

“Extracción, Purificación Parcial y Secado de la Enzima Bromelina Obtenida a partir del Corazón de la Piña (*Ananas comosus*)”.

Carmina Stefania Quinde Fuentes ⁽¹⁾, Nancy Viviana Sánchez Lluquín ⁽²⁾,
Priscila Castillo Ing. ⁽³⁾

Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
csquinde@espol.edu.ec ⁽¹⁾, nanvisan@espol.edu.ec ⁽²⁾,
pcastil@espol.edu.ec ⁽³⁾

Resumen

El presente artículo tuvo como objetivo la purificación parcial de la enzima bromelina mediante el sistema bifásico acuoso (SBA), evaluando el efecto del pH y las concentraciones de los componentes PEG 8000 y sales fosfato del sistema. La bromelina fue extraída del corazón de la piña de la variedad Milagreña mediante solución buffer a 4°C con EDTA, cisteína y fosfato disódico anhídrido. El mejor resultado de purificación obtenido en el sistema bifásico acuoso fue el que consistió de 16% PEG, 18% Sal y pH 9, con un factor de purificación de 1, secándose posteriormente en un spray dryer usando goma arábiga como agente encapsulante, con un rendimiento de 0.018g de extracto seco/ g de extracto purificado y un rendimiento total de 27,45 g de enzima por Kg de corazón fresco y se comprobó la presencia de la enzima bromelina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS – PAGE donde se observó una banda de proteínas de 28 kDa.

Palabras Claves: Piña, bromelina, sistema bifásico acuoso, secado, electroforesis, actividad enzimática, concentración de proteínas.

Abstract

The target of the present paper presents is the partial purification of the enzyme Bromelain using aqueous two-phase system (BMS), evaluating the effect of pH and the concentrations of the components PEG 8000 and salts phosphate of the system. Bromelain was extracted from the heart of the pineapple of the Milagreña variety at 4 ° c with EDTA, cysteine and anhydride disodium phosphate buffer solution. The best result of purifying obtained in the aqueous two-phase system consisted of 16% PEG, 18% salt and pH 9 with a factor of purification of 1, drying later in a spray dryer using Arabic gum as encapsulating agent, with a yield of 0.018 g of dry extract / g of purified extract and a total yield of 27,45 g of enzyme per Kg of fresh heart and finally checked the presence of the enzyme Bromelain by gel electrophoresis of polyacrylamide SDS - PAGE where a band of 28 kDa proteins was observed.

Keywords: Pineapple, bromelain, aqueous biphasic system, spray drying, electrophoresis, enzymatic activity, protein concentration, enzyme activity.

1. Introducción

Datos actuales revelan que la producción de enzimas proteolíticas, tales como bromelina, papaína y ficina, representan el 38% del total de enzimas mundialmente comercializadas; la bromelina es una enzima obtenida a partir de la piña (*Ananas comosus*) y consiste en una cisteína-proteinasas de naturaleza ácida, presente en la corteza, raíz y fruto.

Esta enzima tiene importantes e innovadoras aplicaciones dentro de la biotecnología, usándose en la industria alimenticia, principalmente para formular ablandadores de carne y fabricación de cerveza y quesos, entre otros. En medicamentos, se emplea con éxito como anti-inflamatorios, anticoagulante, digestivos.

Las hojas, el tallo y corazón de la piña, representan el 55% de su peso y son considerados como desechos para los agricultores e industriales, por lo que solo se han ocupado de la producción de esta fruta y no de estas partes del cultivo pudiendo ser materia prima para incursionar en el mercado de la bromelina.

El desarrollo de diversas técnicas de extracción y purificación de la bromelina han sido estudiadas en principales países productores de piña, las cuales se han llevado a cabo en especies endémicas; sin embargo, no existen investigaciones con respecto a la purificación de esta enzima en el Ecuador, es por ello que se analizó el comportamiento de la bromelina presente en la especie perolera más conocida como “Milagreña”.

Para el desarrollo de esta investigación, se evaluaron los efectos del pH y las concentraciones de los componentes del sistema bifásico acuoso PEG y sal como método de purificación parcial de la bromelina a partir del corazón de la piña. Se analizó el contenido de proteínas, actividad enzimática, coeficientes de partición y factor de purificación, para así poder decidir cuál es el mejor tratamiento del SBA.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales, reactivos y equipos.

Las piñas fueron escogidas en diferentes mercados de Guayaquil como Sauces IX, La Florida y José Mascote, con grado de madurez M0. Los reactivos agregados al jugo de piña fueron fosfato disódico anhídrido, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cisteína para fines bioquímicos (KETNAWA *et al*, 2011). El extracto crudo fue centrifugado en una centrífuga refrigerada. En la purificación se utilizó polietilenglicol 8000, di-Potasio dihidrógenofosfato, Potasio dihidrógenofosfato.

La medición de la concentración de proteínas se llevó a cabo en un espectrofotómetro de haz de luz simple, con reactivo de Biuret, y para la curva de calibración se utilizó albúmina sérica bovina.

La actividad enzimática fue medida mediante el método analítico de la Unidad de Tirosina (ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, 2012), en el espectrofotómetro. Utilizando caseína de leche bovina, fosfato disódico anhídrido grado analítico, L – cisteína para fines bioquímicos, EDTA grado analítico, ácido cítrico monohidratado, ácido tricloroacético (TCA) 30% grado analítico, L – tirosina para fines bioquímicos y ácido clorhídrico 0.1N.

La microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión marca SD Basic de LabPlant y se utilizó como agente encapsulante goma arábica de grado alimenticio.

Por último se realizó la electroforesis SDS – PAGE (MALDONADO & JORRÍN, 2007) en el equipo Mini-PROTEAN 3, utilizando micropipetas de 1000, 200, 100 y 10 ul con puntas desechables, tubos eppendorf de 2 ml; los distintos reactivos fueron TEMED (Tetrametiletilenediamina), tris base, ácido clorhídrico, sodio-dodecilsulfato (SDS) al 10%, acrilamina-bisacrilamida al 30%, persulfato de amonio (APS), azul de bromofenol, glicerol, glicina, 2- mercaptoetanol, , ácido acético,

isopropanol, proteína estándar (Bromelina) y coomassie brilliant blue R- 250.

2.2. Método de extracción

La extracción se realizó mediante el método de KETNAWA *et al*, 2011.

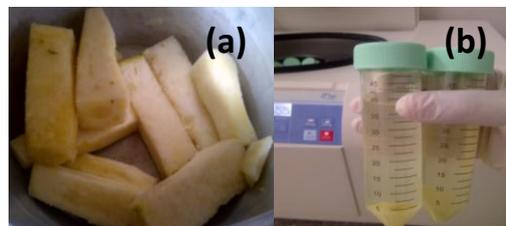


FIGURA 1. (a) Corazones de piña, (b) Extracto centrifugado

Se extrajo a partir del corazón de la piña (FIGURA 1. a) la enzima bromelina mediante buffer a 4°C (0.1M Tampón fosfato de sodio con cisteína 15mM y EDTA 2mM, pH 7), se centrifuga a 8000 rpm por 30 minutos a 4°C (FIGURA 1. b).

2.3. Método de purificación parcial de la enzima bromelina.

El sistema se desarrolló según WABISZCZEWICZ, 2000.



FIGURA 2. (a) Soluciones de PEG y Sal; (b) Formación del Sistema Bifásico Acuoso

El sistema fue preparado a partir de las soluciones PEG y fosfato (FIGURA 2. a), que fueron mezcladas a temperatura ambiente antes de pesarlas.

1. Se pesan en un tubo de centrifuga de 45 ml las cantidades requeridas de cada componente necesario para la obtención de la composición deseada (16,18% PEG 8000; 18, 16% de fosfato de potasio, 46% de agua destilada).
2. Se agregó cada componente y se agitó en un vórtex por 45 segundos.

- Posterior se agregó 20% del extracto crudo de enzima y se volvió a agitar el sistema por 20 segundos, enseguida se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos (FIGURA 2. b).
- Se removió la fase superior e inferior usando una jeringa, y se coloca cada fase en tubos diferente, almacenando a 4°C hasta su posterior utilización.

2.4. Determinación de proteína total.

La determinación de proteína total del extracto se realizó mediante el método de Biuret (WROLSTAD et al, 2005). La absorbancia fue medida en el espectrofotómetro a 540 nm. Para poder obtener la concentración de proteínas de las muestras, se realiza la curva de calibración con los valores experimentales de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína estándar (Albumina Sérica Bovina).

De la curva de calibración se obtuvo la Ecuación 1 de la recta:

$$A = m * C + b \quad Ec. 1$$

Dónde:

A: Absorbancia

m: pendiente de la curva de calibración

C: concentración (mg/ml)

b: intersección del valor de absorbancia o del eje "y"

2.5. Determinación de actividad enzimática.

El método analítico de la Unidad de Tirosina (BTU/ml) según ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, 2012.

Para calcular la actividad enzimática se usó la Ecuación 2.

$$\frac{TU}{ml} = DO_{280} \times \frac{V_{total}}{(V_{enzima})(tiempo)} \times \frac{1}{pendiente} \times FD \quad Ec. 2$$

Dónde:

TU/ml: es la actividad enzimática expresada en unidades de tirosina.

DO₂₈₀: es la densidad óptica medida a 280 nm menos la densidad óptica del blanco.

V_{total}: es el volumen del sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA).

Tiempo: duración de la hidrólisis en minutos

pendiente: pendiente obtenida de la curva de tirosina.

FD: es el factor de dilución usado cuando los valores de absorbancia dieron valores mayores a 1.

2.6. Secado.

El extracto semipurificado de bromelina fue microencapsulado usando goma arábica mediante un secador de aspersión con boquilla de dos fluidos (Spray Dryer SD Basic LabPlant, UK) según ARANA & QUIJANO, 2012. Las condiciones a las que fue operado el equipo se muestran en la TABLA 1.

TABLA 1
Parámetros del proceso de secado

Temperatura de entrada del aire	65- 67°C
Temperatura de entrada de la muestra	30°C
Flujo de alimentación	3.5 ml/min.
Caudal del aire de secado	70m ³ /h
Diámetro de la boquilla de alimentación	0.5mm
Suministro de aire comprimido	50ml/min a 4 bar

2.7. Electroforesis SDS - PAGE.

El método de electroforesis SDS – PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) utilizado en este trabajo investigativo se lo realizó según MALDONADO & JORRÍN, 2007.

2.8. Diseño de experimentos.

En la elaboración de este proyecto se realizó un modelo factorial 2² por triplicado

Los niveles a experimentar fueron 2, representados como nivel alto (2) y nivel bajo (1). La TABLA 2 muestra los factores y niveles del diseño experimental.

TABLA 2
Factores y niveles del diseño de experimentos

Factores	Niveles (1)	Niveles (2)
pH	7	9
Concentración PEG/Sal	18%/16%	16%/18%

3. Análisis de resultados

3.1. Análisis de resultados de la extracción

Rendimientos:

Se procesaron 27 piñas de un peso promedio de 2.4 Kg, de los cuales se extrajeron los corazones con un peso promedio de 0.355 Kg, y así se obtuvo un rendimiento de 15.2%.

Se extrajo posteriormente 6,28 Kilogramos de jugo a partir de los 9.58 Kilogramos de corazón de piña, logrando así un rendimiento del 65.55%.

Concentración

Los resultados obtenidos de la concentración de proteínas presente en el extracto crudo, fue de un valor promedio de 5,21 mg/ml.

Actividad enzimática:

La actividad enzimática promedio del extracto crudo es de 15,15 BTU/ml y la actividad específica promedio es de 3081,7 BTU/g.

3.2. Análisis de resultados de sistema bifásico acuoso

Efecto de las concentraciones de PEG y Sal

PEG 8000

El comportamiento de la bromelina en un sistema bifásico acuoso de distintas concentraciones de PEG 8000 16% y 18% ha sido estudiado. La TABLA 3 muestra que los coeficientes de partición K_{prot} de la bromelina obtenida en todos los sistemas bifásico acuoso fueron mayor que 1, indicando que la mayoría de las proteínas se hallan en la fase superior o top, en cambio los valores de K_{act} mayores a 1 nos indica que solo la enzima objetivo fue encontrada en la top fase (RAVINDRA et al, 2007).

TABLA 3
Resumen de resultados

Sistema	K prot	K activ	AE (BTU/g)	FP
Ph7 [] 1	19,26	3,89	2660,00	0,432
Ph7 [] 2	27,74	2,39	960,00	0,388
Ph9 [] 1	44,65	3,69	1203,33	0,966
Ph9 [] 2	56,40	3,69	663,33	0,391

De acuerdo a la TABLA 3, el factor de purificación aumenta conforme aumenta la concentración de PEG, ya que particiona la bromelina hacia la top fase comparada con las demás proteínas repartidas en la bottom fase (KETNAWA, 2011). Por lo tanto, de todos los sistemas probados, los que constan de PEG 18% tienen factores de purificación más altos de 0,432 y 0,966, comparado con los de PEG 16% que presentan factores de purificación más bajos de 0,388 y 0,391; esto se debe a que mientras mayor

es la concentración de polímero en la fase superior del sistema, aumentará la hidrofobicidad de la fase superior y al ser la bromelina una enzima hidrofóbica tendrá mayor afinidad hacia esta fase (BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, 2008).

Sal

En la FIGURA 3. se muestra el efecto de la sal a distintas concentraciones de 16% y 18% y según los resultados de este estudio, el KP tuvo un rango de 19,26 a 56,4. Se tomaron en cuenta todos los valores obtenidos en la purificación y se exceptuaron solo los valores que fueron aberrantes.

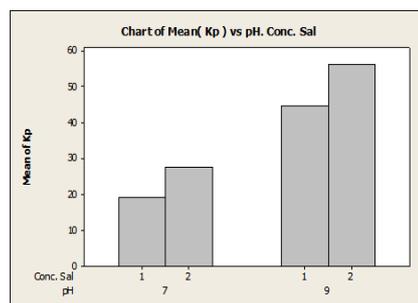
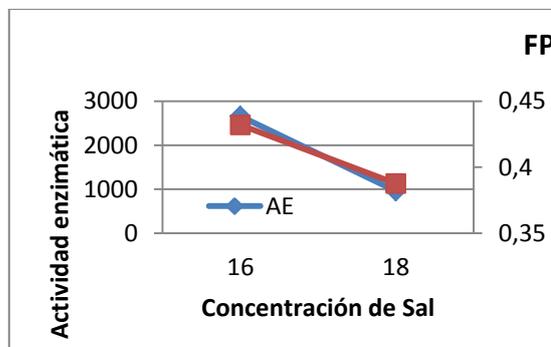


FIGURA 3. Efecto de la concentración de sal en el K_p

Fuente: Minitab 14

El incremento de K_p se debe al aumento de la concentración de sal en el sistema, este fenómeno puede ser explicado debido al efecto del salting out en el que las sales son las responsables de modificar las propiedades de superficie de la enzima haciéndola más hidrofóbica y como consecuencia la bromelina y otras proteínas impuras migrarán hacia la top fase rica en PEG; por lo cual, resulta en una disminución de la actividad específica y factor de purificación como se puede observar en la FIGURA 4. Sin embargo, un mayor aumento en la concentración de fosfatos hace que la proteína reduzca su solubilidad y por el contrario precipite en la fase inferior.



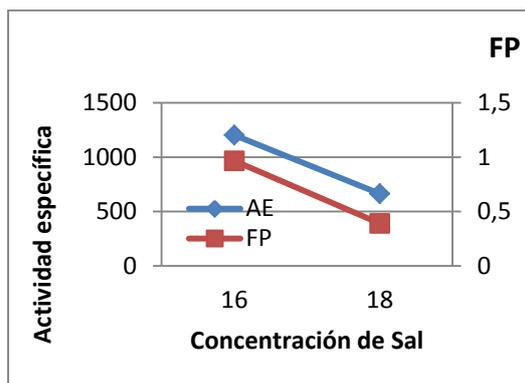


FIGURA 4. Efecto de la concentración de sal en pH 7 y pH 9

Efecto del pH

De acuerdo a las TABLA 3, el aumento en el pH del sistema mostró tener un efecto significativo sobre el comportamiento de partición de la bromelina en el sistema bifásico acuoso, ya que está íntimamente relacionado con la carga electroquímica superficial de la molécula de la enzima. A mayor pH, la proteína cargada negativamente será enriquecida a la fase superior que está cargada positivamente, mientras que a bajo pH la proteína se cargara positivamente y se irá a la fase inferior, por lo tanto, el coeficiente de partición de la proteína aumenta con el aumento del pH. (BENAVIDES et al, 2008).

En la FIGURA 3. mostrada anteriormente, se puede observar coeficientes de partición de 19,26 y 27,74 a pH7, valores que aumentan a 44,65 y 56,4 conforme el pH se incrementa a 9.

3.3. Análisis del factor de purificación en los experimentos.

Análisis estadístico: ANOVA.

TABLA 4.
Análisis de varianza para Factor de purificación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración	0,24197	1	0,24197	7,15	0,028
B:pH	0,17715	1	0,17715	5,23	0,051
AB	0,25463	1	0,25463	7,52	0,025
Error total	0,27084	8	0,03386		
Total (corr.)	0,94458	11			
S = 0,183998 R-cuad. = 71,33% R-cuad.(ajustado) = 60,57%					

Como se muestra en la TABLA 4, la concentración y pH tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del

95,0%. Por lo tanto se puede afirmar que el cambio en la concentración de los componentes PEG y Sal de un sistema bifásico acuoso para la purificación de la bromelina, si tiene efecto sobre la variable de respuesta, así como la interacción de ambos factores concentración y pH, por otro lado el cambio de pH del sistema de purificación por sí solo no ejerce un efecto sobre la variable de respuesta.

Interpretación de resultados. Se puede observar (FIGURA 5.) que la concentración de PEG y Sal de los sistemas tiene un efecto más grande que el pH de los sistemas experimentados, puesto que la línea que conecta las respuestas medias para los niveles de concentración 1 y 2 tiene una pendiente más abrupta que la línea que conecta las respuestas de nivel bajo y alto del pH.

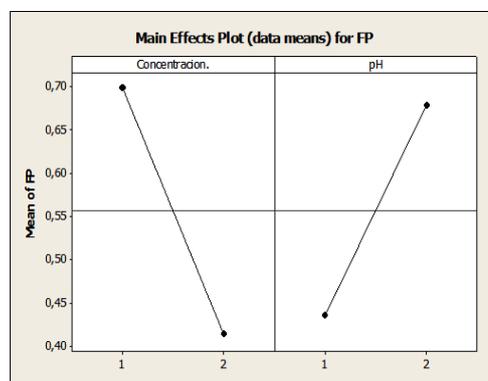


FIGURA 5. Efectos principales para Factor de purificación
Fuente: Minitab 14

Esto es debido, a que la concentración de PEG y Sal ejercen una función más importante que el pH, ya que al variar las concentraciones en el sistema varían también los valores K_{prot} y K_{act} , lo que significa que la enzima será particionada más a la fase Top; por otro lado, el pH del sistema ejerce la función de coadyudante del polímero y de la sal, por lo que solo no ejerce un efecto significativo sobre la purificación sino, interactuando conjuntamente con las concentraciones de PEG y sal, logrando así una mejor purificación en el sistema.

La FIGURA 6 indica el efecto que tiene la interacción de los factores sobre la variable de respuesta.

Con la finalidad de obtener un mayor factor de purificación, de acuerdo a la FIGURA 6 se debe usar los niveles más altos de concentración y pH, es decir: Concentración 1: PEG 18%-Sal 16% a pH 9, que darán un factor de purificación promedio de 0.966. Por esto se eligió a este tratamiento como el mejor y se procederá a su posterior secado en Spray-dryer.

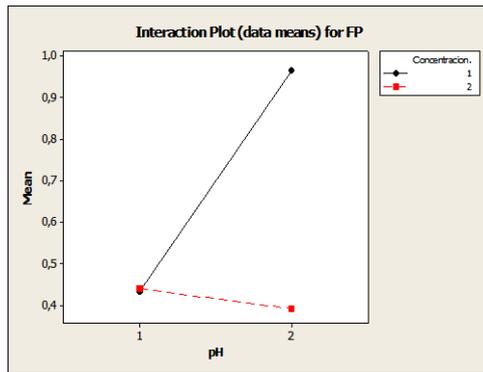


FIGURA 6. Interacción de efectos para Factor de purificación

Fuente: Minitab 14

3.4. Análisis de resultados de la verificación de presencia de la enzima.

SECADO

Rendimiento

El rendimiento en la etapa de secado es de 0,018g de extracto seco/g extracto purificado y para obtener 1 Kg de bromelina semipurificada, un rendimiento de 27,45 g de enzima/Kg de corazón fresco.

Concentración

La enzima semipurificada seca tiene una concentración de proteínas de 3,27 mg/ml y con respecto a la concentración antes de secar que fue de 12,37 mg/ml; se ha reducido en un 74%.

Actividad enzimática

Los resultados obtenidos de actividad enzimática 3,56 BTU/ml y actividad específica 1088,16 BTU/g del extracto seco. Con respecto a la actividad enzimática antes de secar ha bajado en un 75.5%.

ELECTROFORESIS

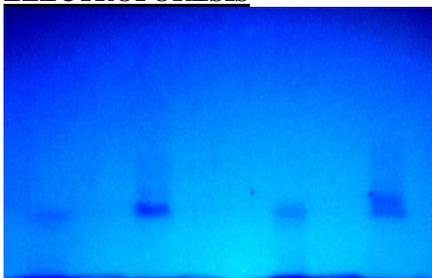


FIGURA 7. Geles de electroforesis SDS-Page

Con el propósito de determinar el peso molecular del extracto semipurificado por el sistema bifásico acuoso, se realizó una

electroforesis desnaturalizante en gradiente de poli-acrilamida.

De acuerdo a la FIGURA 7, la presencia de bromelina en el extracto seco semipurificado ha sido confirmada con el posicionamiento relativo de la banda leída en el gel 13% SDS-PAGE. En el gel de electroforesis, las proteínas en el extracto seco fueron identificadas como bromelina, según su movilidad ubicándose más cerca de la bromelina de marca Sigma usada como marcador, que tiene una banda de proteínas de peso molecular 28-30 kDa (KETNAWA, 2011).

Comparando bibliográficamente, la mejor purificación se da a pH 9 utilizando PEG 4000 según FERRARI, 2011; y según KETNAWA et al. 2011. El mejor factor de purificación se da con concentraciones de 18% PEG6000–17% Sal (FIGURA 8.); valores que son similares a este trabajo investigativo.

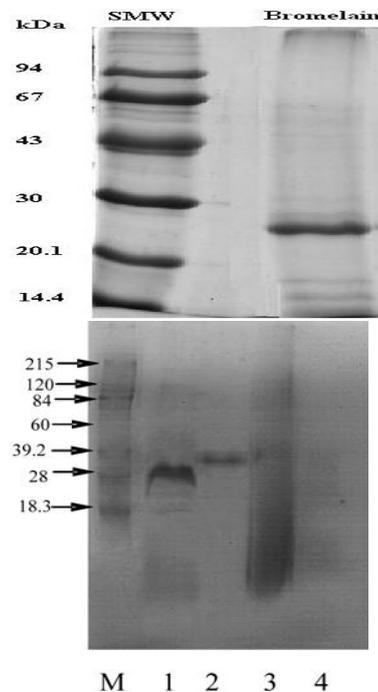


FIGURA 8. Determinación del Peso molecular de bromelina por electroforesis SDS-PAGE según Ferrari y Ketnawa.

4. Conclusiones

El diseño factorial aplicado demostró que la concentración de los componentes PEG – Sal tienen un efecto significativo sobre el factor de purificación como variable de respuesta, ya que al variar las concentraciones en el sistema varían también los valores de Coeficientes de partición de proteína y actividad, lo que significa que la enzima será particionada más a la fase Top; por otro lado el pH del

sistema ejerce la función de coadyudante del polímero y de la sal, por lo que en sí solo no ejerce un efecto significativo sobre ésta variable, sino interactuando conjuntamente con las concentraciones de PEG y sal, logrando así una mejor purificación en el sistema.

En la etapa de extracción de los corazones de piña se obtuvo un rendimiento de 15.2%, y una vez extraído el jugo se logró un rendimiento del 65.55%.

El factor de purificación más alto con un valor de 1 se llevó a cabo mediante la combinación de pH 9 y concentraciones de 18% PEG y 16% Sal, esto se debe a que el PEG tiene afinidad con la bromelina que es hidrofóbica y el pH 9 es próximo a su punto isoelectrónico resultando en una mejor purificación.

En cada uno de los sistemas ensayados se obtuvieron valores de coeficientes de partición tanto de proteína como de actividad enzimática mayores que 1, lo que indica que la mayoría de las proteínas se hallan en la fase superior o top, en cambio los valores de coeficientes de partición de actividad mayores a 1 nos indica que solo la enzima objetivo fue encontrada en la top fase.

El rendimiento de la bromelina semipurificada obtenida en la etapa de secado es de 0,018 g de extracto seco/ g extracto semipurificado, y el rendimiento final de todo el proceso indica que para obtener 1 kg de bromelina se necesita 19,24 kg de corazón de piña.

5. Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), y en especial al Ph. D. Oscar Navarrete, Ph. D. Juan Manuel Cevallos e Iván Chóez por su valiosa colaboración.

5. Referencias

[1]. ARANA, PAMELA; QUIJANO, MARÍA. "Extracción, Caracterización y Comparación de Látex Obtenido, en Secado por Aspersión, de tres Variedades de Papaya (*Carica papaya* L.)". (Tesis, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, ESPOL, Guayaquil- Ecuador, 2012).

[2]. BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Aplicación Genérica de Sistemas de dos Fases Acuosa Polietilenglicol – Sal para el Desarrollo de Procesos de Recuperación Primaria de Compuestos Biológicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 7, No. 2. 2008.

[3]. ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. "Bromelain", [en

línea]. <http://www.enzymedevelopment.com/>. (Agosto, 2012).

[4]. KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous Two-phase Extraction of Bromelain from Pineapple Peels ('Phu Lae' cultiv.) and Its Biochemical Properties. *Food Sci. Biotechnol.* 2011.

[5]. MALDONADO, ANA MARÍA; JORRÍN, JESÚS V. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*, [en línea]. www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-ol/practicagenerales.htm (Agosto, 2012).

[6]. RAVINDRA, B.; RASTOGI, N.; RAGHAVARAO, K. Liquid-liquid extraction of bromelain and Polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. Department of Food Engineering, Central Food Technological Research Institute. India. 2007.

[7]. WABISZCZEWICZ, ANA CLAUDIA. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. (Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – Brasil, 2000).

[8]. WROLSTAD, RONALD; DECKER, ERIC; SCHWARTZ, STEVEN; SPORNS, PETER. Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates. Primera Edición. Editorial Wiley & Sons, Inc. 2005 Págs. 86 – 89.