parte de los millones de libras de queso que se producen actualmente en los Estados Unidos, se fabrican con rennet.

1.9.1.4. INDUSTRIA CERVECERA

La mayor cantidad de enzimas proteolíticas provenientes de plantas se usa en la elaboración de cerveza. Tales 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 aquella operación, es la que al hidrolizar la proteína no lo hace totalmente, sino solo hasta polipéptidos. Los polipéptidos son necesarios para la retención de espuma y para el sabor.

1.9.1.5. OTRAS INDUSTRIAS⁽³⁹⁾

La fabricación de zumos de fruta, que era una industria insignificante, ha adquirido en 20 años bastante consideración. Este auge se debe en parte a la habilidad de los productores para clarificar los zumos mediante el uso de enzimas. Se añade una mezcla de enzimas pécticas al jugo para hidrolizar las sustancias pécticas que enturbian al producto.

Todos los productos textiles contienen almidón u otro apresto que se aplica a los hilos de estambre para darles consistencia antes de tejerlos. Si los tejidos tienen que ser blanqueados, estampados o teñidos, hay que eliminar este apresto. El almidón puede eliminarse mediante hidrólisis por amilasas.

El método de hacer desaparecer el apresto mediante enzimas es más satisfactorio que el empleo de ácidos o álcalis, ya que estos atacan la celulosa y hacen menos resistentes los tejidos.

Se han preparado para este fin varios productos enzimáticos; estos preparados se hacen a partir de hongos, bacterias, malta u otros materiales biológicos.

En la manufactura del cuero hay dos fases que requieren la intervención de las enzimas. Las enzimas proteolíticas, que se preparan a base de páncreas o *Bacillus mesentericus*, se utilizan para hidrolizar las proteínas de los folículos pilosos, con lo cual se dejan en libertad los pelos, que pueden ser fácilmente eliminados. En una segunda fase, llamada rebajamiento, y como preparación para el curtido, se emplean productos proteolíticos similares.

Las enzimas se usan en el lavado en seco para quitar manchas de cola, gelatina o almidón. Las amilasas se emplean para preparar un almidón parcialmente hidrolizado como superficie de revestimiento del papel. La pepsina se usa para digerir la gelatina en el proceso de recuperación de la plata de los rollos fotográficos.

Los métodos que emplean microorganismos para producir sustancias químicas específicas son, en realidad, aplicaciones de enzimas. Estos procesos producen ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido gálico, 1-sorbose, acetona, butanol, alcohol etílico y otros productos.

1.9.2. APLICACIONES MÈDICAS⁽³⁹⁾

Trastornos digestivos que obedecen a una insuficiencia de enzimas han sido tratados desde hace años mediante una terapéutica sustitutiva. La pepsina, papaína, bromelina y las amilasas ayudan a la digestión en la boca y en el estómago. Las enzimas pancreáticas pueden suministrarse en el interior de cápsulas que se digieren en el estómago y, en cambio, son solubles en los jugos duodenales; por lo tanto, las enzimas no se liberan hasta que se hallan en el lugar donde deben ejercer su acción.

Las heridas engangrenadas y los procesos patológicos tales como úlceras por decúbito, forúnculos, ántrax y otros procesos supurados de la piel han sido tratados eficazmente con enzimas proteolíticas procedentes del páncreas del cerdo. Al parecer, las enzimas digieren la materia proteolítica que impide la curación de dichas úlceras.

Para el tratamiento de la inanición, en la India se ha usado un hidrolizado estéril de carne con papaína, colocado en una solución salina, que contienen además glucosa y vitaminas. Preparados semejantes de hidrolizados de proteínas se emplean cada vez más en casos de desnutrición, en ciertos tipos de trastornos postoperatorios y en ciertas enfermedades del tubo digestivo.

1.9.3. APLICACIONES ANALÍTICAS⁽³⁹⁾

En química analítica, y para la determinación del almidón, se usan mezclas de amilasa y maltasa llamadas *diastasas*. El método empleado calcula el aumento de azúcares reductores que aparecen como consecuencia de la hidrólisis enzimática del almidón. Este método es más específico que otro que mide el aumento de los azúcares reductores después de la hidrólisis por ácido.

La uricasa, enzima que convierte el ácido úrico en alantoína, se usa para determinar el ácido úrico en la sangre. La ureasa se emplea también para la determinación de la urea de la sangre y de la orina; el amoníaco que se forma se determina, bien por titulación, bien por el color que se forma en la solución de Nessler.

La sacarosa y la rafinosa se determinan en las mezclas de azúcares y en los productos azucarados por polarización antes y después de tratar la solución con sucrasa y melibiasa. La actividad de la fosfatasa de la leche se aprovecha como indicio de la efectividad de la pasteurización. La temperatura de inactivación y el tiempo necesario para destruir la actividad de la fosfatasa es tal que las bacterias patógenas más resistentes que se encuentran en la leche quedarían destruidas antes de que la enzima estuviese totalmente inactivada.

Además de las aplicaciones tradicionales antes mencionadas, las enzimas proteolíticas tienen muchas otras aplicaciones. Algunos ejemplos son los siguientes:

La Tabla 2, muestra una visión más clara acerca de las principales fuentes de obtención, así como de las aplicaciones que se les da a las enzimas usadas más comúnmente.

TABLA 2. PRINCIPALES FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS

ENZIMA (NOMBRE VULGAR)	FUENTE PRINCIPAL	PRINCIPALES APLICACIONES
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus niger oryzae</i> <i>Phenicis y wentii</i> <i>Nucor wiehei</i>	procesado de las frutas y verduras
Ciclodextrina glucosil transferasa	<i>Bacillus macerans</i> y <i>negaterium</i>	Formación de ciclodextrinas
Dextranasa	<i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Penicillium funiculosus</i> y <i>liacinum</i> <i>Fusarium</i> y <i>Flavobacterium</i> sps	Hidrólisis de los polisacáridos durante la producción de azúcares y en el procesado de los alimentos
Diacetilreductasa	<i>Aerobacter aerogenes</i>	Eliminación del diacetilo de la cerveza, que le da un aroma desagradable
Epoxisuccinato hidrolasa	<i>Nocardia tartaricus</i>	Formación de ácido tartárico
Bumarasa	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Producción de ácido málico
α -Galactosidasa	<i>Aspergillus niger</i> <i>Mortierella vinacea</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrólisis de oligosacáridos en el refinado del azúcar y en la producción de leche de soya
β -Galactosidasa (lactasa)	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus</i> sps <i>Aspergillus niger</i> y <i>oryzae</i> <i>Klebsiella fragilis</i> y <i>saccharomyces fragilis</i> y <i>lactis</i> , así como <i>Kluyveromyces lactis</i> y <i>fragilis</i>	Hidrólisis de la lactosa de la leche y otras operaciones del procesado de la leche, especialmente en la hidrólisis del suero y también en la elaboración de productos farmacéuticos
α -Glucanasa	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>circulans</i> <i>Aspergillus niger</i> y <i>oryzae</i> <i>penicillium emersonii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrólisis de polisacáridos en la elaboración de cerveza, extracción del zumo de frutas y otros productos a partir de plantas, por ejemplo aromas

Glucosa isomerasa	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces albus, olivaceus</i> <i>olivochromogenes</i> y <i>phaeo-chro-</i> <i>mogones</i> y <i>Arthobacter sps</i>	Isomerización de la glucosa en jarabes ricos en fructosa
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus missouriensis</i> <i>Penicillium glaucum, notatum</i> y <i>chrysogenum</i>	Antioxidante, por ejemplo en las frutas o en la conserva - ción de la albúmina y en el control del color en el vino, y la formación de ácido glucónico
Histidina amonio liasa H-a-hidroxilasa	<i>Rhizopus arrhizus</i> y otras fuentes microbianas	Producción de ácido urocánico II a-hidroxilación de progesterona dando lugar a la síntesis de cortisona, hidrocor-tisona, prednisona y prednisona
Inulinaasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Aspergillus</i> y <i>Candida sps</i>	Fabricación de edulcorantes
Invertasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> y <i>cerevisiae</i> y <i>Candida sps</i>	Producción de azúcar inver -- tida para repostería y como humectante, y en la elabora-ción de cerveza y en la manu-factura de sucedáneos de miel
Isonaltulosa sintetasa	<i>Erwinia rhaponticii</i> <i>Protaminobacter rubrum</i>	Formación de isomaltulosa
Lipasa/esterasa	<i>Aspergillus niger</i> y <i>oryzae</i> <i>Mucor javanicus, pusillus</i> <i>Rhizopus niveus, lypholitica</i> <i>Cylindracea</i> , ternera, cabrito cordero y páncreas de cerdo	Procesado de la lana y el cuero, modificación del aroma de la mantequilla y el queso, modificación de grasas y acei-tes, tratamiento de residuos
Lactoperoxidasa		Esterilización en frío de la leche
Lipoxigenasa	Harina de soya	Blanqueado de pan y oxidado de los aceites
Ácido málico descarboxilasa	<i>Leuconostoc oenos</i>	Producción de bebidas
Maraginasa	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminación del sabor amargo de los zumos de cítricos
Nisinasa	<i>Bacillus cereus</i>	Eliminación de la nisina (antibiótico) de la leche

Pectinasa/pectin esterasa	<i>Aspergillus niger</i> , <i>ochraceus</i> y <i>oryzae</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Trychiderma reesei</i> <i>Penicillium simplicissimum</i>	Extracción y clarificación de los zumos de frutas empleados en las bebidas no alcohólicas y en el vino. También en la extracción de especias y café
Penicilinas	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>cerus</i>	Eliminación de antibiótico de la leche
Penicilin amidasa (acilasa)	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Basidiomycetes</i> <i>Achromobacter sps</i>	Formación de ácido 6-amino-penicilínico mediante la síntesis de antibióticos semisintéticos
Fenilalanina amonio liasa	Levaduras	Formación de fenilalanina
Pitasa	<i>Aspergillus ficuum</i>	Eliminación del ác. fítico de los cereales
Proteasas de las plantas (papaina, ficina, bromelina)	<i>Papaya latex</i> <i>Ficus carica</i> <i>Bromus sps</i>	Producción de extractos de levaduras, cerveza resistente a la congelación, panadería, cuero, textiles, farmacéuticos y procesado de alimento para animales y hombres incluyendo el ablandamiento de carne
Proteasas animales (tripsina, quimotripsina, etc.)	Vacas, ovejas y cerdos	Industria farmacéutica y del cuero, procesado de alimentos especialmente la hidrólisis de proteínas como la hidrólisis de las proteínas del suero de queso, la síntesis de péptidos, etc.
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus niger</i>	Queso, carne, pescado, cereales, frutas, bebidas y panadería
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus flavus</i>	Procesado de los alimentos
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus oryzae</i> (proteasa ácida) (proteasa neutra)	Hidrólisis protéica, especialmente en el procesado de la carne y el pescado, en la industria de la cerveza y en panadería
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus niger</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor miehei</i> y <i>pusillus</i>	Manufactura del queso (coagulación de la leche)

Proteasa microbiana	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>y subtilis alkaline</i> <i>proteases</i>	Detergentes e industria del cuero, procesado de carne, pescado y derivados lácteos
Proteasas microbianas	<i>Bacillus subtilis</i> proteasa neutra	Producción de bebidas y pan
Proteasas microbianas	<i>Bacillus cereus</i>	Bebidas y pan
Pululanasa	<i>Klebsiella aerogenes</i> y <i>Bacillus sps</i>	Desramificación del almidón durante la formación de jarabes de glucosa y en la elaboración de cervezas
Coajo (quimosina)	Cuarto estómago de terneras lactantes o corderos	Coagulación de la leche duran te la manufactura del queso
Ribonucleasas	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Streptomyces griseus</i>	Formación de nucleótidos empleados como potenciadores del sabor y aromatizantes
Sulfhidril oxidasa	Suero de leche	Reducción del aroma y sabor a quemado de la leche
Tanasa	<i>Aspergillus oryzae</i> y <i>niger</i>	Procesado de bebidas tales como té y cerveza
Termolisina	<i>Bacillus proteolyticus</i>	Produc. del edulcorante aspar tama (ácido aspártico-éster metílico de fenilalanina)
Triptofasa		Formación de triptófano
Xilanasas	<i>Streptomyces sps</i> , <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> y <i>oryzae</i> y <i>Sporotri-</i> <i>chium dimorphosporium</i>	Procesado de cereales, té, café, cacao y chocolate

Enzimas utilizadas como mezclas complejas

Pectinasa, hemicelulasa y proteasas	<i>Aspergillus, Rhizopus y Trichoderma spp</i>	Procesado de frutas (extracción y clarificación)
Glucosa oxidasa y catalasa	<i>Aspergillus niger</i>	Empleo de antioxidantes como bebidas suaves y en la producción de ácido glucónico y mantequilla
Aamilasa, B-glucanasa, proteasa y celulasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Manufactura de cerveza
Mezclas de enzimas de Actinomyces, Achromobacter y Pseudomonas spp		Lisis de células
Proteasas, amilasas y lipasas	<i>Bacillus subtilis</i>	Detergentes
Enzimas y bacterias mezclados		Tratamiento de desechos (productos de limpieza)

1.10. ENZIMAS INMOVILIZADAS

La gran especificidad en la acción de las enzimas y las condiciones tan suaves en las cuales funcionan les confieren una decidida ventaja sobre los catalizadores químicos ordinarios. Por ello en numerosos sectores se han desarrollado considerablemente el uso de preparaciones enzimáticas. Pero el alto costo de los procedimientos de extracción y de purificación de las macromoléculas enzimáticas, su alta inestabilidad cuando están en solución, son un obstáculo a su recuperación después de haber sido utilizado este biocatalizador. En la práctica, la mayor parte de las operaciones industriales se realizan en forma discontinua, en lotes, con la renovación de la enzima al principio de cada ciclo.

La inmovilización sobre un soporte insoluble que a menudo se acompaña de un aumento en la estabilidad de la enzima, facilita el desarrollo de reactores en continuo, que funcionan durante periodos largos, sin necesidad de renovar el catalizador. Permiten también utilizar preparaciones más puras, cierto es que más caras, pero de especificidad en su acción más estrecha, lo que mejora la calidad de los productos que se obtienen.

Para los enzimólogos, la fijación sobre un soporte logra un modelo cercano a las condiciones de la célula viviente, en donde las enzimas se encuentran unidas a la membrana o a organelos intracelulares.

En la actualidad, se han desarrollado numerosos métodos de fijación para más de 100 enzimas, tanto en la etapa de laboratorio como en escala piloto y se ha abierto un campo de experimentación, para la inmovilización de células intactas, vivas o muertas.

1.11. FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS

Las enzimas que se utilizan en los procesos agroalimentarios son objeto de una reglamentación estricta, en lo que concierne a su producción, su pureza química y microbiológica. En su presentación comercial, sea bajo la forma más o menos diluida, fijada sobre soportes inertes, o diluyentes están igualmente reglamentadas.

Las enzimas y biocatalizadores utilizados en las diversas industrias (farmacéutica, textil, pieles, etc.), provienen de varias fuentes las cuales son:

- * Origen vegetal
- * Origen animal
- * Origen microbiano

1.11.1. ORIGEN VEGETAL

Las enzimas proteolíticas se encuentran profusamente distribuidas en muchos tipos de vegetales; los datos más importantes que existen en la literatura bioquímica se refieren principalmente a las proteasas del látex de diversas especies de plantas.

Las enzimas de origen vegetal y especialmente las proteasas son por orden de interés tecnológico descendente: la *papaina* proveniente de una planta ecuatorial y tropical (*Carica papaya*), la *bromelina*, extraída de la piña (*Ananas comosus Merr*) y la *ficina*, proveniente del higo (*Ficus carica*).

Las dos últimas proteasas intracelulares, tienen propiedades similares a las de la papaína, y por ello se denominan "*papainasas*". Tales enzimas actúan en un intervalo de pH amplio sobre las proteínas y péptidos sintéticos de estructura adecuada. La papaína y la ficina hidrolizan la enzima amida de la carbobenzoxi-L-metioninamida y la papaína hidroliza el ácido carbobencil-L-glutámico-a-amida y la benzoilglicinamida; los requerimientos específicos en lo que se refiere al esqueleto carbonado de estas enzimas semejan a los de la *tripsina* y *quimotripsina*. La papaína hidroliza no solo los enlaces amida y péptido, sino también los enlaces éster y los enlaces tioéster.

Para desarrollar la actividad proteolítica máxima frente a los sustratos sintéticos, la papaína, ficina y bromelina, deben activarse con diversas sustancias (glutación, cisteína, H_2S , HCN, etc.). Las preparaciones crudas de estas enzimas se acompañan siempre de cantidad suficiente del activador natural (probablemente glutación), necesario para que ejerzan cierta actividad proteolítica, la adición de una de las sustancias parece ser que reaccionan directamente con la papaína inactiva; sin embargo, no se ha podido aclarar el mecanismo de esta activación directa. Parece que los activadores actúan como agentes reductores para la conversión de los grupos disulfuro de la proteína enzimática inactiva en grupos sulfhidrilo que se cree que son esenciales para la actividad enzimática.

Algunas de las proteínas intracelulares de los tejidos animales también requieren la activación con compuestos sulfhidrilo; probablemente intervienen mecanismos análogos en la activación tanto de las enzimas animales como de las vegetales.

1.11.2. ORIGEN ANIMAL

Estas se extraen industrialmente de zonas específicas de algunos animales entre los que destacan por su importancia las siguientes:

* Deshidrogenasa-OH	Hígado de caballo
* Aldolasa	Músculo de conejo o rata
* α -Amilasa	Páncreas de cerdo
* Carboxilpeptidasa	Páncreas de bóvido
* Catalasa	Hígado de bóvido
* Fumarasa	Corazón de cerdo

La anterior descripción, corresponde a algunas enzimas cristalinas.

La *pepsina* se produce industrialmente a partir de la mucosa gástrica del cerdo donde se encuentra como precursor, el pepsinógeno.

La preparación industrial de la *pepsina* se puede hacer de acuerdo a varios métodos; en general se practica la autodigestión de mucosas gástricas raspadas y trituradas, en medio acuoso acidificado con ácido clorhídrico, en presencia de cloroformo.

1.11.3. ORIGEN MICROBIANO

Las principales ventajas de las enzimas en la fermentación con relación a las enzimas en la extracción son las siguientes:

* Una producción independiente de restricciones estacionales o geográficas.

* La posibilidad de utilización de materias primas de fácil adquisición.

* Los rendimientos en la producción se pueden aumentar en proporción importante al mejorar las capas microbianas y aplicar las óptimas condiciones de fermentación.

Por otro lado, las enzimas de origen microbiano presentan especificidades y propiedades diversas.

Estas ventajas predominan sobre los inconvenientes propios de la industria de la fermentación (fuertes inversiones, consumo de energía, riesgos de contaminación, etc.), en el transcurso de los últimos treinta años se han desarrollado un número importante de fermentaciones productoras de enzimas.

La fundamentación de la producción de enzimas microbianas exocelulares, es muy simple: un microorganismo se cultiva en un medio apropiado, a partir del cual se extrae la enzima (para las enzimas endocelulares es necesario un tratamiento previo de la biomasa). Los problemas radican en los detalles del proceso, ya que la producción industrial de enzimas supone un cierto número de etapas.

1.12. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS

Las enzimas a diferencia de la mayoría de cualquier otra sustancia, se caracterizan y se venden en función de su actividad más que de su peso, de tal forma que la estabilidad de las preparaciones enzimáticas durante su almacenamiento es de importancia capital. Las enzimas utilizadas en la industria, rara vez son cristalinas, químicamente puras o incluso solo proteínas. Estas impurezas no deben interferir en su actividad, aunque a veces pueden catalizar la formación de subproductos o pueden ser tóxicas. Una enzima útil comercialmente en el procesado de alimentos debe ser barata en relación al costo global del proceso, y activa en las condiciones físicas prevalecientes en las etapas del procesado tradicional.

Por eso, es preferible comprar enzimas diferentes para buscar una que sea activa en esas condiciones en vez de manipular un proceso o producto establecido a fin de acomodar una enzima potencialmente útil. La enzima debe ser estable, muchas enzimas utilizadas en la industria operan a temperaturas superiores a los 50°C, debe estar disponible en cantidades suficientes y debe ser segura. Como el costo de aprobación por las autoridades es muy elevado es mucho más fácil usar una enzima ya autorizada en la industria alimentaria que obtener un *status* legal para una nueva enzima.

El empleo de enzimas es ventajoso porque operan en condiciones de pH, temperatura, etc., compatibles con la retención de la estructura deseada y otras propiedades del alimento, y minimiza los requerimientos de energía mediante el procesado, mientras que las altas presiones y temperaturas asociadas con el uso de catalizadores químicos podrían ser con frecuencia perjudiciales para el producto final.

Frecuentemente los residuos de enzima remanente en el producto final son muy pequeños, de forma que si el producto va destinado a usos alimenticios o farmacéuticos, la enzima puede clasificarse como auxiliar tecnológico, aunque en algunos casos debe introducirse entre los aditivos alimenticios, especialmente cuando sigue siendo activo durante el procesado posterior. Al respecto, el empleo de enzimas inmovilizadas representa una ventaja adicional, porque la enzima o la célula inmovilizada se puede recuperar completamente de la mezcla de reacción, y pueden utilizarse repetidamente sin que se produzca la contaminación del producto final y sin necesidad de calentar el producto para la consiguiente desnaturalización de la enzima, procedimiento que siempre puede emplearse debido a la sensibilidad del producto (enzima) a la temperatura.

Es aconsejable utilizar mayores concentraciones de enzima inmovilizada que de enzima libre puesto que la primera puede recuperarse y reutilizarse, resultando así una disminución del tiempo de reacción y/o el tamaño del recipiente necesario para llevar a cabo el proceso, y una virtual ausencia de enzima en el producto final de forma que solo sea necesario que sea aprobado como auxiliar tecnológico y no como un aditivo alimentario.

La inmovilización es una forma de mantener constantes las condiciones de reacción de una enzima. *In vivo* las concentraciones de reactantes están cambiando constantemente, y con frecuencia la enzima está siendo sintetizada y/o degradada durante la reacción. En experimentos discontinuos de laboratorio la concentración del sustrato disminuye, la de los productos aumenta y la enzima no está en las condiciones del estado estacionario. Sin embargo, las enzimas inmovilizadas pueden mantenerse en condiciones de reacción esencialmente constantes utilizando una enzima inmovilizada en un lecho de relleno o en reactor tipo tanque con agitación continua en el que el sustrato fresco se está alimentado continuamente a la enzima a una velocidad constante y los productos se van eliminando continuamente.

1.13. LEGISLACIÓN EN EL EMPLEO DE LAS ENZIMAS

Tradicionalmente las enzimas se han considerado seguras, debido a su descripción como extractos naturales, aunque tal concepto se está perdiendo.

El Comité de Aditivos y Contaminantes Alimentarios (FAAC) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Inglés clasificó las enzimas en 5 clases, de A a E, en base a su seguridad para ser usadas tanto en los alimentos como en su manufactura.

Tal clasificación toma en cuenta la naturaleza de la enzima, incluyendo su actividad catalítica, inmunogenicidad y alergenicidad o efectos tóxicos derivados de la enzima o de cualquier contaminante que contenga derivados del caldo de fermentación (HMSO, 1982). La definición de cada clase se muestra en la Tabla 3.

En esta revisión de las enzimas, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación recomienda incluir algunas enzimas en una lista de enzimas aceptables o provisionalmente aceptables para usarse en alimentación (Tabla 4), pero los datos de las enzimas del grupo B deben revisarse a los 2 años. Es de esperar que las regulaciones deberán hacerse según los lineamientos indicados por el Comité de Contaminación y Aditivos Alimentarios.

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE ENZIMAS SEGÚN (FAAC)

GRUPO	CARACTERÍSTICAS
A	Sustancias de las que los datos disponibles indican que son aceptables para usarse en alimentación.
B	Sustancias que por los datos disponibles pueden considerarse provisionalmente como aceptables para ser usadas en alimentación, aunque requieren la obtención de más información posterior dentro de un tiempo dado para su revisión.
C	Sustancias de las que los datos disponibles sugieren una posible toxicidad y que por tanto no pueden usarse en alimentación hasta que no exista una evidencia de su seguridad para establecer su aceptabilidad.
D	Sustancias para las que la información disponible indica una probable o definitiva toxicidad y que no deben ser utilizadas en alimentación.
E	Sustancias de las que se tienen datos inadecuados o no se conoce su toxicidad por lo que no es posible expresar una opinión sobre su aceptabilidad en el campo de la alimentación.

TABLA 4. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS SEGÚN EL MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (1982)

<i>FUENTE</i>	<i>PREPARACIÓN ENZIMÁTICA</i>
<i>(I) GRUPO A</i>	
<i>Ananas comosus</i>	-Bromelaina
<i>Ananas bracteate</i>	-Bromelaina
<i>Carica papaya</i>	-Papaína -Quimopapaína
Materiales comestibles o tejidos del estómago de ternera, cabrito o cordero	-Triacilglicerol lipasa
Tejido pancreático porcino o bovino	-Triacilglicerol lipasa -a-amilasa -Tripsina
Mucosa gástrica porcina	-Pepsina A -Pepsina B -Pepsina C
Abomasa de ternera, cabrito o cordero	-Quimosina (cuajo)
Abomasa bovino adulto	-Pepsina bovina A -Pepsina bovina B
Hígado bovino	-Catalasa
<i>(II) GRUPO B</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	-a-Amilasa -exo-1,4-a-D-glucosidasa (glucoamilasa), inmovilizada y no inmovilizada -Celulasa -β-D-galactosidasa (lactasa) -endo-1,3(4)-β-D-glucanasa -Glucosa oxidasa -Catalasa -Pectinesterasa -Pectín liasa -Poligalactunorasa

<i>Aspergillus oryzae</i>	- α -amilasa -Proteasa neutra
<i>Bacillus coagulans</i>	-Glucosa isomerasa inmovilizada y no inmovilizada
<i>Bacillus licheniformis</i>	- α -amilasa -Serín proteasa
<i>Bacillus subtilis</i>	- α -amilasa -endo-1,3(4)- β -D-glucanasa (laminarinasa) -Proteasa neutra
<i>Endothia parasitica</i>	-Endotia carboxil proteasa
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-Pululanasa
<i>Mucor miehel</i>	-Proteasa ácida
<i>Mucor pusillus</i>	-Proteasa ácida
<i>Penicillium emersonii</i>	-endo-1,3(4)- β -D-glucanasa
<i>Penicillium funiculosium</i>	-Dextranasa
<i>Penicillium lilacinum</i>	-Dextranasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- β -D-fructofuranosidasa (invertasa)
<i>Streptomyces fradiae</i>	-Serín proteasa
<i>Streptomyces olivaceus</i>	-Glucosa isomerasa inmovilizada
<i>Trichoderma viride</i>	-Celulasa

Las dextrenas derivadas de *Penicillium funiculosom* y *Penicillium lilacinum* también se permiten, aunque su uso está restringido a las primeras etapas del refinado del azúcar.

Entre los conservadores de las enzimas permitidos, se incluyen el ácido sórbico, el SO₂ y los metil, etil y propil ésteres del 4-hidroxibenzoato. Obsérvese que el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación clasifica los productos alimentarios de acción enzimática en tres clases: aditivos, potenciadores del sabor y agentes de volumen.

1.14. CONTROL Y SEGURIDAD EN LAS ENZIMAS

Las enzimas crudas se consumen en grandes cantidades para alimentos crudos, y las enzimas puras para la industria.

Existen tres grandes problemas:

A. Es impráctico utilizar enzimas puras en forma cristalina, y, aunque las enzimas se utilizan en alimentos, las impurezas no incluyen sustancias dañinas como las mocotoxinas.

B. Las enzimas proteínicas naturales, como todas las proteínas pueden causar reacciones de alergia.

C. Algunas enzimas tales como las enzimas proteolíticas (bromelina y papaína), pueden causar irritación después de una exposición frecuente.

CAPÍTULO 2. LA CRIOGENIA

Los procesos criogénicos se refieren a la producción y utilización de bajas temperaturas y han tenido un incremento muy espectacular a partir de la Segunda Guerra Mundial.

Los procesos criogénicos comprenden una tecnología muy variada de apoyo.

2.1. DEFINICIÓN

La palabra criogénia, deriva del griego "crios" que significa frío, y "genea" que significa nacimiento. En la práctica, la criogenia se define como la ciencia dedicada a la producción de bajas temperaturas (en general por debajo de -100°C). En la actualidad, cuando hablamos de criogenia nos referimos al frío originado por la aplicación de gases licuados⁽³⁶⁾.

Una definición más limitada, describe los procesos criogénicos a temperaturas por abajo de -148.15°C .

2.2. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS CRIOGÉNICOS⁽²⁶⁾

2.2.1. NITRÓGENO (N_2)

El Nitrógeno en condiciones normales (20°C de temperatura y 1 kg/cm^2 de presión), es un gas incoloro, inodoro e insípido, es el principal componente del aire, donde se encuentra presente en una proporción de 78.08% en volumen. A la presión atmosférica y a temperaturas por debajo de -196°C es un líquido incoloro, inodoro y caracterizado principalmente por su gran inercia química (no ataca o reacciona con otros productos), lo que favorece enormemente su utilización en la elaboración, envasado y conservación de los productos alimenticios.

A presión y temperatura normales, es un gas no inflamable e inerte. En atmósferas de nitrógeno no es posible la respiración de los seres vivos. Tampoco es posible la combustión de los cuerpos en este tipo de gas. Por otra parte, el nitrógeno es un elemento esencial para la vida, ya que forma parte de la estructura proteínica de los animales y de las plantas.

El nitrógeno presenta muy poca solubilidad en agua y otros líquidos. En la Tabla número 1, se presentan las características más importantes; en ella, el nitrógeno se expande al pasar de líquido a gas hasta 696.5 veces su volumen cediendo su calor latente (47.74 Kcal/Kg) en el proceso.

Cuatro son sus cualidades principales que han hecho del nitrógeno licuado, el fluido criogénico por excelencia para los procesos de refrigeración y ultracongelación:

- Su inercia química (no ataca ni reacciona con otros cuerpos).
- Su potencia frigorífica.
- No es tóxico.
- Su bajo precio.

2.2.2. DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂)

El dióxido de carbono o anhídrido carbónico es un gas, en condiciones normales (20°C de temperatura y 1 kg/cm² de presión). Se encuentra presente en la atmósfera en una proporción variable, comprendida entre el 0.03% y el 0.06% en volumen. Es incoloro e inodoro y con un sabor ácido. No es tóxico ni tampoco flamable. Solo es tóxico en concentraciones elevadas. Para usos industriales se suministra licuado en botellas de acero a temperatura ambiental. También se puede entregar en cisternas, en estado líquido y a baja temperatura (-14°C/-27°C).

Comercialmente también se presenta como nieve carbónica o hielo seco, a una temperatura de -78°C y a la presión atmosférica, teniendo entonces una alta capacidad frigorífica (150 Kcal/Kg).

El CO_2 en estado gaseoso, es un 53% más pesado que el aire, siendo mucho más soluble en agua que otros gases tales como el nitrógeno o el oxígeno. La solubilidad aumenta al bajar la temperatura, propiedad que se emplea en el envasado de cervezas y bebidas carbónicas en general.

El anhídrido carbónico en estado líquido es también incoloro y existe a temperaturas comprendidas entre -56.61°C y 31°C .

Con referencia al nitrógeno hay que destacar algunas diferencias:

- El nitrógeno es menos denso que el aire, mientras que el CO_2 es más pesado que el aire y se puede acumular en el fondo de los depósitos o en las partes bajas de una instalación cerrada.

- El nitrógeno tiene una temperatura de ebullición muy por debajo de los -100°C , mientras que el CO_2 la tiene por encima de -78.5°C .

- El nitrógeno es insípido y el anhídrido carbónico tiene un sabor ácido.

2.2.3. OXÍGENO (O₂)

El oxígeno es un gas en condiciones normales (20°C de temperatura y 1 kg/cm² de presión), incoloro, inodoro e insípido. Constituye el 20.94% del aire, no es tóxico y es poco soluble en agua. Al contrario que el nitrógeno y el anhídrido carbónico, el oxígeno es químicamente activo y se combina con muchos otros elementos y compuestos en reacciones exotérmicas. Para que tenga lugar la combustión de los cuerpos, su presencia es imprescindible.

El efecto del oxígeno sobre los alimentos es negativo en la mayoría de los casos, ya que produce su oxidación y da lugar a fenómenos tales como enranciamiento de las grasas y aceites. Por ello, se tiende al envasado de los alimentos en atmósferas libres de O₂. Sin embargo, el oxígeno, empleándolo correctamente en la industria alimentaria, puede ser benéfico en algunos casos tales como:

- Aceleración de procesos fermentativos.
- Oxigenación de aguas de piscifactorías.
- Transporte de peces vivos.
- Tratamiento de aguas residuales.

A la presión atmosférica y a temperaturas inferiores a -183°C, es un líquido inodoro, transparente y con un ligero color azul pálido. Es más pesado que el agua.

2.2.4. ANHÍDRIDO SULFUROSO (SO₂)

El dióxido de azufre, más conocido como anhídrido sulfuroso, es un gas en condiciones normales (20°C de temperatura y 1 kg/cm² de presión).

Es tóxico, no flamable y tiene gran avidez por el agua. Es muy irritante para ojos, garganta y vías respiratorias. El anhídrido sulfuroso en estado líquido puede provocar quemaduras cutáneas.

Por el olfato se puede detectar su presencia en concentraciones de más de 3.5 ppm, en volumen. Cuando se llega a una concentración de 20 ppm, produce tos e irritación de los ojos.

En estado de gas es más pesado que el aire, por lo que hay que tener cuidado con su manejo. En estado líquido es más pesado que el agua.

En la industria alimentaria se utiliza como antiséptico, en la conservación de bebidas fermentadas y en el almacenamiento de cereales.

2.2.5. PROTÓXIDO DE NITRÓGENO (N₂O)

El protóxido de nitrógeno, llamado también hemióxido de nitrógeno es un gas en condiciones normales (20°C de temperatura y 1 kg/cm² de presión). No es tóxico ni flamable.

Para aplicaciones industriales se entrega licuado, siendo entonces un líquido de olor dulce, incoloro, no tóxico y anestésico.

En estado gaseoso, su poder anestésico se deja notar cuando su concentración es superior al 70% en volumen. Cuando se encuentra en concentraciones muy altas se comporta como un gas asfixiante por desplazamiento del oxígeno.

2.2.6. ARGÓN LÍQUIDO (Ar)

El argón líquido es transparente, sin color y con propiedades similares a las del nitrógeno líquido. Es inerte y no es tóxico. A 1 atmósfera de presión el argón líquido hierve a -185.85°C y se congela a -189.85°C . El argón líquido saturado a 1 atmósfera es más denso que el oxígeno, como debe esperarse (1394 kg/m^3), debido a que el argón tiene un peso molecular mayor que el del oxígeno. La diferencia entre el punto de ebullición normal y el punto de congelación para el argón es de tan sólo 4°C .

El argón está presente en el aire atmosférico en una concentración de 0.934% en volumen o 1.25% en peso.

2.2.7. NEÓN LÍQUIDO (Ne)

El neón es otro gas que se puede producir como un subproducto en una planta de separación de aire. El neón líquido es un líquido incoloro, transparente que hierve a 1 atmósfera a -246°C y se congela a -248°C . El punto de ebullición del neón está de alguna manera por encima del que tiene el hidrógeno líquido. Pero dado el hecho de que el neón es inerte, tiene un mayor calor de vaporización por unidad de volumen, y tiene una densidad mayor, lo cual hace que sea un refrigerante atractivo comparado con el hidrógeno.

2.2.8. OTROS FLUIDOS CRIOGÉNICOS NO DERIVADOS DEL AIRE⁽²⁶⁾

El flúor líquido presenta un color ligeramente amarillo cuyo punto normal de ebullición es de -187.91°C . A -219.65°C y 1 kg/cm^2 , el flúor líquido se congela como un sólido amarillo, pero abajo de un subenfriamiento a -227.55°C se transforma en un sólido blanco. El flúor líquido es uno de los líquidos criogénicos más densos en su punto normal de ebullición (1505 kg/m^3). El flúor se caracteriza químicamente por su extrema reactividad. El flúor reacciona con casi todas las sustancias inorgánicas. Si el flúor tiene contacto con hidrocarburos, reaccionará hipergólicamente con mucho calor de reacción, el cual muchas veces es suficientemente alto que el contenedor metálico en que se encuentra se enciende. Algunos metales como aceros inoxidable de bajo carbón y el monel, que son usados en sistemas de flúor, desarrollan una película protectora en la superficie al ponerse en contacto con el flúor gaseoso. Esta película en la superficie previene la propagación de la reacción flúor-metal en todo el volumen del metal (contenedor metálico).

El flúor es altamente tóxico. La razón de concentración fatal para animales es de 200 ppm-h ; esto es, que para una exposición de 1 hora, 200 ppm de flúor es fatal; para una exposición de 15 minutos, 800 ppm es fatal; y para una exposición de 4 horas, 50 ppm es fatal. La máxima concentración permitida para la que el hombre puede estar expuesto se considere que debe de ser de 1 ppm-h . La presencia de flúor en el aire puede ser detectado por su olor picante e irritante en concentraciones tan bajas como 1 a 3 ppm . Debido a su alta toxicidad, el flúor líquido casi no es utilizado.

El metano es el principal componente del gas natural. Es un líquido incoloro, que hierve a 1 atmósfera a -161.45°C . El metano líquido tiene una densidad aproximada de uno y medio de la que tiene el nitrógeno líquido (424.2 kg/m^3).

El metano forma mezclas explosivas con el aire en concentraciones que van de 5.8 a 13.3% en volumen).

El hidrógeno líquido tiene un punto normal de ebullición de -252.85°C y una densidad en su punto normal de ebullición de tan solo 70.79 kg/m^3 . La densidad del hidrógeno líquido es de $1/14$ de la del agua, lo que significa que es el más ligero de todos los líquidos. El hidrógeno líquido es inodoro e incoloro y sólo no puede mantener la combustión; sin embargo, en combinación con el oxígeno o aire, es bastante flamable. Trabajos experimentales han demostrado que mezclas hidrógeno-aire son explosivas en un espacio sin confinar en un rango de 18 a 59% hidrógeno en volumen.

El helio tiene 2 isótopos estables: He_4 que es el más común, y He_3 . El He_4 líquido tiene un punto normal de ebullición de -268.9°C y una densidad en este punto de 124 kg/m^3 o cercano al $1/8$ que la del agua. El helio líquido no tiene punto de congelación a una presión de 1 kg/cm^2 ; de hecho, el helio no se congela abajo de su propia presión de vaporización aunque la temperatura se reduzca al cero absoluto. A cero absoluto, el helio 4 líquido deberá de ser comprimido a una presión de 24.97 kg/cm^2 antes de que se congele. El calor de vaporización del He_4 líquido en su punto normal de ebullición es 20.90 kJ/kg que es tan sólo $1/110$ el del agua. Si bien el helio está clasificado como un gas raro y como uno de los gases más difíciles de licuar, sus propiedades tan inusuales han despertado tanto interés que el helio ha sido objeto de mucho más estudios teóricos y experimentales que cualquier otro fluido criogénico.

En la Tabla 5, se presentan las características físicas más importantes de algunos fluidos criogénicos⁽²⁶⁾; y en la Tabla 6, las propiedades termodinámicas y de transporte de los fluidos más comúnmente usados en la ingeniería criogénica.

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALGUNOS FLUIDOS CRIOGENICOS

COMPUESTO	NITRÓGENO	DIÓXIDO DE CARBONO	OXÍGENO	ANHÍDRIDO SULFUROSO	PROTÓXIDO DE NITRÓG.
Símbolo químico	N ₂	CO ₂	O ₂	SO ₂	H ₂ O
Peso específico	0.996	1.53	1.105	3.049	
Peso molecular	28.0134	44.01	32	64.06	44.01
Volumen de expansión (líquido-gas)	696.5	---	861	535	662
Temp. de ebullición (a 1 kg/cm ²), [°C]	-195.8	-78.5	-183	-10.01	-88.47
Temp. crítica [°C]		31			
Densidad en estado líquido [kg/m ³]	808.60	1.562 (79.8°C)	1.141	1.458	1.228
Calor latente de vaporización [Kcal/Kg]	47.74	136.7	50.88	93	89.84
Punto triple					
Temperatura [°C]	-210	-56.57	-218.8	-75.5	-90.81
Presión [Bar]	0.1253	5.185	0.00152	0.0167	0.878

TABLA 6. PROPIEDADES TERMODINÁMICAS Y DE TRANSPORTE DE FLUIDOS COMUNMENTE USADOS EN LA INGENIERÍA CRIOGENICA

PROPIEDADES DE LÍQUIDO SATURADO A 1 ATM		HELIO LÍQUIDO	HIDRÓGENO LÍQUIDO	NEÓN LÍQUIDO	NITRÓGENO LÍQUIDO	AIRE LÍQUIDO	FLUOR LÍQUIDO	ARGÓN LÍQUIDO	OXÍGENO LÍQUIDO
PUNTO NORMAL DE EBULLICIÓN	°K	3.19	20.27	27.09	77.36	78.8	85.24	87.28	90.18
	°R	5.74	36.5	48.8	139.3	142	153.4	157.1	162.3
TEMPERATURA CRÍTICA	°K	3.32	33.2	44.4	126.1	133	144.0	150.7	154.6
	°R	5.98	59.7	79.9	227.0	240	259.2	271.2	278.3
PRESIÓN CRÍTICA	MPa	0.117	1.315	2.65	3.39	3.92	5.57	4.89	5.08
	Atm	1.15	12.98	26.2	33.5	38.7	55.0	48.3	50.1
TEMPERATURA DE PUNTO TRIPLE	°K	...	13.9	24.54	63.2	...	53.5	83.8	54.4
	°R	...	25.1	44.26	113.7	...	96.4	150.8	98.0
PRESIÓN DE PUNTO TRIPLE	KPa	...	7.20	43.3	12.85	...	0.221	68.8	0.152
	Atm	...	0.0711	0.427	0.127	...	0.00218	0.679	0.0015
DENSIDAD	kg/m ³	58.9	70.79	1206	807.3	874	1507	1394	1241
	lb/ft ³	3.68	4.42	75.3	50.4	54.6	94.1	87.0	71.2
CALOR LATENTE	kJ/kg	8.49	443	85.9	199.3	205	166.3	161.9	213
	Btu/lbm	3.65	190.5	36.9	85.7	88.1	71.5	69.6	91.3
CALOR ESPECÍFICO	kJ/kg-°K	4.61	9.68	1.83	2.05	1.96	1.54	1.136	1.695
	Btu/lbm-°R	1.10	2.31	0.437	0.490	0.468	3.67	0.271	0.405
VISCOSIDAD	μPa-s	1.62	13.2	130	158	168	244	252	190
	lbm/ft-h	0.0039	0.0319	0.314	0.382	0.407	0.542	0.610	0.460
CONDUCTIVIDAD TÉRMICA	mW/m-°K	17.1	118.5	113	139.6	141	148	123.2	151.4
	Btu/h-ft-°F	0.0099	0.0685	0.653	0.0807	0.0815	0.0855	0.0712	0.0875
CONSTANTE DIELÉCTRICA		...	1.226	1.188	1.434	1.445	1.43	1.52	1.484
VELOCIDAD DEL SONIDO	m/s	115	1189	...	856	866	...	847	902
	ft/s	376	3900	...	2810	2840	...	2780	2960

2.3. VENTAJAS DE LA CONGELACIÓN CRIOGÉNICA CON NITRÓGENO LÍQUIDO RESPECTO A LA CONGELACIÓN CON CO₂ LÍQUIDO

VENTAJAS

- * Mejor eficiencia
1.6 BTU/lb Vs. 1.2 BTU/lb
- * Es más frío (-195°C Vs -85°C)
- * Menor espacio para congelar la misma producción
- * Confiabilidad en el suministro de nitrógeno líquido vs dependencia del CO₂ de amoníaco disponible, así como de refinerías de petróleo
- * Menor inversión
- * Menor tiempo de retención para congelar
- * Mejor calidad del producto
- * Mejor apariencia

DESVENTAJAS

- * Aceptación comercial del CO₂
- * Costos variables más altos. El costo del nitrógeno es más alto que el de la energía (de sistemas mecánicos)
- * Los costos totales de una unidad de refrigeración mecánica, son menores que con nitrógeno líquido en rangos de por encima de 3000 a 4000 lb/h

TABLA 7. COMPARACIÓN ENTRE LA CONGELACIÓN POR NITRÓGENO LÍQUIDO Y ANHÍDRIDO CARBÓNICO⁽²⁶⁾

ELEMENTO DE COMPARACIÓN	NITRÓGENO	ANHÍDRIDO CARBÓNICO	VENTAJAS PARA:
Temperatura	-196°C	-79°C	N ₂ : más rapidez de congelación
Reacciones	Inerte	Al contacto con el agua da ácido carbónico	N ₂ (inerte)
Capacidad frigorífica	72 frigor./l (-196°C)-(-20°C)	60 frigor/kg	N ₂ (mayor capacidad)
Costo ^d	100	120	N ₂ (menos costo)
Almacenamiento	Almacenamiento a temperatura ambiente	Almacenamiento en frío	N ₂ (más seguro y barato)
Seguridad	Inerte. En el aire esta presente (78%)	Gas tóxico, produce asfixia	N ₂ (más seguro)
Seguridad	Baja presión de almacenamiento (3 kg/cm ²)	20 kg/cm ²	N ₂ (menor presión)
Seguridad	Menos pesado que el aire	Más pesado que el aire (peligro)	N ₂ (menos denso)
Canalización	Sin atascos	Atascos si se produce nieve carbónica	N ₂ (sin atascos)
Túneles de congelación	Fácil regulación	Difíciles de regular (nieve carbónica)	N ₂ (más fácil de regular)

^d Para el mismo precio de 1 litro de N₂ líquido y 1 kg de CO₂, este último tendrá un costo como fluido de congelación del orden del 28 % más, ya que el N₂ da 72 Kcal/l y el CO₂ da 60 Kcal/kg.

2.4. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DEL NITRÓGENO LÍQUIDO

El almacenamiento, carga, distribución y descarga del nitrógeno depende de su estado físico, ya sea líquido o gaseoso, puesto que el nitrógeno es no corrosivo, no requiere de materiales de construcción especiales, excepto que deben ser apropiados para usarlos a las temperaturas a las que se encuentra el nitrógeno líquido.

El diseño de los recipientes y tuberías que se utilizarán en el servicio del nitrógeno líquido se deberán basar en las normas de la Sociedad Americana de Ingenieros Mecánicos (ASME) que implica la presión y temperatura y en especificaciones de ingeniería. Con el nitrógeno líquido se presentan dos ventajas que son: 1.- ocupa menos volumen y 2.- es menos costoso que el almacenamiento gaseoso de alta presión.

Dependiendo de la cantidad de nitrógeno líquido requerido por el usuario, este se almacena y distribuye en varios tipos de recipientes. Los recipientes comúnmente usados son: termos (garrafas), tanques y cilindros.

Dependiendo del diseño del recipiente, las cantidades de vaporización por día suelen ser altas (3.0% en relación al volumen del recipiente) y relativamente bajas (0.4%) en relación al producto almacenado.

Los termos o garrafas son recipientes sin presión interior. Consta de una tapa de poliuretano colocada encima de la boca del tubo del cuello, evitando que la humedad atmosférica se congele y obstruya el tubo del cuello. La unidad de medida de capacidad para el termo es el litro y se puede encontrar de 5 a 200 litros de capacidad.

2.5. CONDICIONES ESPECIALES DE ALMACENAMIENTO DE NITRÓGENO LÍQUIDO PARA CONGELACIÓN

Cuando se instalan tanques de almacenamiento y tubería para equipos de congelación con nitrógeno líquido las consideraciones más importantes a tomar en cuenta deberán ser la presión del tanque de almacenamiento, diámetro de tubería, trayectoria de la tubería y el aislamiento de la tubería.

Al considerar la presión del tanque de almacenamiento, habrá que saber que el exceso en la presión del mismo generará:

- * Operación ineficiente del congelador debido a pérdidas flash que ocurren en la válvula de control del congelador y en las boquillas de aspersion.

- * Reducción en la capacidad de refrigeración por unidad de LIN.

- * Reducción en la capacidad de almacenamiento efectiva y de entrega del producto por unidad.

De acuerdo a datos históricos de operación de tanques, la presión de almacenamiento en los mismos no deberá ser menor de 10 psig y no mayor a 20 psig.

En el dimensionamiento de la tubería, se ve que el excesivo dimensionamiento de la misma, provocará:

- * Inversión inicial muy alta.

- * Altas pérdidas de LIN debidas a altos burbujeos.

2.6. MANEJO DE LÍQUIDOS CRIOGÉNICOS

2.6.1. SEGURIDAD EN LA UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO LÍQUIDO Y GASEOSO

Cuando se maneja el nitrógeno líquido es necesario tener conocimiento de los efectos que produce el tener contacto con él y la manera en que uno se podría cuidar. De tal manera, deberán usarse cuando se maneje nitrógeno líquido ropas de algodón, lana poliéster, etc. El equipo de protección personal incluye para la cabeza y los ojos, accesorios tales como anteojos de seguridad, cascos y caretas. Las manos, los brazos, las piernas y los pies se protegen con guantes no ajustados, botas, zapatos y vestimentas en general de algodón, máscaras y guantes deberán de ser de material impermeable.

El nitrógeno, es un gas industrial de uso corriente. Para su empleo se necesita conocer sus principales propiedades y tomar las precauciones que de ello se deriven.

A temperatura ambiente, el nitrógeno gas es algo más ligero que el aire. Sin embargo; a baja temperatura, es más pesado que el aire (el nitrógeno a 0°C es ya más pesado que el aire a 15°C).

Los riesgos que se pueden derivar de nitrógeno son:

Si el nitrógeno ocupa el lugar del oxígeno en el aire, hay riesgo de asfixia: una atmósfera con menos del 16% de oxígeno es ya peligrosa.

El nitrógeno gas frío procedente de la evaporación de nitrógeno líquido tiende a acumularse en los puntos bajos.

Si el nitrógeno líquido se introdujera en un volumen cerrado, la presión que alcanzaría el gas vaporizado, por calentamiento, sería del orden de 700 bares con peligro de explosión de las canalizaciones.

* La baja temperatura de nitrógeno líquido puede provocar quemaduras en la piel.

* Debido a esta temperatura, el aire se licúa al contacto con las paredes enfriadas con nitrógeno líquido y hay concentración en oxígeno; de ahí el gran riesgo de activación de combustiones en las proximidades,

* La baja temperatura fragiliza a casi todos los materiales; por ello, los materiales comúnmente usados para temperaturas criogénicas son las aleaciones de acero .

Las precauciones esenciales que se deben tomar con el nitrógeno son las siguientes:

* La implantación del almacenamiento de nitrógeno líquido, línea de trasiego y material a utilizar la realizan los suministradores. El recipiente no debe situarse nunca por debajo del nivel del suelo.

* Las zonas de almacenamiento o empleo del nitrógeno, deben disponer de una buena ventilación, manteniendo el contenido de oxígeno a más del 18%.

* No penetrar jamás en un recinto que contenga nitrógeno sin tomar las precauciones previamente definidas y respetarlas rigurosamente.

Prever dispositivos de seguridad contra las sobrepresiones, en cada tramo de circuito de nitrógeno líquido donde el líquido corre el riesgo de quedar aprisionado entre dos válvulas.

* En la manipulación de nitrógeno líquido, es preciso protegerse contra las proyecciones con gafas, guantes, etc.

* Utilizar solamente materiales dúctiles a baja temperatura.

* No utilizar canalizaciones desnudas.

* Su aislamiento debe realizarse con materiales incombustibles.

En caso de fuga:

- Evacuar el local. Cerrar la válvula de nitrógeno a la salida del almacenamiento.

- Abrir puertas y ventanas y ventilar el recinto.

- Avisar al suministrador.

- No penetrar en ningún caso antes de tener la certeza de que el contenido de oxígeno se ha elevado por encima del 18%. o hacerlo únicamente con un aparato de respirar autónomo y un arnés de seguridad que permita a los compañeros sacar a la persona de esa atmósfera en caso de desfallecimiento.

En caso de asfixia:

- Después de llevar a la persona a una atmósfera normal, comenzar inmediatamente a efectuarle la respiración artificial y llamar a los socorristas.

- Si es necesario, administrar oxígeno con un respirador.

- Continuar así hasta la llegada de un médico.

En un recinto que haya contenido nitrógeno:

- Purgarlo con aire y penetrar ahí, tomando las precauciones definidas y respetarlas rigurosamente.

En caso de proyección con nitrógeno líquido:

- En los ojos: Lavarlos con abundante agua durante, al menos quince minutos. Llamar a un médico.

- En la piel: No frotar. Quitar o desgarrar la ropa si es necesario. Descongelar las zonas alcanzadas por calentamiento moderado y progresivo (con agua tibio o con el contacto con otra parte caliente del cuerpo).

2.6.2. SEGURIDAD EN LA UTILIZACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO

La utilización en fase gaseosa produce una vaporización del líquido, originando un enfriamiento importante.

La nieve carbónica compactada en pellets para ciertas utilidades, o formada por expansión del CO_2 a la presión atmosférica, en caso de fuga, por ejemplo, está a una temperatura de -80°C .

La nieve carbónica se puede cargar de electricidad estática. La sublimación de la nieve carbónica entraña el desprendimiento de un volumen gaseoso importante (0.5 m³ de gas por kg de nieve).

Estos son los riesgos posibles del CO₂:

- Altera la conciencia (efecto narcótico) y la respiración a partir de un contenido del 2% en el aire. Por encima del 7% se puede llegar rápidamente a la pérdida del conocimiento.

- Existe el riesgo de que se acumule en los puntos bajos, donde origina los peligros indicados arriba.

- En enfriamiento excesivo produce la formación de nieve carbónica en el interior de la botella y una fragilización del metal de la misma.

- Si el CO₂ líquido estuviera dentro de un espacio cerrado, existiría riesgo de explosión por aumento excesivo de presión.

- El contacto de la nieve carbónica con una parte del cuerpo, puede producir congelaciones en la piel.

- El rápido vaciado de una botella de CO₂ produce la formación de nieve carbónica y provoca con facilidad descargas eléctricas en la atmósfera, creando un riesgo si esta atmósfera es explosiva.

- El desprendimiento gaseoso producido por el calentamiento de la nieve carbónica entraña un aumento de presión si se produce en un espacio cerrado.

Qué hacer en caso de accidente:

En caso de fugas:

- Evacuar el local. Cerrar la válvula principal de almacenamiento.

- Abrir las puertas y ventilar enérgicamente.

- Debe aconsejarse la verificación de contenido de CO₂, que deberá ser inferior al 2%.

En caso de asfixia:

- La persona que acuda en auxilio de la víctima deberá ir equipada de una mascarilla respiratoria autónoma y de un cinturón de seguridad que permita, a un compañero, sacarla de esta atmósfera en caso de dificultad.

- La víctima será llevada rápidamente al aire libre.

- Se iniciará inmediatamente la respiración artificial.

- Se avisará a los bomberos, precisándoles la causa del accidente.

En caso de proyecciones con CO₂ líquido:

- En los ojos: Lavarlos con abundante agua durante, al menos quince minutos. Llamar a un médico.

- En la piel: No frotar. Quitar o desgarrar la ropa si es necesario. Descongelar las zonas alcanzadas por calentamiento moderado y progresivo (con agua tibia ó con el contacto con otra parte caliente del cuerpo).

CAPÍTULO 3. CARACTERÍSTICAS DE LA PIÑA

3.1. ASPECTOS GENERALES DEL FRUTO

La piña es un fruto tropical de la familia *Bromeliáceas* del orden de las *Farinifloras* género *Anana*. Originaria de Sudamérica, se ha extendido por el mundo tropical. Se consume su fruto en estado fresco, aunque también se utiliza en grandes cantidades en la industria conservera, para la producción de conservas, mermeladas y bebidas refrescantes. La piña está constituida en su mayor parte por agua, aproximadamente el 90% es rica en azúcares y contiene vitamina A, B y C, sin omitir por supuesto a la bromelina⁽²⁷⁾.

Aunque la piña se cultiva y se vende como fruta fresca, la mayor parte de la cosecha mundial es procesada en productos enlatados. Los subproductos del enlatado de la piña son el azúcar y el alimento para ganado. El azúcar se recupera por purificación en intercambiadores de iones del jugo prensado de los materiales de desecho de las enlatadoras. El residuo de la pulpa seca se utiliza como alimento para ganado, como subproducto del jugo de la piña puede producirse alcohol y vinagre de piña en lugar de azúcar. Estos subproductos son de importancia considerable como medio económico para aprovechar el material de desecho de las enlatadoras⁽⁸⁾.

Actualmente México ocupa el quinto lugar entre los productores de piña fresca y el tercer sitio entre los productores de piña industrializada⁽⁹⁾. Son cuatro las variedades cultivadas en el país⁽⁸⁾:

* Española roja. Se caracteriza por su alto contenido de azúcar, pero como no reúne las condiciones para su comercialización, tiene menor demanda.

* Cabezona. Es una variedad de color casi blanco y sumamente aromático, características que la hacen apropiada para la industria refresquera.

* Esmeralda. Variedad de sabor exquisito y atractivo color, pero poco resistente a las maniobras comerciales; se considera la variedad de mejores características para el consumo, pero difícil para su traslado lo que hace desecharla como producto de exportación.

* Cayena lisa. Esta variedad reúne especiales características incluyendo su resistencia para el manejo comercial. Tiene gran demanda como fruta fresca y para la industria, lo que justifica el lugar que ocupa en relación con las demás variedades.

La industrialización de la piña es de gran importancia para la economía del país. El grado de eficiencia de una empresa industrial está determinado por los porcentajes de los diferentes productos que se obtienen a partir de una cantidad base de materia prima.

En el proceso del enlatado de la piña se desechan grandes cantidades de residuos. En ellos quedan comprendidos las cáscaras, los corazones fibrosos, las partes obtenidas de la limpieza de los cilindros de piña, los residuos de los extractos de jugo, y las coronas.

Con el despuntado de la fruta no solamente se separa la parte no utilizable, sino que se corta cierta cantidad de pulpa adicional, lo cual disminuye el rendimiento de pulpa aprovechable en una proporción del 1 al 1.5 por ciento⁽⁸⁾.

Las mesas de despuntado y rebanado, las bandas transportadoras y muchas de las máquinas que por su funcionamiento provocan escurrimiento de jugo, no tienen ningún dispositivo que les permita recogerlo. Las pérdidas debido a este escurrimiento se calculan de 0.4 a 3.6 por ciento en promedio, un 2.25 por ciento en piña mondada a mano, y de 3.33 por ciento para la piña mondada en ginaca⁽⁷⁾.

En los valores consignados se observa un aprovechamiento de 35 a 44 por ciento de la piña industrializada, no siendo utilizado del 56 al 65 por ciento restante, lo cual representa en realidad un desperdicio en la industria de la piña. Las cáscaras, puntas, corazones y los trozos obtenidos de la limpieza de los cilindros representa aproximadamente el 40 por ciento del peso de la piña industrializada⁽⁷⁾.

3.2. APROVECHAMIENTO DE LOS DESECHOS DE PIÑA

El empleo de los desechos industriales de la piña es muy variado, teniéndose entre los más importantes los siguientes:

3.2.1. JARABE DE AZUCAR. La expresión continua de los desechos de la piña da como resultado un jugo impuro que contiene una considerable proporción de azúcares por lo que convenientemente refinado puede sustituir en forma aceptable el jarabe preparado con azúcar comercial.

Extracción	150 l/ton
Sólidos insolubles (pulpa)	8 a 10 %
Sólidos solubles (azúcares y ácidos)	8 a 10 %
Acidos presentes	87 % ácido cítrico 13 % ácido málico
Azúcares	sacarosa 66 % glucosa 17 %

FUENTE: Datos proporcionados por los Departamentos de Producción y Control de Calidad de la Planta de Productos JUNEX. S.A. de C.V., Xalostoc, Edo. de México.

3.2.2. SALVADO DE PIÑA. La operación de extracción del jugo de los desechos deja como residuos la cáscara parcialmente seca, que se puede unir con las pequeñas cantidades residuales del prensado de la pulpa durante la obtención del jugo de primera calidad para después ser deshidratados y dejar como producto una harina de alto valor energético con:^a

Agua	9.64 %
Proteínas	4.26 %
Azúcares totales	23.30 %
Materias grasas	0.88 %
Celulosa	15.42 %
Extracto libre de nitrógeno	43.35 %
Cenizas	3.15 %

3.2.3. ÁCIDO CÍTRICO. El ácido cítrico contenido en el jugo de la piña puede precipitarse en forma de citrato de calcio por la neutralización del ácido con lechada de cal y carbonato de calcio, para después aplicar una serie de operaciones que tienen por objeto descomponer el citrato de ácido cítrico y obtener éste en forma de cristales de alto grado de pureza (proceso Scheele). Este proceso deja como subproducto sulfato de calcio, proveniente de la descomposición del citrato de calcio en ácido cítrico.^a

3.2.4. BROMELINA. El jugo obtenido por expresión de los desechos contiene aproximadamente 400 ppm por litro de la enzima proteolítica denominada bromelina, la cual puede obtenerse sometiendo el jugo a un tratamiento especial con el objeto de obtener un líquido limpio de residuos, realizando una extracción con etanol o acetona, para después separarla por centrifugación y purificación por cromatografía. El líquido obtenido en la otra fase de la centrifugación se somete a una destilación para recuperar el disolvente.^a

3.2.5. VINAGRE. Los desechos pueden llevarse a fermentación mediante la adición de nutrientes especiales y levaduras contenidas en los propios desechos durante aproximadamente 4 días. De esta operación se obtiene por escurrimiento y prensado los mostos, que una vez desecados y clarificados sirven de base para la preparación de las mezclas normales de trabajo de los generadores de viruta empleados en la elaboración del vinagre.^a

Para tener una visión más clara acerca de la situación que guarda la producción de piña en México, en la Tabla 8 se presentan a los principales Estados de la República Mexicana productores de piña, y el porcentaje que cada uno aporta a tal producción⁽⁹⁾. Así como también, las principales Asociaciones de Productores de Piña a nivel nacional (Tabla 9)⁽⁴⁶⁾.

TABLA 8. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE PIÑA

<i>ESTADO</i>	<i>% PRODUCCIÓN</i>
VERACRUZ	73.60
OAXACA	24.10
NAYARIT	2.10
QUINTANA ROO	0.06
JALISCO	0.1

^a FUENTE: Reporte de la Asociación Nacional de Fabricantes de conservas de USA. Suscripción IPN, México 1991.

TABLA 9. ASOCIACIONES DE PRODUCTORES DE PIÑA

CHIAPAS

Asociación Agrícola Local
de Ocozocuautila
Av. Poniente No. 69
Ocozocuautila. Chis.

OAXACA

Asociación Agrícola Local
"Loma Bonita"
Quintana Roo No. 27
Loma Bonita, Oax.

Asociación Agrícola Local
"Loma Bonita No. 2"
Guerrero No. 28
Loma Bonita, Oax.

Asociación Agrícola Local
"Loma Bonita No. 4"
Puebla No. 66
Loma Bonita, Oax.

Asociación Agrícola Local
"Gral. Lázaro Cárdenas"
16 de Septiembre e Hidalgo
Loma Bonita, Oax.

Asociación Agrícola Local
"Alfredo V. Bonfil"
Apartado Postal No. 3
Loma Bonita, Oax.

Asociación Agrícola Local
"Benito Juárez"
Agencia de Correos
Tuxtepec, Oax.

Unión Agrícola Regional de
Productores de Piña del
Estado de Oaxaca
Morelos y 26 de Septiembre
Loma Bonita, Oax.

TABASCO

Asociación Agrícola Local de
Francisco Rueda
Domicilio Conocido, Fco, Rueda
Hulmanguillo, Tab.

VERACRUZ

Asociación Agrícola Local
"San Antonio"
Lista de Correos
Chacaltianguis, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Las Canteras"
Av. Flores Magón s/n
Villa Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
"La Esmeralda"
Cuitláhuac No. 5
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Villa Isla
Juárez Norte No. 50
Villa Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Villa Mata de Piña"
Juárez No. 41
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Nueva Esperanza"
16 de Septiembre No. 2
Villa Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Macayas
Apartado Postal No. 36
Isla, Ver.

VERACRUZ

Asociación Agrícola Local
"Mata Limones"
Mariano Matamoros No. 21
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
Poblado el Palmar
Esq. Juárez y Ocampo
Villa Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
"San Isidro"
Domicilio Conocido
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
del Ejido "La Unión"
Calle Hidalgo No. 26
Villa Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
de la Barranca
Martínez Moreno No. 6
Juan Rodríguez Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
Ejido Nopalapan
Maurillo Cortés Parra No. 16
Juan R. Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Las Palmas"
Domicilio Conocido
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Rancho Alegre
Lista de Correos
Juan Rodríguez Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
"San Matías"
Morelos No. 48
Juan R. Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Andrés Gómez Alemán"
Lista de Correos
Juanita, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Playa Vicente"
Hidalgo No. 44
Playa Vicente, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Lindavista"
Apartado Postal No. 19
Villa Azueta, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Buena Vista
Apartado Postal No. 4
Estación Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
"El Tesoro de Isla"
Av. Raúl Sandoval No. 3
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Juan Rodríguez Clara
Morelos No. 13
Juan R. Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Colonia Domínguez
Apartado Postal No. 3
Juan R. Clara, Ver.

Asociación Agrícola Local
de la Victoria
Apartado Postal No. 10
Playa Vicente, Ver.

Asociación Agrícola Local
de el Ocate
Apartado Postal No. 17
José Azueta, Ver.

Unión de Producción Agrope--
cuaria "Alberto Cinta"
Domicilio Conocido
Villa Azueta, Ver.

Asociación Agrícola Local
de Isla
Apartado No. 7
Isla, Ver.

Asociación Agrícola Local
Colonia Edén de las Flores
Av. 2 de abril No. 36
Playa Vicente, Ver.

Asociación Agrícola Local
"Vieja San Isidro"
Francisco I. Madero No. 42
Isla, Ver

Asociación Agrícola Local
de los Tigres
Av. Ferrocarril No. 21, Los Tigres
Juan Rodríguez C. Ver.

En cuanto a la producción, exportación e importación de la piña, se presenta la siguiente Tabla:

TABLA 10. PRODUCCIÓN NACIONAL DE PIÑA, IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES

ANO	PRODUCCIÓN (TON)	IMPORTACIÓN (KG)	EXPORTACIÓN (TON)
1980	623 000	- - -	- - -
1981	473 000	- - -	- - -
1982	424 000	- - -	- - -
1983	430 000	- - -	- - -
1984	454 000	- - -	- - -
1985	320 000	- - -	- - -
1986	340 000	- - -	- - -
1987	343 000	- - -	- - -
1988	318 000	27 913	16 299
1989	435 000	66 432	9 928
1990	455 000	35 176	8 681
1991	299 000	3 450	9 817
1992	264 000	4 207	10 680
1993	281 000	15 685	8 184

FUENTE: Los datos se obtuvieron del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI)

PARTE 2

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1. LAS PROTEASAS

Aproximadamente el 60% de las enzimas industriales más importantes, son las proteasas. Ciertas proteasas fueron usadas por siglos en el procesamiento de la industria alimenticia y algunos registros de los descubrimientos de esta actividad fueron importantes. El cuajo obtenido a partir del cuarto estómago de las vacas no destetadas se usaron tradicionalmente en la producción de queso. Similarmente la papaína se utilizó en el ablandamiento de la carne. Estos antiguos descubrimientos encausaron el desarrollo de varias aplicaciones alimentarias para un extenso rango de proteasas disponibles en algunas fuentes, principalmente microbianas.

De entre las enzimas más importantes de origen vegetal, la papaína es la fuente más importante, siguiéndole la bromelina (obtenida del jugo de piña) y la ficina (obtenida del higo)⁽⁴²⁾. Para satisfacer las diferentes necesidades, tales sustancias pueden usarse solas o combinadas; considerando los siguientes puntos de interés:

1) La mezcla debe mostrar una actividad óptima en el pH y temperatura adecuada al proceso.

2) Existe un gran número de proteasas y peptidasas, las cuales pueden dividirse en endotipos, que atacan la región central de las cadenas proteínicas dando fragmentos polipeptídicos y exotipos, que eliminan los aminoácidos terminales. El balance entre estas formas es importante desde el punto de vista del efecto requerido.

3) En algunos casos una vez que la reacción ha progresado lo suficiente, es necesario destruir las enzimas. Para tal fin, la enzima no debe ser estable al calor

Entre las principales aplicaciones de las mezclas de proteasas, se encuentran las siguientes:

A) *CURTIDO*. Este proceso que tradicionalmente sigue al pelado con cal, se llevaba a cabo con deyecciones de perro, suplementadas a veces con gallinazas que, como las anteriores, contienen enzimas proteolíticas así como una extensa flora bacteriana para producir más enzimas. El efecto consiste en originar una degradación parcial de la superficie de la piel, la cual reblandece su textura, mejora su aspecto y produce una distribución más uniforme del colorante. Aparte de lo desagradable de su manejo, aquellos productos no son fácilmente estandarizados y por ello han sido desplazados en gran parte por mezclas artificiales de enzimas⁽³²⁾.

B) *MODIFICACIÓN DE HARINAS*. Clases apropiadas así como las condiciones climáticas en los continentes americano y australiano tienden a producir una preponderancia de trigos "fuertes" o "duros", esto es, trigos cuya harina es de elevado contenido de gluten y fuerte elasticidad de masa húmeda. Son satisfactorias como levadura de pan y productos esponjados con levadura, pero no para hojaldras y biscochos suficientemente esponjosos. Por el contrario, los trigos ingleses son "blandos" e Inglaterra tiene que importar mucha harina para su panificación. Es posible modificar o mejorar trigos duros introduciendo una enzima proteolítica, la cual degrada parte de la proteína; naturalmente no reduce el nitrógeno analizable, pero modifica el carácter del gluten para hacerlo más parecido al de las harinas blandas. El efecto puede considerarse como una menor tenacidad de la masa panificable y un considerable mejoramiento en los productos de repostería.

C) *APRESTO DE TEJIDOS.* Aunque la seda natural es de naturaleza proteínica, está revestida por una película, también proteica, semisoluble que puede complicar las operaciones de hilado y tejido; tal dificultad desaparece haciéndola pasar por una solución de enzima proteolítica que no solo facilita el proceso de manufactura, sino que confiere al tejido final una mejor calidad. Asimismo, la seda y otras fibras están engomadas con gelatinas o cola en diversas fases de su elaboración y su desengomado, previo a su comercialización, la facilitan estas enzimas. Aquellas que se venden con este fin, poseen una actividad óptima a unos 50°C y pH neutro, en contraste con las empleadas en el curtido de pieles, que deben tolerar las condiciones de pH elevado por los restos de cal.

D) *PRUEBA DE ENFRIAMIENTO DE CERVEZA.* Hoy en día son de gran popularidad las cervezas claras y brillantes, las cuales retienen estas cualidades incluso después de un almacenamiento prolongado en las inmediaciones del punto de congelación. Una de las causas de su turbidez ocasional es la precipitación parcial de proteína, lo cual puede evitarse añadiendo una pequeña cantidad de enzima proteolítica, si bien a costa de algún daño en el aterciopelado de la cerveza, a esta cualidad contribuyen en gran parte proteínas y polipéptidos solubles.

E) *EXTRACCIÓN DE ACEITES A PARTIR DE RESIDUOS DE PESCADO.* La degradación parcial de los tejidos de pescado permite liberar más fácilmente el aceite, circunstancia que puede aplicarse con efecto particular y justificación económica en la extracción de aceites ricos en vitaminas a partir de hígados de pescado; el proceso puede llevarse a cabo entonces más rápidamente y a temperatura más baja, con mejor rendimiento y contenido vitamínico más elevado. Incluso es ventajoso con restos de pescados vastos, pues resulta un aceite de mejor calidad siendo el líquido más fácil de evaporar.

F) LIMPIEZA Y LAVADO DE ROPA. Actualmente se hace uso de preparados enzimáticos para quitar manchas de alimentos en la ropa antes de la limpieza en seco, y también para degradar los residuos de sangre y exudados purulentos en sábanas de hospitales antes de su lavado.

G) RECUPERACIÓN DE PLATA EN RECORTES DE PELÍCULA FOTOGRÁFICA. Las proteasas pueden emplearse para licuar la gelatina en recortes de películas fotográficas, destruyendo sus propiedades coloidales y permitiendo así recuperar fácilmente las sales de plata.

H) ABLANDAMIENTO DE CARNE. Se han llevado a cabo numerosos intentos con el fin de aplicar papaína y otras proteasas para ablandar las fibras más correas de la carne; de esta manera se espera que, por ejemplo, la carne de vaca "dura" pueda transformarse en tierna, cuyo valor comercial es superior. Entre los métodos propuestos están el tratamiento superficial, la inyección arterial e intramuscular y, más recientemente, la inmersión del corte liofilizado en una solución enzimática diluida. En general, la dificultad consiste en evitar una acción local excesiva mientras se mantiene el tratamiento eficaz en los tejidos profundos, ya que la velocidad de difusión de enzimas con elevado peso molecular es inevitablemente muy pequeña. Por esta razón, parece que sólo pueden obtenerse resultados satisfactorios con tejido liofilizado o muy finamente desmenuzado.

CAPÍTULO 2. LA BROMELINA

Desde fines del siglo pasado se supo que el jugo de la piña presentaba actividad proteolítica, más tarde se comprobó que tal actividad era causada por una enzima a la que se le denominó *bromelina*, debido a que se encontraba presente en todas las plantas de la familia de las bromeliáceas. Chittenden⁽¹¹⁾ 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. Desde entonces, se han hecho numerosos intentos por rescatar la proteasa de diversas partes de estas plantas.

Fue hasta 1941 cuando Balls, Thompson y Kies en su artículo "Bromelin Properties and Comercial Produccion"⁽²⁾, sugirieron 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, creyeron que era conveniente usar como materia prima desperdicio industrial. Sin embargo, ellos consideraron que la mayor desventaja era tal vez la cantidad de enzima presente en el jugo, ya que era pequeña.

En 1959, J. Ahuja⁽¹⁾ 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 que aquel que no tenga aceptación comercial. Por otra parte, al trabajar 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 tercer mes, para que en el cuarto mes nuevamente aumentara, mes en el cual termina de madurar la piña.

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; no obstante, de esta manera el producto se obtiene 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 presente en el jugo.

En 1957 Heinicke y Gortner⁽¹⁹⁾ 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 se descarto; 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 pudo recuperarse por destilación del sobrenadante. El uso de acetona proporcionó resultados en los extractos enzimáticos aceptablemente buenos, no así la cantidad obtenida, la cual por ser muy pequeña hacía que el proceso de recuperación fuera incosteable.

En 1965 Gortner y Singleton⁽¹⁷⁾ estudiaron la relación entre la actividad proteolítica en pulpa y la edad del fruto, encontrando que los primeros días después de que aparece la fruta, no hay actividad, pero conforme el fruto se desarrolla la actividad va aumentando; pero en las últimas dos semanas a la que se denomina "período final de maduración" del período de maduración (la cual alcanza 120 días después de que aparece el fruto), la actividad disminuye.

Gortner y Singleton explican que la disminución en la actividad en tal período puede deberse a la transformación de la bromelina en otra proteína con diferente papel metabólico, como por ejemplo productora de sabor.

En 1975 se desarrolló una tesis profesional en donde se obtiene a la bromelina a partir del desperdicio de las plantas empacadoras de piña⁽³²⁾.

Han sido numerosos los estudios y variantes que se le han hecho a los procesos tradicionales para la obtención de bromelina; todos con el objeto de obtener los mejores rendimientos; algunas de estas variantes han llegado a patentarse como en los siguientes casos:

* En 1891 Marcano (Bull, Pharm.) y en 1892 Chittenden (Trans. Conn. Acad. Sci), fueron los primeros en aislar el fruto bromelino⁽²⁸⁾.

* En 1953 Murachi y otros colaboradores (Biochemistry) y Ota, descubrieron que el tallo de la piña tiene un peso molecular cercano a 33 000 siendo probablemente la primera enzima proteolítica de origen vegetal establecida como una glucoproteína⁽²⁸⁾.

* En 1960 Gibian y Bratfisch (To Schering AG) purificaron la preparación cruda⁽²⁸⁾.

* En 1961 Heinicke (Science), Patentó la obtención de bromelina a partir del jugo de piña por precipitación con acetona y también con sulfato de amonio. El mismo descubrió bromelina en el tejido del tallo de la piña⁽²⁸⁾.

* En 1972 M. Funatsu y otros (Kodansha, Tokio, Wiley, New York), patentaron la estructura y función del tallo bromelino⁽²⁸⁾.

* En 1972 Pinnan Soong, Lane Ta-Tung Road, Tainan, Taiwan, Kiangsu, China. Patentaron un proceso práctico y económico para incrementar la producción, la pureza y la actividad de la *bromelina* del tallo de la piña, comprimiendo y extrayendo el jugo del tallo tratado a bajas temperaturas, precipitando la *bromelina* fraccionadamente del jugo clarificado con componentes orgánicos, liberando la *bromelina* precipitada con compuestos de oxígeno enfriados⁽²⁸⁾.

* En 1993 Baldini, Vera Lucia Signoreli; Iaderoza, Marilene; Ferreira, Ercilia A. Henriques; Sales Arlindo, Moreira; Draetta, Lacy dos Santos; Giacomelli, Eloys J. (Brazil). Colet. Insti. Tecnol. Aliment (Campinas, Braz.); encontraron el contenido de *bromelina* en 16 cultivos de piña, siendo la típica variedad de las *Ananas bracteatus* la de mayor recurso potencial de *bromelina*; la *Ananas comosus* tuvo muy baja actividad proteolítica⁽²⁸⁾.

* En 1993 Ievleva, Elena V.; Zamacheva, Alla V.; Mosolov Vladimir V.; Khuan, Fung Khoa; Nyan, Vo Khong (Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, U.S.S.R.; Institute of Experimental Biology), patentaron un método de preparación de *bromelina*, en donde el jugo bromelino se obtuvo sin el uso de disolventes orgánicos; extrayéndola de la piña con agua o $\text{NaHCO}_3\text{-NH}_3$ 0.03M (0.5-1.5:2)⁽²⁸⁾.

* En 1993 Huang Zhoulie; Lin, Shaoxiang; Li, Mingki (Dep. Agric. Biol South China Agric. Univ., Guangzhou, Peop. Rep China), Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing.

Patentaron una mejora tecnológica para la producción de bromelina; los resultados indican que el uso adecuado de ácido tánico concentrado de 0.08-0.1% influye en la calidad y rendimiento. Enfriando la torta de la enzima abajo de -12°C y secando la torta por medio de una desecación a vacío incrementa la actividad enzimática⁽²⁸⁾.

Se encontró que 1000 $\mu\text{g/g}$ de hiposulfito de sodio más 62.5 $\mu\text{g/g}$ de cisteína fueron un protector efectivo e incrementaron la actividad en un 32.57%. La actividad y calidad de la enzima compleja, efectivamente mejoró por lavado con una solución de ácido ascórbico, EDTA, NaCl, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ ⁽²⁸⁾.

* En 1994 He, Tejian; Gao, Kongrong; Peng, Zhiying (Dep. Food Eng., South China Univ. Technol., Guangzhou, Peop. Rep. China) patentaron el estudio sobre el tallo cultivado y bromelina en el tallo *callus* de las *Ananas sativus*⁽²⁸⁾.

CAPITULO 3. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA QUE SE BUSCA " BROMELINA "

3.1. CARACTERÍSTICAS

Se desea más que una enzima proteolítica, catálisis e hidrólisis de sustrato proteínico así como una fuente de sustratos sintéticos.

La caseína se usa comúnmente como un sustrato proteínico y el ensayo se realiza con una mezcla, aumentando la cantidad de ácido tricloroacético, la solubilidad de los péptidos está en función del tiempo. El método tiene varias modificaciones para emplearse.

A diferencia del tallo bromelino la enzima de la fruta es una proteína ácida. La enzima de la fruta también contiene carbohidrato que no puede ser removido por procedimientos de purificación. El fruto bromelino es inhibido por sales mercuriales y la actividad es reestablecida por la cisteína⁽³⁰⁾.

3.2. PROPIEDADES

3.2.1. PESO MOLECULAR

Murachi y colaboradores⁽³¹⁾ reportaron en 1964 que por ultracentrifugación puede purificarse la bromelina, obteniéndola como un componente de mayor actividad proteolítica de peso molecular aproximado a 33,000. Ota y colaboradores⁽³³⁾ en 1964, reportaron un peso molecular de la bromelina de 33,000, obtenido mediante un análisis cuantitativo del grupo N-terminal.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Feinstein y Whitaker⁽¹⁵⁾, también en 1964, reportaron los pesos moleculares de cinco componentes de la bromelina comprendidos en un rango de 18,000 a 22,000 los cuales difieren del peso molecular de 33,000, reportado por Murachi y 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.

3.2.2. SITIO ACTIVO

La bromelina al igual que otras proteasas tales como la papaína y ficina, dependen del grupo tiol de un residuo de cisteína para su actividad enzimática. Husain y Lowe⁽²⁰⁾ en 1970 estudiaron la secuencia de aminoácidos alrededor de cisteína e histidina en el sitio activo en bromelina, papaína y ficina, encontrándolas muy semejantes.

3.2.3. GRUPO PROSTÉTICO

A diferencia de la papaína y ficina, la bromelina es una glucoproteína que contiene un grupo prostético carbohidratado. Yasuda, Takahashi y Murachi⁽⁵⁰⁾, en 1970 reportaron su estructura y composición.

3.2.4. ESTABILIDAD

Caldwell⁽⁵⁾ en 1905 reportó la presencia de 2 enzimas proteolíticas en el jugo de la piña, una de ellas activa en medio alcalino, algo más resistente a agentes tóxicos y en cantidad 2 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⁽¹⁹⁾ estudiando diversas formas de conservar la bromelina, reportaron su destrucción a las temperaturas comunes de pasteurización de 75° a 80°C.

Sin embargo, Balls, Thompson y Kies⁽²⁾ 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 se calienta cuando el medio es alcalino y hay desnaturalización, ésta es parcialmente reversible; lo cual 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⁽²⁹⁾, reportó que el jugo de piña puede conservarse en refrigeración sin perder actividad proteolítica indefinidamente si se adiciona con benzoato al 0.2%.

3.2.5. AUTODIGESTIÓN

En preparaciones frescas de enzimas 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 se han digerido, se inicia la autodigestión, la cual es más lenta. por lo tanto una preparación de bromelina en solución, mientras más pura esté, más rápidamente se presentará la autodigestión cuando las condiciones las favorezcan⁽⁵⁾.

3.2.6. ACTIVIDAD SINTÉTICA

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⁽³⁾.

3.2.7. 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.

Greenberg y Winnick⁽¹⁸⁾ en 1940 reportaron el uso de cisteína, cianuro de sodio y ácido sulfhídrico como activadores para bromelina. En la Tabla 11, se reporta la variación en la actividad de la bromelina al emplear diferentes activadores e inhibidores⁽⁴²⁾.

TABLA 11. ACTIVACION ~ INHIBICIÓN DE BROMELINA

INHIBIDOR	ACTIVADOR	ACTIVIDAD
Ninguno	0.06 M cisteína	2.28
Ninguno	0.03 M cisteína	2.04-2.16
Ninguno	0.1 M NaCN	2.15
Ninguno	0.1 M H ₂ S	1.18-1.25
Ninguno	0.5 M Na ₂ S	1.10
0.003 M H ₂ O ₂	Ninguno	1.04
0.003 M H ₂ O ₂	0.1 M NaCN	0.84
0.01 M K ₃ Fe(CN) ₆	Ninguno	0.60
0.01 M K ₃ Fe(CN) ₆	0.1 M NaCN	1.90
0.001 M KMnO ₄	Ninguno	0.16
0.001 M KMnO ₄	0.1 M NaCN	1.18
0.001 M I ₂	Ninguno	0.00
0.001 M I ₂	0.03 M cisteína	0.26
0.02 M ácido iodoacético	Ninguno	0.01
0.02 M ácido iodoacético	0.1 M NaCN	0.00
0.03 M ácido Maléico	Ninguno	1.08
0.03 M ácido Maléico	0.1 M NaCN	2.18
5 Mg Cu ₂ O	Ninguno	0.08
5 Mg Cu ₂ O	0.1 M H ₂ S	0.18
0.01 N Ag ⁺ o Hg ⁺⁺	Ninguno	0.00-0.02
1x10 ⁻⁴ N Ag ⁺	Ninguno	0.22
2x10 ⁻⁵ N Ag ⁺	Ninguno	0.62
0.67x10 ⁻⁵ N Ag ⁺	Ninguno	0.82
0.01 N Ag ⁺	0.1 M H ₂ S	0.01-0.04
0.01 N Ag ⁺	0.5 M Na ₂ S	0.50
0.01 N Ag ⁺	0.1 M NaCN	1.76-190
0.001 N Ag ⁺ o Hg ⁺⁺	0.1 M H ₂ S	1.26-1.28
0.001 N Ag ⁺	0.1 M NaCN	2.12

PARTE 3

MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

CAPÍTULO 1. MÉTODOS TRADICIONALES DE PRODUCCIÓN DE BROMELINA

1.1. MEDIANTE EL MICROORGANISMO *BACILLUS SUBTILIS*⁽²⁴⁾

El *Bacillus subtilis*, es una bacteria que se caracteriza por producir proteasas neutras y alcalinas; son bacilos delgados, largos, móviles, Gram positivos, que miden 0.8 por 2-5 micras y aparecen aislados o en cadenas, la temperatura óptima para su crecimiento es de 30 a 37°C, el pH óptimo es de 6-7.5, variedad ATTC 6071, crece bien en la mayoría de los medios nutritivos bacterianos usuales.

1.1.1. EQUIPO UTILIZADO

1.1.1.1. FERMENTADOR

Fermentador compacto a escala utilizado para cultivo de microorganismos en fermentaciones intermitentes y continuas. La (las) fermentación (es) se efectúa en jarras de paredes gruesas con el objeto de que resistan las temperaturas de esterilización. Consta de una placa estándar adecuada para las diferentes medidas de la jarra (5, 7 y 14 litros), para eliminar una posible contaminación. Los vasos del fermentador tienen dos flechas impulsoras acopladas magnéticamente.

La agitación se realiza por medio de impulsores con agitadores planos y cuatro baffles verticales. El medio de cultivo es agitado en dirección radial lográndose la dispersión uniforme de los constituyentes.

La velocidad de agitación se regula por medio de un sistema de retroalimentación electrónica para fluctuaciones normales de voltaje y cambios de viscosidad en el medio de cultivo, esta agitación se calibra por medio de un tacómetro que determina la agitación deseada.

1.1.1.2. INCUBADORA CON AGITACIÓN

En esta incubadora se pueden combinar el crecimiento de cultivos estáticos y agitados bajo las mismas condiciones de temperatura y medio ambiente. La velocidad de agitación se controla eléctricamente y se mantiene con una variación despreciable. Una vez fijada la velocidad, esta permanece constante despreciando la variación de voltaje.

1.1.2. MEDIO DE MANTENIMIENTO

Agar nutritivo para conservación (Fisher) 20.0 g/l. El pH se ajusta a 7.0 antes de esterilizarse siendo esta temperatura de 121°C durante 15 minutos. Se conserva en refrigeración a 4°C.

1.1.3. MEDIO DE CRECIMIENTO

Dextrosa	2 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
Peptona	2 g/l
Fosfato de potasio monobásico	1 g/l
Fosfato de potasio dibásico	3 g/l
Sulfato de magnesio	0.1 g/l
Cloruro de calcio	0.2 g/l
Agua destilada	1000 ml

El medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos ajustándose el pH a 7 antes de esterilizarse y enfriándose a 37°C antes de inocular.

1.1.4. MEDIOS DE INDUCCIÓN

MEDIO No. 1

Extracto de levadura	2 g/l
Caseína	10 g/l
Fosfato de potasio monobásico	1 g/l
Fosfato de potasio dibásico	3 g/l
Sulfato de magnesio	0.1 g/l
Cloruro de calcio	0.2 g/l
Glucosa	20 g/l
Agua destilada.	1000 ml

MEDIO No. 2

Extracto de levadura	2 g/l
Harina de soya	10 g/l
Fosfato de potasio monobásico	1 g/l
Fosfato de potasio dibásico	3 g/l
Sulfato de magnesio	0.1 g/l
Cloruro de calcio	0.2 g/l
Glucosa	20 g/l
Agua destilada	1000 ml

MEDIO No. 3

Extracto de levadura	2 g/l
Harina de soya	10 g/l
Fosfato de potasio monobásico	1 g/l
Fosfato de potasio dibásico	3 g/l
Sulfato de magnesio	0.1 g/l
Cloruro de calcio	0.2 g/l
Agua destilada	1000 ml

Estos tres medios se esterilizan a 121°C durante 15 minutos, ajustándose el pH a 7.0 antes de esterilizarse.

1.1.5. INDUCCIÓN DE LA PROTEASA BROMELINA

En esta etapa la finalidad es la de orientar al microorganismo a que produzca la enzima deseada, para lo cual se va variando gradualmente la fuente de nitrógeno (sustrato) evitando así la escasa producción de bromelina o la inhibición total de la misma por un cambio brusco.

Para conocer el medio en el cual la obtención de la bromelina es el adecuado se usan los tres medios diferentes mencionados. Se preparan los tres medios ajustándose el pH a 7.0, esterilizando durante 15 minutos a 121°C y enfriando a 37°C.

Cada uno de los tres medios nutritivos se inoculan con el medio de crecimiento y se ponen a incubar a 37°C y a una velocidad de agitación de 200 rpm durante 24 hs, al término de éstas se hacen las observaciones de control de pureza y las determinaciones de actividad para seguir el proceso de adaptación al nuevo sustrato.

Una vez que al microorganismo se le ha cambiado por completo el sustrato se selecciona el medio conveniente desarrollándose otras dos fermentaciones con este medio para que se alcance la adaptación completa y no se presenten problemas en la obtención de la enzima en la fase final de este estudio.

1.1.6. OBTENCIÓN DE LA PROTEASA BROMELINA

La obtención de la proteasa, se efectúa en un fermentador de acero inoxidable. Se preparan 3 l del medio seleccionado, se agregan 0.5 ml de antiespumante. Se utiliza la jarra de fermentación de 5 l la cual cierra herméticamente, se esteriliza y se enfria hasta alcanzar una temperatura de 37°C. Se monta la jarra en el aparato de fermentación y se conectan entradas y salidas de aire, agua y control de temperatura.

Terminada ésta operación, se inocula el medio con 300 ml del pie de cuba en condiciones asépticas y se pone en marcha el aparato y sus controles para dar principio a la fermentación. Durante el proceso se toman muestras cada hora para determinar la actividad siguiendo las técnicas indicadas.

Al término de las 24 hs se detiene la fermentación y el caldo se enfría a 0-5°C, se filtra a través de fibra de vidrio, al filtrado se le agregan 3 volúmenes de acetona fría (0°C); la operación es lenta y con agitación. Se centrifuga obteniendo una mezcla de enzima bromelina en forma de un precipitado blanco, el cual se suspende en una solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 7.0.

1.2. MEDIANTE LA PRECIPITACIÓN DEL JUGO DE LA PIÑA⁽⁴²⁾

Balls, Thompson y Kies, en base a la fase experimental, recomendaron la preparación de bromelina del tercer filtrado del jugo comprimido. En este método la bromelina es precipitada con alcohol, el alcohol se recupera, y el jugo residual debido a su gran contenido de azúcar se utiliza en la fermentación alcohólica usual.

1.2.1. OBTENCIÓN DE BROMELINA DEL FRUTO FRESCO DE LA PIÑA

Tres litros de jugo fresco se filtran y el pH se ajusta a 6.0 con sulfato de amonio. Se adiciona sulfato de amonio hasta saturar. La enzima cruda precipitada se filtra y lava con sulfato de amonio 0.6 M. El precipitado se disuelve en un litro de cianuro de sodio 0.02 M (pH 6.0) y la solución nuevamente se satura con sulfato de amonio. El drenado del precipitado de nuevo se precipita y redisuelve en 600 ml de cianuro de sodio 0.02 M. Finalmente, la enzima se precipita con tres volúmenes de acetona. Esta se colecta y seca al vacío. El rendimiento es de 5 gramos de enzima casi incolora⁽⁴²⁾.

CAPÍTULO 2. FASE EXPERIMENTAL DE UNA NUEVA METODOLOGÍA

2.1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

Una de las finalidades de este trabajo de investigación es, que además de obtener los máximos rendimientos en la obtención de la enzima bromelina, aprovechar al máximo todo el desperdicio proveniente de la industrialización de la piña cuya cantidad es significativa, pues está comprobado que aproximadamente el 45%⁽⁷⁾ de ésta se considera desperdicio (cáscara y tocón); por ello, se tiene la necesidad de darle un uso provechoso a todo este desperdicio, obteniendo de él " bromelina ". Por obtenerse a nivel laboratorio, no se intentó obtener la materia prima de las industrias procesadoras de piña; pero si se tomó la precaución de tener las mismas condiciones en las cuales la materia prima principal se obtendría. Cabe mencionar que se realizaron tres corridas en las cuales las variantes fueron las siguientes:

- a) Extracción únicamente de la cáscara
- b) Extracción únicamente del tocón
- c) Extracción de cáscara y tocón juntos

En las tres corridas se usó etanol al 97% como medio de extracción y ácido pirogálico como agente precipitador para después liberar la enzima con etanol.

Cada una de las variantes se trató bajo las mismas condiciones de congelación y pulverización criogénica, habiéndose desarrollado de la siguiente manera:

Se pesaron cada una de las piñas utilizadas con el objeto de determinar la cantidad considerada como desperdicio (únicamente la cáscara y tocón sin incluir la cantidad de jugo que se obtiene al realizar los cortes de la piña).

En cuanto al manejo de la cáscara de la piña, se pesaron 1000 g de ésta, se picaron en cuadros de aproximadamente 0.5 cm, se colocaron en un recipiente de unicel el cual contenía nitrógeno líquido. Aproximadamente 5 minutos después la cáscara se encontraba completamente solidificada y a una temperatura de aproximadamente -160°C ; inmediatamente después se procedió a la pulverización en una licuadora casera con vaso de aluminio, el pulverizado se introdujo en un vaso de precipitado el cual contenía 600 ml de etanol enfriado a -90°C , se agitó durante 2 hs y al finalizar este tiempo la mezcla se mantuvo en reposo por un periodo de 18 hs procediendo después a una filtración a vacío, obteniendo un volumen de filtrado de 1000 ml (correspondiendo 600 ml, al etanol enfriado y los 400 ml restantes corresponden al jugo que se obtuvo de la cáscara), con un $\text{pH} = 5.5$. A este filtrado se le agregó el 0.05 % (en base al peso de la cáscara empleada) de ácido pirogálico, se agitó aproximadamente 1 h, se dejó sedimentar y posteriormente se filtro a vacío (el filtrado obtenido fue un poco más claro que el primero), al filtrado resultante se adicionó un 1 % más de ácido pirogálico, se agitó hasta haberse disuelto éste por completo y se le bajó la temperatura hasta -45°C (obteniendo a esta temperatura una nieve de color hueso), para finalmente precipitar la enzima con 1000 ml de etanol enfriado a -80°C , teniendo una temperatura de mezcla igual a -50°C , se agitó vigorosamente durante 15 minutos y se procedió nuevamente a la filtración a vacío hasta obtener una torta seca de color casi blanco, la cual se hizo polvo con ayuda de un mortero.

En cuanto al manejo del tocón y cáscara-tocón el procedimiento fue exactamente el mismo a excepción de la cantidad de materia prima principalmente utilizada; pues el peso manejado fue de 342 g y 790 g respectivamente.

Debe mencionarse que para seleccionar el volumen adecuado de etanol para precipitar la enzima, se recurrió al estudio de un trabajo encontrado para la " obtención de bromelina a partir del desperdicio de la piña⁽³²⁾ ", encontrando que la cantidad de etanol que brinda los mejores rendimientos y calidad es tres veces y media considerando la cantidad de jugo de piña con el que se trabaja. Por otra parte debe aclararse que aunque existen estudios en que obtienen la enzima a partir de desperdicios de piña, en este trabajo las condiciones en las que se trabajó fueron totalmente diferentes empezando por el hecho de que en éste, la materia prima se congela y pulveriza con el objeto de no trabajar únicamente con el jugo obtenido de la materia prima, sino también con el tejido fibroso.

Al producto seco obtenido se le determinó su actividad específica de la siguiente manera:

2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

REACTIVOS

Caseína 1.2 g/dl: formada por 3 g de caseína grado reactivo en 250 ml de regulador de fosfato de potasio 0.03 M, pH 7.5, por calentamiento en un baño de agua hirviendo por 15 minutos. El pH final es 7.2.

L-Cisteína 0.15 M preparada recientemente.

Solución de ácido tricloroacético: formado por 4.5 g de ácido tricloroacético, 7.5 g de acetato de sodio y con la adición de 9.75 ml de ácido acético glacial y agua hasta un volumen final de 250 ml.

Enzima: La concentración de la solución enzimática fué mayor de 20 µg/ml y menor que 110 µg/ml.

El método usado se basó en la digestión de la caseína, reportada por Northop y Kunitz con el uso de activadores y quelantes reportado por Minami, Doi y Hata⁽³⁵⁾.

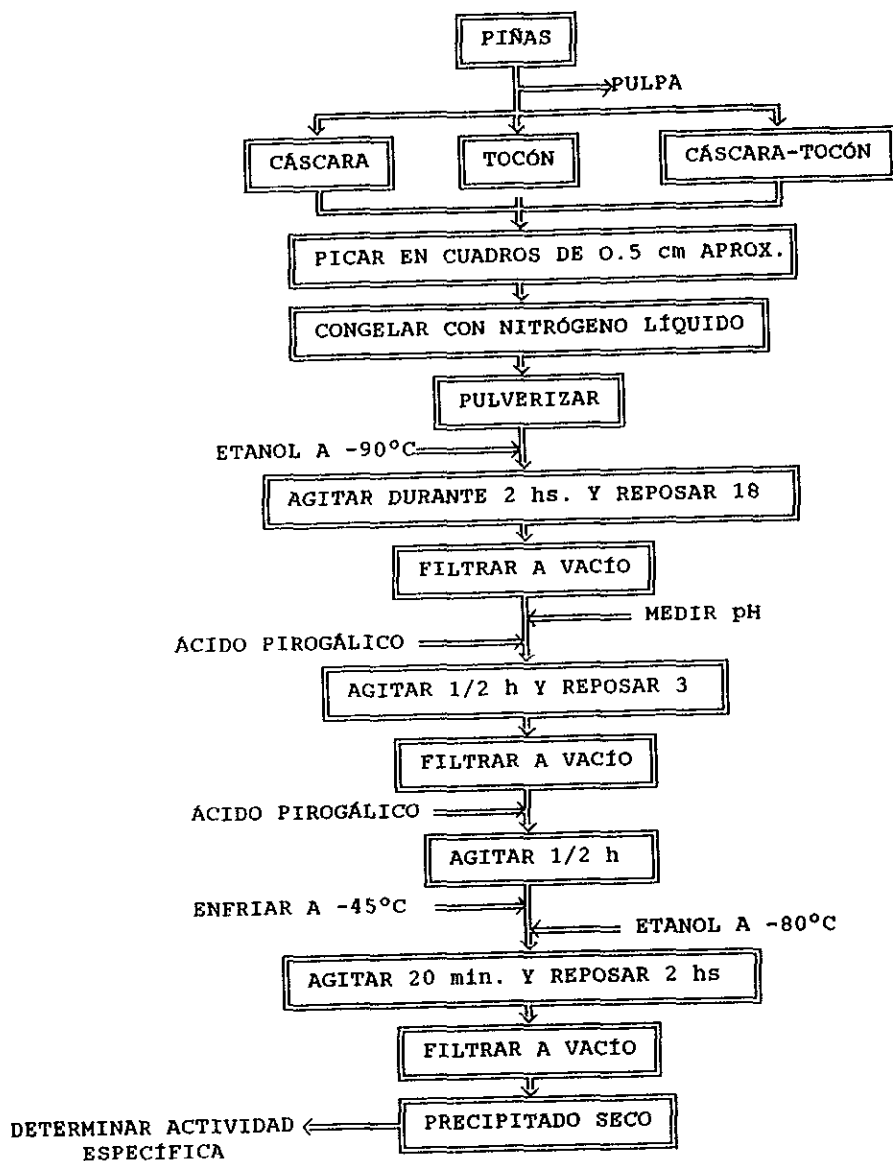
En un tubo de ensaye de 1.8 x 18 cm se colocaron 5 ml de la solución de caseína y 0.2 ml de cisteína, adicionando agua y enzima para dar un volumen de 6 ml. Después de incubar a 35°C por 10 minutos, se adicionaron rápidamente 5 ml de la solución de ácido tricloroacético agitando la mezcla perfectamente y dejándola reposar por 30 minutos a 35°C. El precipitado formado se removió por filtración y al filtrado se le leyó la absorbancia a 275 nm en contraste con el testigo.

La actividad específica se define como la cantidad de enzima que da un incremento en la absorbancia a 275 nm equivalente a 1 µg de tirosina por minuto a pH = 7.2 y a 35°C. La actividad específica se expresa como unidades de enzima por miligramo de proteína⁽³⁵⁾.

2.3. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO

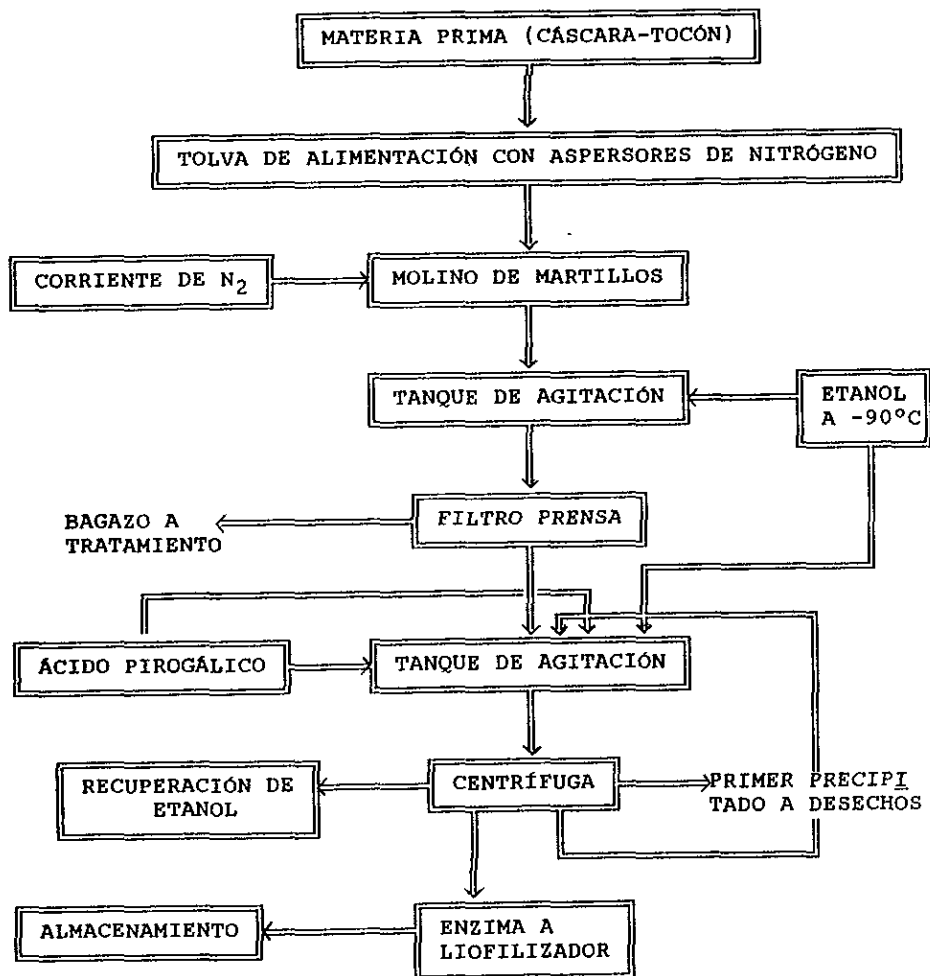
En el siguiente Diagrama, se muestra esquemáticamente el procedimiento de obtención de bromelina en el laboratorio.

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE BROMELINA EN EL LABORATORIO



CAPÍTULO 3. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PROCESO CRIOGÉNICO A NIVEL PLANTA PILOTO

3.1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE BROMELINA



3.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

El proceso es de tipo batch y está diseñado para producir un kilogramo de bromelina al día, trabajando 5 días a la semana. El procedimiento es el siguiente:

La materia prima (desperdicios de la industrialización de la piña) se recibe a granel cada tercer día en un recipiente de almacenamiento atmosférico (FB-110), una parte se introduce inmediatamente a una balanza aditiva del tipo por lotes; registrada la cantidad de materia prima a trabajar, ésta se introduce manualmente por cubetas a la tolva de alimentación (FA-110) de la banda articulada, congelando ésta por medio de una corriente de nitrógeno líquido aplicada por *aspersores conforme* la materia prima pasa a la banda articulada (JT-110), manteniéndose una temperatura de -160°C . La cáscara y el tocón totalmente congelados entran al molino de martillos (CM-110) y se pulverizan por impactos repetidos contra los martillos rotatorios el tiempo necesario hasta ser reducidos a un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño para pasar a través de un número de malla 150 (diámetro de partícula 0.1 mm); durante el proceso de molienda se asperja nitrógeno líquido con el objeto de mantener la materia prima a una temperatura de -160°C evitándo con esto que la materia absorba humedad (y no obtener el tamaño de partícula deseado); esto por un lado, y por el otro, que por lo mismo quede adherida a las paredes y martillos del molino lo cual provocaría pérdidas considerables. Ya pulverizada la materia prima, se transporta en un recipiente móvil previamente enfriado con una corriente de nitrógeno (para evitar que el pulverizado se descongele y quede adherido a las paredes) al tanque con agitación (MA-110), el cual es previamente alimentado del (FA-111) con una carga de etanol a -90°C .

La razón de cargar primero el etanol y adicionar después el pulverizado, es con el objeto de permitir una mayor superficie de contacto entre el pulverizado y el disolvente extractor; el tiempo de agitación será de 2 horas.

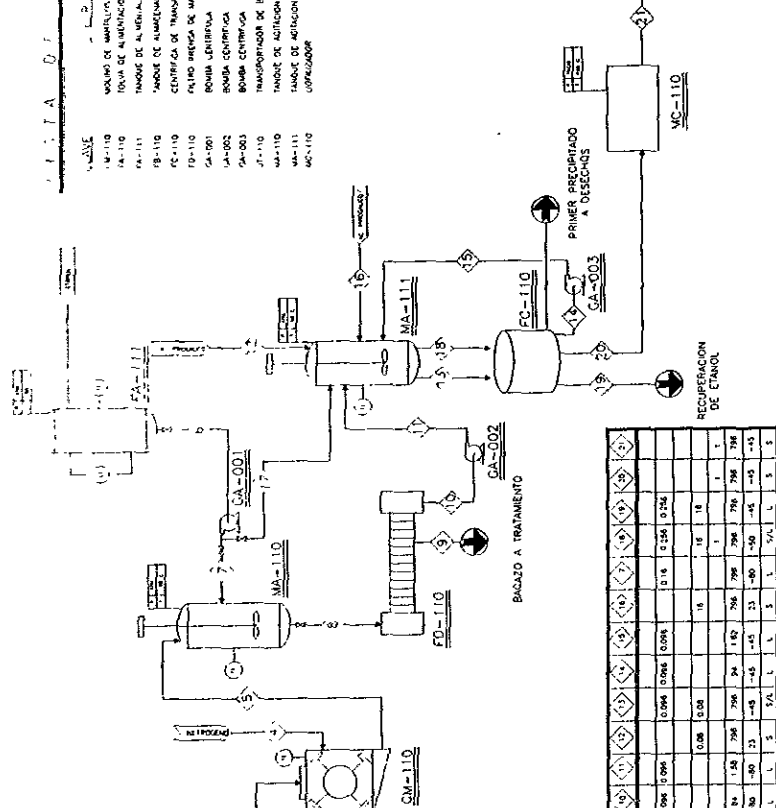
Transcurrido ese tiempo la agitación se suspende y la mezcla permanece en reposo durante un período de 18 horas a una temperatura de -90°C ; agotado el tiempo, la mezcla se descarga por gravedad hacia el filtro prensa de placas y marcos (FD-110); aquí el bagazo se colecta y se le da un tratamiento especial para servir posteriormente como alimento para ganado. El líquido, se bombea por medio de la bomba centrífuga (GA-002) hacia un segundo tanque con agitación (MA-111) y se le adiciona una cantidad de ácido pirogálico correspondiente al 0.05% en base al peso de la cáscara y tocón que se está procesando, la agitación dura 30 minutos y se deja reposar 3 horas manteniendo una temperatura de -45°C , transcurrido este tiempo la mezcla cae por gravedad hacia la centrífuga de transportador helicoidal (FC-110), manteniéndose aquí una temperatura de -45°C . Media hora después el precipitado sedimentado se desecha y el filtrado se bombea por medio de la bomba centrífuga (GA-003) hacia el tanque con agitación (MA-111), otra vez se adiciona ácido pirogálico (ahora 1% en base a la materia prima procesada), se agita 20 minutos manteniéndose el filtrado a -50°C .

Posteriormente, se bombea hacia el (MA-111) por medio de la bomba centrífuga (GA-001) etanol enfriado a -80°C del tanque de alimentación (FA-111), reanudando la agitación por 20 minutos más y al final de la cual ésta se suspende quedando la mezcla en reposo durante 2 horas y manteniendo la temperatura a -50°C .

Transcurridas las 2 horas la mezcla nuevamente cae por gravedad hacia la centrifuga de transportador helicoidal (FC-110) (este equipo se limpia inmediatamente despues de finalizada la primera centrifugación), manteniéndose aquí una temperatura de -45°C ; siendo el tiempo de residencia en este equipo, de aproximadamente 1 hora. El filtrado se manda a una torre de destilación para así recuperar el disolvente (etanol), y finalmente la torta formada se liofiliza en el (MC-110), obteniendo así un polvo completamente seco y blanco característico de la *bromelina*, el cual será recolectado.

LISTA DE EQUIPOS

- UNIDAD DE ALIMENTACION**
 UN-110: MÓDULO DE ALIMENTACIÓN DE ALTA PRESIÓN
 UA-110: TUBO DE ALIMENTACION
UNIDAD DE RECUPERACION DE ETANOL
 FB-110: TANQUE DE ALMACENAMIENTO DE ETANOL
 FC-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 FD-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
UNIDAD DE TRATAMIENTO
 FA-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 GM-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 GA-001: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 GA-002: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 GA-003: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
UNIDAD DE RECUPERACION DE ETANOL
 MA-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
 MB-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL
UNIDAD DE RECUPERACION DE ETANOL
 MC-110: TANQUE DE RECUPERACION DE ETANOL



CONDICION	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD
CONCENTRACION	ETANOL (%)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	
CONDICION	ETANOL (kg)	100		100		100		100		100		100		100		100	

F. S. ZAPACOA
INGENIERO
TESIS PROFESIONAL
 RECONSTRUCCION DE LA INDUSTRIA DE BROMELINA
 TITULO DE INGENIERO
 N.º DE IDENTIFICACION: 1308

D. BLOQUE DE REFERENCIA A
 REVISION
 DISEÑADOR
 N.º DE IDENTIFICACION: 1308

3.4. LISTADO DE EQUIPO

3.4.1. RECIPIENTE DE ALMACENAMIENTO ATMOSFÉRICO (FB-110)

Cantidad requerida: 1

Servicio: Almacenamiento de la materia prima

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 450 kg

Producto: Cáscara y tocón de la pija

Presión de operación: Atmosférica

Temperatura de operación: Ambiental

CONSTRUCCIÓN

Volúmen: 1.57 m³

Longitud: 2 m

Diámetro: 1 m

Orientación: Eje vertical

Mecanismo de descarga: Transportador de sólidos

Tiempo de residencia: 3 días

MATERIALES

Cuerpo: Polímero o fibra de vidrio

3.4.2. ALIMENTADOR (FA-110)

Cantidad requerida: 1

Servicio: Alimentador para la banda transportadora

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 160 kg

Producto: Cáscara y tocón de la piña

Presión de operación: Atmosférica

Temperatura de operación: -160°C

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Tolva de flujo de embudo con aspersores

Longitud: 0.5 m

Diámetro superior: 0.8 m

Diámetro inferior: 0.3 m

Tipo de flujo: Errático

MATERIALES

Cuerpo: (SA-240 TP 304); Acero inoxidable aleac, Cr-Ní
(0.08 % C, 8 % Ní, 18 % Cr)

aislante: Espuma de poliuretano

3.4.3. BANDA TRANSPORTADORA (JT-110)

Cantidad requerida: 1

Servicio: Transportador de la materia prima

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 160 kg/día

Producto: Cáscara y tocón de piña

Presión de operación: Atmosférica

Temperatura de operación: -160°C

Tamaño máximo del terrón: 25 cm

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Articulada con faldones y aspersores

Longitud: 3 m

Anchura de la paila: 1.07 m.

Anchura entre faldones: 1.02 m.

Velocidad de operación: 3 m/min.

MATERIALES

Rodillos: (SA-240 TP 304); Acero inoxidable aleac, Cr-Ní
(0.08 % C, 8 % Ní, 18 % Cr)

Banda: (SA-240 TP 304); Acero inoxidable aleac, Cr-Ní
(0.08 % C, 8 % Ní, 18 % Cr)

Cuerpo que cubre la banda: Aluminio

Aislante: Espuma de poliuretano

3.4.4. MOLINO DE MARTILLOS (CM-110)

Cantidad requerida: 1
Servicio: Pulverizador

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 160 kg
Producto: Cáscara y tocón de la piña
Presión de operación: Atmosférica
Temperatura de operación: -160°C

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Mikro pulverizer de alta velocidad con aspersores
Tamaño de quebrado: Trituración intermedia
Diámetro de partículas: 0.01 mm
Número de malla: 150
Diámetro de rotor: 20.32 cm
Velocidad máxima: 9600 rpm
Potencia: 4 Hp

MATERIALES

Martillos: (SA-240 TP 304); Acero inoxidable aleac, Cr-Ní
(0.08 % C, 8 % Ní, 18 % Cr)
Cuerpo: (SA-240 TP 304); Acero inoxidable aleac, Cr-Ní
(0.08 % C, 8 % Ní, 18 % Cr)
Aislante: Espuma de poliuretano

3.4.5. TANQUE DE ALIMENTACIÓN (FA-111)

Cantidad requerida: 1

Servicio: Alimentador para los tanques con agitación

CONDICIONES DE PROCESO

Capacidad de operación: 300 l

Producto: Etanol químicamente puro

Presión de operación: Atmosférica

Temperatura de operación máxima: -80°C

Temperatura de operación mínima: -90°C

CONSTRUCCIÓN

Tipo: recipiente vertical de alimentación

Longitud: 2.09 m.

Diámetro: 0.43 m.

Número de boquillas: 2

MATERIALES

Tapas y cuerpo del tanque: (SA-203-D) Acero al níquel (0.2 % C, 3.82 % Ni)

Aislante: Espuma de poliuretano

3.4.6. TANQUES CON AGITACIÓN (MA-110 Y MA-111)

Cantidad requerida: 2

Servicio: Mezclado uniforme

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 0.30 m³ ambos

Producto: Cáscara y tocón pulverizados - etanol (MA-110)

Jugo de la cáscara y tocón - etanol (MA-111)

Presión de operación: Atmosférica

Temperatura de operación: -90°C y -80°C respectivamente

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Mezcladora de propela de entrada superior

Orientación: Vertical

Diámetro: 0.76 m

Longitud: 0.57 m

Tiempo de residencia: 2 h y 0.5 h respectivamente

Velocidad de la hélice: 420 rpm y 350 rpm respectivamente

Diámetro de la hélice: 0.2 m

Potencia del motor: 1 Hp para ambos

MATERIALES

Cuerpo y agitador: (SA-203-D) Acero al níquel (0.2 % C,
3.82 % Ní)

Aislante: Espuma de poliuretano

3.4.7. FILTRO PRENSA (FD-110)

Cantidad: 1
Servicio: Separador

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 0.200 m³
Producto. Etanol-cáscara y tocón pulverizados
Fase continua: Líquido
Fase dispersa: Sólido
Presión de operación: Atmosférica
Temperatura de operación: -80°C
Tamaño de partícula: 0.1 mm

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Placas y marcos
Longitud: 1 m
Anchura: 0.34 m
Area nominal: 2.05 m²

MATERIAL

(SA-203-D) Acero al níquel (0.2 % C, 3.82 % Ní)

3.4.8. CENTRÍFUGA (FC-110)

Cantidad requerida: 1
Servicio: Separador

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 0.3 m³/h
Productos: Primera fase: Sólidos indeseables y etanol
Segunda fase: Bromelina y etanol
Fase continua: Líquido
Fase dispersa: Sólido
Presión de operación: Atmosférica
Temperatura de operación: -45°C

CONSTRUCCIÓN

Tipo: Transportador helicoidal
Longitud: 76.2 cm
Diámetro del tazón: 15.24 cm
Velocidad: 8000 rpm
Fuerza centrífuga máxima por gavedad: 5500 g
Potencia: 5 Hp

MATERIAL

Cuerpo: (SA-516-70) Acero al carbón grado fino (0.26 % C)
Aislante: Espuma de poliuretano

3.4.9. BOMBAS CENTRÍFUGAS (GA-001), (GA-002) Y (GA-003)

Cantidad requerida: 3

Servicio: Bombeo de líquidos y mezclas sólido - líquido

DATOS DE PROCESO

Capacidad de operación: 42.25 gpm, 41.2 gpm, 41.7 gpm
respectivamente

Tipo de bomba: Centrífugas de flujo axial y succión simple

Tipo de impulsor: Semiabierto, cerrado, semiabierto
respectivamente

Tipo de carcasa: Voluta en espiral

Temperatura de bombeo: -90°C, -80, -45 respectivamente

Presión de succión: 0.79 kg/cm², 0.83 kg/cm², 0.94 kg/cm²
respectivamente

Presión de descarga: 1.52 kg/cm², 1.58 kg/cm², 1.62 kg/cm²
respectivamente

presión diferencial: 0.73 kg/cm², 0.74 kg/cm², 0.68 kg/cm²
respectivamente

Potencia: 0.50 Hp, 0.25 Hp, 0.50 Hp respectivamente

MATERIALES

Carcasa: (SA-203-D) Acero al níquel (3.82 % Ni, 0.2 % C),
para GA-001 y GA-002; (SA-516-70) Acero al carbón
grado fino (0.26 % C), para GA-003

Cabeza de succión: Igual a carcasa

Impulsor: Igual a carcasa

Anillos de desgaste: Igual a carcasa

Difusores: Igual a carcasa

Flecha: Igual a carcasa

Camisa de flecha: Igual a carcasa

Prensa estopas y partes pequeñas: Igual a carcasa

Soporte de valeros: Fierro

Aislante: Espuma de poliuretano

PARTE 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE
RESULTADOS

Los siguientes resultados fueron los obtenidos a nivel laboratorio pudiendo considerarse a estos como representativos, ya que el tratamiento que se le dio al fruto fue una reproducción de las condiciones que existen en las industrias procesadoras de piña.

4.1. APROVECHAMIENTO DEL FRUTO DE LA PIÑA

En la Tabla 12, se encuentran plasmadas las determinaciones de laboratorio sobre el rendimiento de la piña.

TABLA 12. APROVECHAMIENTO DEL FRUTO DE PIÑA

	T A M A Ñ O		
	CHICA	MEDIANA	GRANDE
Peso medio (kg)	1.585	2.205	3.230
Corona (%)	16.970	12.970	9.121
Puntas (%)	6.255	6.325	8.195
Cáscaras (%)	17.765	18.920	16.665
Ojos (%)	8.250	8.345	9.325
Tocón (%)	9.270	7.960	8.730
Jugo escurrido (%)	5.055	3.990	5.985
Pulpa aprovechable (%)	36.435	41.490	41.975

De la Tabla anterior, se concluye que en promedio el 60 % del fruto de la piña se desperdicia.

4.2. CONTENIDO DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA

En la Tabla 13, se presentan los resultados obtenidos en este trabajo de investigación referentes a la actividad específica de la enzima, así como la cantidad de jugo obtenido por kilogramo de materia prima utilizada y se hace una comparación con los resultados obtenidos en un trabajo patentado sobre la extracción de bromelina a partir del tallo de la piña, trabajando en este último en un rango de temperaturas de 0° C a -20°C⁽⁴¹⁾; mientras que el rango de temperaturas empleadas en este trabajo fue de -45°C a -160°C.

TABLA 13. EXTRACCIÓN DE BROMELINA CON ETANOL Y PIROGALOL (ACIDO PIROGALICO). REPOSO PREVIO A LA EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA DE 20 HS.

PARTE DE DONDE SE EXTRAE LA ENZIMA	TEMPERATURA	<u>JUGO</u> kg DE MATERIA	ENZIMA EN EL JUGO	<u>UNIDADES</u> kg DE TALLO
	(°C)	(ml)	(BTU ^a /ml)	(BTU/kg)
CÁSCARA	-160 A -80	400	10.46	4184.0
TOCÓN	-160 A -80	438	11.70	5124.6
CÁSCARA-TOCÓN	-160 A -80	379	20.87	7909.7
TALLO ^b	0 A -20	478	13.92	6654.0

^a BTU= Unidad de Tirosina Bromelina; es la cantidad de enzima que debe producir 1 μ mol de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo⁽⁴¹⁾ (en este caso 35°C y pH= 7.2).

^b Datos correspondientes a la patente⁽⁴¹⁾ considerando que el tiempo de reposo previo a la extracción de la enzima, es de 24 hs.

Como puede observarse, los resultados obtenidos en esta tesis son bastante aceptables y lo son aún más considerando el hecho de que la enzima se extrae de donde las industrias procesadoras de piña consideran desperdicio, y no del tallo de la piña que es la parte en donde se encuentra presente la mayor cantidad de enzima⁽³²⁾. Para lograr tal efecto (resultados aceptables del desperdicio de la piña), debe considerarse la influencia de las bajas temperaturas así como también que el proceso de extracción se hace a partir de la reducción del tamaño de la cáscara y tocón de la piña, lográndose esto último por medio de la pulverización criogénica.

En la Tabla 14, se hace una comparación entre los resultados obtenidos en esta tesis y los resultados obtenidos en una tesis elaborada en 1975⁽³²⁾ en donde en esta última, la enzima es extraída del jugo obtenido del prensado de la cáscara y tocón de la piña (también desperdicio de la industrialización de la piña), precipitando la enzima con etanol y trabajando a temperaturas de 18°C a 20°C. También se comparan los resultados con otras referencias encontradas.

La Tabla 15 muestra claramente que los rendimientos obtenidos en el laboratorio son en todos los casos superiores a los encontrados en la literatura, a excepción de la patente⁽⁴¹⁾.

TABLA 14. EXTRACCIÓN DE BROMELINA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PROCESO

REFERENCIA	PARTE DE DONDE SE HACE LA EXT	TIEMPO DE REPOSO	RANGO DE TEMPERAZ	VOL. DE ETANOL	VOL. DE ETANOL	PROTEÍNA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA
				P/LA EXTRACCIÓN	P/LA PRECIPIT.		
		(hs)	(°C)	100 ml DE JUGO	100 ml DE JUGO	mg	BTU
				(ml)	(ml)	100 ml JGO	mg DE PROT/min
NUEVO PROCESO	CÁSCARA	20	-80 A -160	150	250	312.5	11.95
DESARROLLADO	TOCÓN	20	-80 A -160	137	251	353.8	14.67
EN 1997 (TESIS)	CÁSCARA-TOCÓN	20	-80 A -160	158	264	367.4	26.08
TESIS	JUGO DE LA						
DESARROLLADA	CÁSCARA DE	48	18 A 20	150	200	232.1	4.56
EN 1975 (32)	LA PIÑA						
LITERATURA	JUGO DE LA						
POR METODO	PIÑA	---	---	---	---	166	2.28
TRADICIONAL (42)							

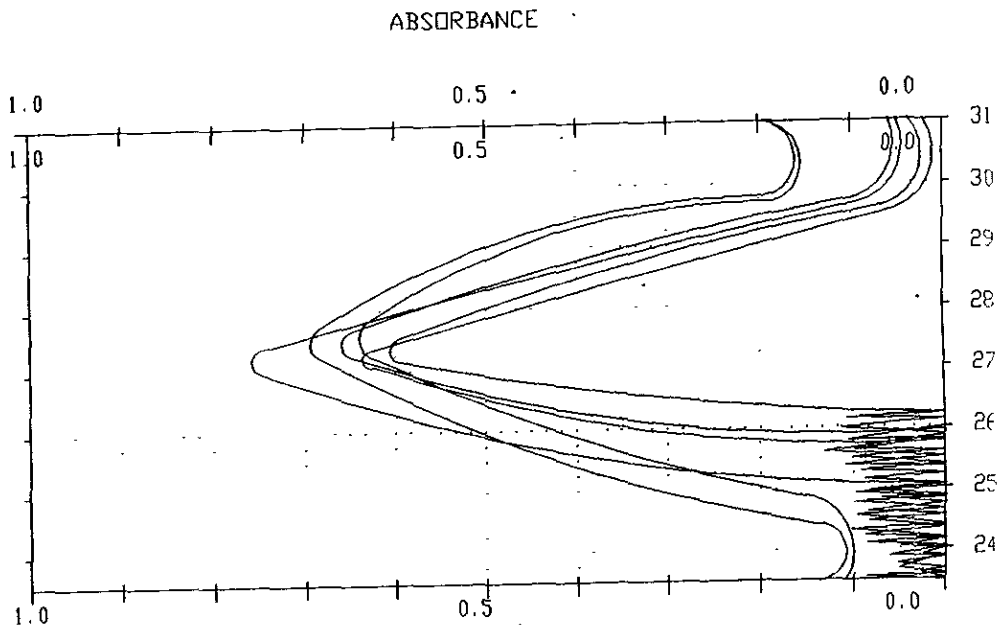
TABLA 15. RENDIMIENTO DE BROMELINA OBTENIDA EXPERIMENTALMENTE

PARTE DE DONDE SE HACE LA EXTRACCIÓN	R E N D I M I E N T O (%)		
CÁSCARA	188	134.6	75.14
TOCÓN	213	152.4	77.00
CÁSCARA-TOCÓN	221	158.3	118.90

REFERENCIAS COMPARATIVAS

TESIS (1975)		X	
MET. TRADIC.	X		
PATENTE			X

PERKIN-ELMER LAMBDA 2 UV/VIS SPECTROMETER
 DATE: 97/04/18 FRIDAY TIME 18:33:53
 METHOD NO.: 7 SCAN/MAN
 SAMPLE ID: 001
 OPERATOR ID: 220771

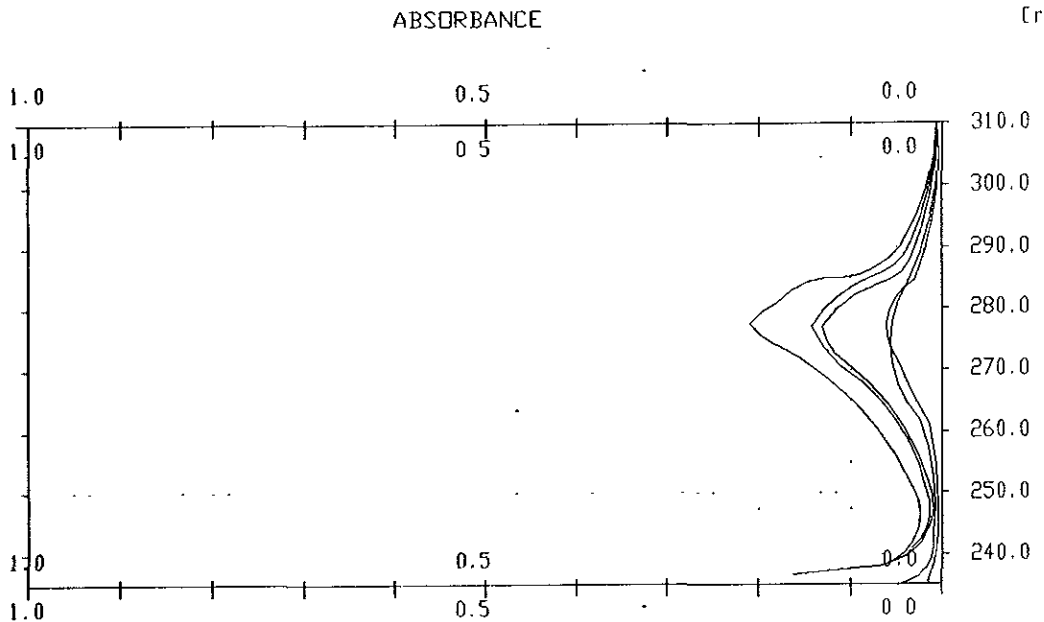


THRESHOLD : 0.100

BATCH: 001

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	18:36	278.1nm (MAX)	0.643 ABS
		240.6nm (MIN)	0.010 ABS
002	18:37	278.1nm (MAX)	0.696 ABS
		238.8nm (MIN)	0.013 ABS
003	18:39	278.2nm (MAX)	0.650 ABS
004	18:40	277.8nm (MAX)	0.744 ABS
005	18:42	278.5nm (MAX)	0.609 ABS
006	18:43	277.8nm (MAX)	0.652 ABS

PERKIN-ELMER LAMBDA 2 UV/VIS SPECTROMETER
 DATE: 97/04/21 MONDAY TIME: 19:41:02
 METHOD NO.: 7 SCAN/MAN
 SAMPLE ID: 001
 OPERATOR ID: 220771



THRESHOLD : 0.100

BATCH: 001

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	19:43	276.2nm (MAX)	0.050 ABS
		244.4nm (MIN)	0.013 ABS
002	19:45	276.2nm (MAX)	0.060 ABS
		244.4nm (MIN)	0.020 ABS
003	19:47	274.6nm (MAX)	0.144 ABS
		244.4nm (MIN)	0.024 ABS
004	19:49	276.2nm (MAX)	0.150 ABS
		244.4nm (MIN)	0.029 ABS
005	19:51	276.2nm (MAX)	0.212 ABS
		244.4nm (MIN)	0.033 ABS

El primer gráfico muestra los espectros de absorción de la enzima obtenida en el laboratorio (de las diferentes partes de la piña); así, las muestras 001 y 002 son los espectros producidos por la enzima extraída del tocón de la piña a los tiempos 0 y 1 minutos respectivamente, en estas muestras se presentan además del máximo, un mínimo lo cual posiblemente se refiera a que la enzima extraída del tocón es la que menos impurezas presenta. Las muestras 003 y 004 corresponden al espectro de absorción de la enzima extraída de la cáscara y tocón a los tiempos 0 y 1 minuto respectivamente con una cantidad de impurezas. Finalmente las muestras 005 y 006 corresponden al espectro de absorción de la enzima extraída de la cáscara de la piña también con cierta cantidad de impurezas.

En el segundo gráfico se muestra el espectro de absorción de la tirosina a diferentes concentraciones; la muestra 001 corresponde a una cantidad de tirosina de 200 μg y es la curva más pegada a la ordenada, las muestras 002, 003, 004 y 005 corresponden a cantidades de tirosina de 400 μg , 800 μg , 1400 μg y 1600 μg de tirosina respectivamente. Estas cantidades de tirosina fueron disueltas en 10 ml de agua y las absorbancias registradas, sirvieron de referencia para comparar la cantidad de tirosina producida por la enzima obtenida en el laboratorio.

Haciendo un análisis entre el primero y el segundo gráfico, se observa que los máximos de las curvas están comprendidos entre una longitud de onda de 275 y 280 nm; lo cual, considerando el por ciento de error del espectrofotómetro empleado es válido el incremento en la absorbancia dado por la formación de tirosina, demostrando este hecho la presencia de *bromelina*, cuya enzima se obtuvo en el laboratorio (primer gráfico), descartando la posibilidad de haber obtenido otra sustancia que no fuera *bromelina*, ya que ninguno de los componentes presentes en la piña presenta incrementos de absorbancia en el rango trabajado de longitudes de onda.

Lo que también revela el primer gráfico, es el hecho de que la enzima obtenida trae consigo cierta cantidad de impurezas (a excepción de la enzima extraída del tocón) pues debe mencionarse que ésta no fue purificada por estar fuera de los objetivos del proyecto. Ello no quiere decir que los resultados no sean válidos, ya que la actividad específica de cualquier sustancia puede determinarse sin antes haber sido purificada, sin afectar esto último los resultados.

4.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Haciendo un análisis más profundo, los resultados muestran una gran ventaja al emplear bajas temperaturas en aquellos procesos sensibles al calor; tal es el caso de la enzima vegetal bromelina la cual por encima de los 60°C descompone y la cual fue objeto de este estudio. Las observaciones hechas durante el desarrollo de la fase experimental de este proceso, hacen pensar que el uso de temperaturas inferiores a -50°C así como la reducción del tamaño de las partículas de la materia prima principal, son factores importantes en cuanto al rendimiento obtenido de la enzima y su actividad. El razonamiento es el siguiente: El nitrógeno líquido es un fluido criogénico totalmente inerte; por medio de este, la cáscara de la piña se congela (solidifica) por completo en minutos (aproximadamente 5), alcanzando una temperatura final de -160°C, bajo estas condiciones la materia prima se maneja con gran facilidad para reducir su tamaño (un polvo de aproximadamente 0.1 mm de diámetro) en un corto periodo de tiempo. Esta acción permite romper por completo los tejidos de la cáscara de la piña, dentro de los cuales se encuentra presente la bromelina y así liberarla totalmente. Por otro lado, el emplear etanol a -90°C como medio de extracción y luego éste mismo a -80°C como agente precipitante, favorecen la precipitación de la enzima vegetal bromelina y no la de otros componentes presentes también en el fruto de la piña.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo planteado en este trabajo se alcanzó y comprobó, ya que se desarrolló un proceso criogénico empleando nitrógeno líquido para obtener a partir de los desechos de la industrialización de la piña una cantidad y actividad considerables de la enzima vegetal *bromelina*, comparada con los métodos tradicionales de obtención de la misma, y obteniendo más de lo esperado.

El alcance de este trabajo estuvo limitado única y exclusivamente a la comprobación de los máximos rendimientos de obtención de la enzima, para lo cual se desarrolló una nueva metodología, en donde las características principales de ésta son el empleo de bajas temperaturas y la pulverización criogénica.

A partir de la experimentación a nivel laboratorio, se hace una propuesta para desarrollar el proceso a nivel planta piloto; por lo que se recomienda que para la producción de *bromelina* a nivel industrial, debe llevarse a cabo un estudio de prefactibilidad real el cual cuente con información verídica y detallada de datos de mercado; estos deben contener datos de importación y exportación de la *bromelina* así como la demanda que se tiene de ésta; pues debe mencionarse que los datos de mercado obtenidos para la realización de este trabajo (los cuales no están incluidos y cuya fuente de información fué el INEGI) son poco confiables; ya que en los datos de importación y exportación están reportados en general para las proteasas en las cuales se incluyen ficina y bromelina. Por esta razón no se tiene una idea clara de la demanda de la bromelina a nivel nacional.

Consultando otra fuente de información (SECOFI), se indica que la *bromelina* no la producen en el país ningún laboratorio nacional o extranjero.

Por lo tanto, para llevar a cabo el proceso a nivel industrial es necesario contar por lo menos con la demanda real de *bromelina* en el país.

Por esta razón, no puede saberse que tan factible es el proceso; pero lo que sí esta por demás remarcar, es el hecho de haber alcanzado satisfactoriamente el objetivo planteado en este trabajo llevado a nivel laboratorio, pues los resultados obtenidos se asemejan a lo obtenido y patentado en 1972⁽⁴¹⁾; en donde en este último, la materia prima principal es de primera calidad (tallo de la piña).

Debe mencionarse que a partir de este trabajo de investigación pueden salir otros más. Por ejemplo, el de la purificación de la enzima vegetal *bromelina*, un estudio de factibilidad para la producción de *bromelina* a nivel industrial, el diseño de una planta para la producción de *bromelina* a nivel industrial, etc.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahuja, J. C., " Tesis Profesional ", ENCB, IPN, (1959).
2. Balls, A. K., Thompson, R. R. & Kies, M. W., " Ind. & Ing. Chem. ", 33, 950, (1941).
3. Bergman, M. & Conrot, F., " J. Biol. Chem. ", 119, 707, (1937).
4. Bermejo Martínez, F. y Bermejo Barrera, Ma. del P., "Química Analítica General Cuantitativa e Instrumental", Vol. 1 , 7a ed., Paraninfa, Madrid, 1991, PP. 1006.
5. Caldwell, J. S., " Botanical Gazette ", 39, 409, (1905).
6. Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., "Methods in Enzymology, Proteolytic: Part. B", Vol. XLV, Edited by Laszlo Lorand, Academic Press INC., N. Y., 1976.
7. " Industrialización de la Piña; Proceso General y Aprovechamiento de los Residuos ", Comisión Nacional de Fruticultura, S.A.G., Serie Técnica, No. 21, México, 1974, PP. 17-19, 41-58.
8. " La Piña: Aspectos de su Cultivo y Aprovechamiento ", Comisión Nacional de Fruticultura, S.A.G., Serie de Divulgación, Folleto No. 3, México, 1972, PP. 6-7, 9.
9. " Situación Agronómica de la Piña en México", Comisión Nacional de Fruticultura, S.A.G., Serie Técnica, No. 27, PP. 15-16.
10. Chaplin, M. F. & Bucke, C., "Enzyme Technology", Cambridge University Press, 1990, PP. 40-78

11. Chittenden, R. H., " J. Physiol. ", 15, 249-310, (1894).
12. " Directorio de la Industria Alimentaria de la República Mexicana ", 9a ed., Feb., 1983, PP. 230-231.
13. Dutcher, R. A. & Yensen, C. D., " Fundamentos de Bioquímica Agrícola ", Salvat, USA., 1954, PP. 134-136.
14. " Volúmenes de Producción de Píña en la República Mexicana: 1980-1994 ", Expedientes del Departamento de Planeación Agrícola, Cosechas Frutales, Secretaría de Reforma Agraria.
15. Feinstein, G. & Whitaker, J., " Biochemistry ", 3, 1050, (1964).
16. Freifelder, D., " Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular ", Reverté, S.A., España, 1979.
17. Gortner, W. A. & Singleton, V. L., " J. Food Sci. ", 30, 24-29, (1965).
18. Greenberg, D. M. & Winnick, T. J., " J. Biol. Chem. ", 135, 761-787, (1940).
19. Heincke, R. M. & Gorther, W. A., " Economic Botany ", 11, 225, (1957).
20. Husain, S. S. & Lowe, G., " Biochem. J. ", 117, 341-346, (Ap-1970).
21. " Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos: Importaciones y Exportaciones ", Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática, México, 1980 a 1993.

22. Kaey, L., "Microbial Proteases", Process Biochemistry, Vol. 23, USA, 1982.
23. Kirk, R. E. & Othmer, D. F., "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol.5, The Interscience Encyclopedia, INC, N. Y., 1962, PP.735-760.
24. Knud, Aunstrup, " Proteases from Bacillus Species ", Ferment Technology, England, 1972.
25. López Gómez, A., " Diseño de Industrias Agroalimentarias ", Madrid (ed), España, 1992.
26. Madrid, A. y Gómez Pastrana, J. M., "Los Gases en la Alimentación" , A. Madrid Vicente (ed), Patrocina: Sociedad Española de Oxígeno, S.A., 1991, PP. 13-15, 45-51, 238-240.
27. Martínez, M.P., " Aprovechamiento de los Desperdicios de las Fábricas Empacadoras de Pifa ", Tesis, (1951), Escuela Nacional de Ciencias, I.P.N.
28. " The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs & Biologicals ", 11a ed., Centennial, Published by Merck & Co., INC. Ralaway, USA, 1989.
29. Monsalvas, F., Philippine, J., " Amin. Ind. ", 24 (1/4), 11-27, (1963).
30. Mosbach (ed.), "Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes", Vol. XLIV, Academic Press INC., N. Y., 1976.
31. Murachi, T., Yasui, M. & Yasuda, D., " Biochemistry ", 3, 49, (1964).

32. Oropeza Salin, Carlos Mariano, " Obtención de Bromelina a partir de los Desperdicios de las Plantas Empacadoras de Piña ", Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico , Biólogo, UNAM, México, D. F., 1975, SP.
33. Ota, S., Moore, S. & Stem, W. H., " Biochemistry ", 3, 180, (1964).
34. Passonneau, J. V. & Lowry, O. H., "Enzymatic Analysis: A Practical Guide", Humana, New Jersey, 1993, PP. 71-81.
35. Perdmann, G. E. & Lorand, L. (eds.), "Methods in Enzymology: Proteolytic Enzymes", Vol. XIX, Academic Press INC., San Francisco, 1970.
36. Perry, R. H., "Manual del Ingeniero Químico", Tomos II, III, V y VI, 6a ed. (3a. en español), McGraw-Hill, México, 1992.
37. Remingtons, " Pharmaceutical Sciences ", 15a ed., Board Members, 1975.
38. Robinson, D. S., "Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos", Acriba, España, 1991.
39. Scriban, R., "Biotechnologie: Technique et Documentation", 2a ed., Manual Moderno, París, 1985.
40. " Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola en el Cultivo de Frutales Tropicales y Subtropicales ", Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Publicación Especial No. 97, México, 1983, PP. 43-45.

41. Soong, et. al., " Preparation of Bromelain from Pineapple Stems ", China, Patent 3, 699, 001 (Oct. 17, 1972), United States Patent Office.
42. Tauber, H., "Enzyme Technology", John Wiley & Sons, INC., Chapman & Hall, LTD., N. Y., 1984, PP. 135-137.
43. Thatcher, C. M., "Fundamentos de Ingeniería Química", Continental, México. D.F., 1965.
44. Tucker, G. A. & Wood, L. F., "Enzymes in Food Processing", Blackie & Son (eds), LTD., USA, 1991.
45. Ulrich, G. D., "Diseño y Economía de los Procesos de Ingeniería Química", Interamericana, México, D.F., 1986.
46. Vizcaino, C.P., "Estados Productores de Piña en México", Comisión Nacional de Fruticultura, 1971.
47. Wiley, A. D. et. al., " Practical Protein Chemistry; A handbook: 1. Proteins ", Interscience Publication. Wiley & Sons LTD, Great Britain, 1986, PP. 284-301.
48. Wiseman, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology", 2a ed., Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1985.
49. Wittcoff, H. A. & Reuben, B. G., "Productos Químicos Orgánicos Industriales: Materias Primas y Fabricación", Vol. 1, Limusa, México, 1992, PP. 176-179, 244-125.
50. Yasuda, Y., Takahashi, N. & Murachi, T., " Biochemistry ", 9(1), 25-32, (1970).