

EXTRACCIÓN DE BROMELINA A PARTIR DE RESIDUOS DE PIÑA

Linda Gallardo¹, Alfredo Sánchez^{1,2}, Claudia Montalvo¹ y Alejandro Alonso^{1,2*}

¹Universidad Politécnica de Puebla, Programa Académico en Ingeniería en Biotecnología, Tercer carril del ejido serrano s/n, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, C.P. 72 640 Puebla, México.

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Posgrado en Ciencias Ambientales. C.U. Jardines de San Manuel. C.P. 72 570, Puebla, México.

E-mail: agosto96mx@hotmail.com

RESUMEN

En este trabajo de investigación se reporta la concentración de proteínas, actividad enzimática y proteolítica de la bromelina extraída por precipitación alcohólica a -10 °C de diferentes partes de este fruto, nuestros resultados muestran que a los 7 días se tuvo una concentración de proteínas en cáscara de 857,35 mg/mL mayor a las encontradas en pulpa y corazón (625,09 mg/mL y 591,04 mg/mL, respectivamente). La actividad específica en corazón fue de 19,88 nmol/min/mg, similar al de pulpa (18,73 nmol/min/mg) y mayor al presente en cáscara (9,05 nmol/min/mg), sin embargo, esta última al ser un residuo agroindustrial puede ser potencialmente utilizado en la extracción y purificación de esta enzima a un menor costo.

Palabras clave: piña, bromelina, actividad.

ABSTRACT

Bromelain extraction of pineapple waste

In the present work the determination of protein concentration and enzymatic activity of bromelain were tested in each one of the parts of pineapple: crown, shell, heart and pulp. The bromelain was obtained by precipitation with ethanolic extraction at -10 °C. The results shown that the best protein concentration was obtained in shell at 7 days (857.35 mg/mL) being higher than pulp and heart with values of 625.09 mg/mL and 591.04 mg/mL respectively. The specific activity was 19.88 nmol/min/mg in heart, very similar to pulp (18.73 nmol/min/mg) and both were bigger than the activity in shell (9.05 nmol/min/mg). However the crown, the shell and the heart are considered like agro industrial waste and these could be used in extraction and purification to get bromelain with low cost.

Keywords: pineapple, bromelain, activity.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en las proteínas, se agrupan según los residuos de aminoácidos, del centro activo y los mecanismos de acción, dentro de las cisteíno peptidasas (EC 3.4.22) se encuentra a la papaina y bromelina (1). La piña es una fruta tropical de la familia de las bromeliaceae, es rica en vitaminas A, B, C y tiene actividad proteolítica debida a la bromelina que se activa por la cisteína, tiosulfato y glutatión.

**Alejandro I. Alonso: Químico Farmacobiólogo, Especialista en Ingeniería Ambiental y Máster en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de Puebla. Líneas de trabajos: la investigación a la purificación de proteínas de productos bióticos y su aplicación ambiental.*

Es inhibida o inactivada por iones metálicos oxidantes y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico). La bromelina de los frutos es una proteasa ácida, su intensa actividad proteolítica no se modifica en zonas de pH entre 3 y 8. Es una proteína constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre.

Esta biomolécula se utiliza como ablandadora de carnes (1), complemento alimenticio y se ha descrito que muestran varias acciones farmacológicas, por ejemplo aumentan la absorción de medicamentos, (2) se

han utilizado en tratamientos de desórdenes digestivos, en enfermedades virales y en la formulación de vacunas. Tienen potencialidades como antiinflamatorias, antitrombóticas y fibrinolíticas. Recientemente, se demostró la posible actividad antitumoral de cisteíno-proteasas como la bromelina contenida en la piña en 5 tumores transplantables de ratón: Leucemia p-388, carcinoma pulmonar de Lewis, adenocarcinoma-755, sarcoma-37 y tumor ascítico de Ehrlich (3), así como la inhibición en la proliferación de tumores cerebrales (4).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la obtención de bromelina a partir de cáscara, corazón y pulpa de la piña así como determinar la actividad enzimática y específica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de una piña previamente lavada y fraccionada en pulpa, cáscara y corazón. Estas fracciones fueron molidas por separado en un extractor de jugos, el volumen resultante se multiplicó por 1,5 y esa fue la cantidad añadida de etanol. Las mezclas extracto-etanol fueron distribuidas en tubos falcón de 50 mL y colocados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días, a continuación las muestras fueron centrifugadas a 8 500 rev/min durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y las pastillas de cada muestra fueron recolectadas en un volumen final de 1 mL de solución tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de *Lowry*, cuya sensibilidad es de 1 a 2 μg , el cual se realizó de la siguiente manera: a 300 μL de muestra o estándar se le adicionaron 300 μL de solución de hidróxido de sodio 2N y se colocó a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Después se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se le agregaron 3 000 μL del reactivo para formar el complejo. Se dejó la reacción 10 min a temperatura ambiente, enseguida se agregaron 300 μL de reactivo de Folin 1N mezclando por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 40 min, se determinaron los valores de absorbancia a 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453, se prepararon estándares con albúmina bovina a distintas concentraciones para elaborar una curva de calibración.

La actividad proteolítica fue determinada de acuerdo al procedimiento de Arnon con ligeras modificaciones (5). Este procedimiento consistió en una mezcla de reacción que contenía: 200 μL de cisteína 50 mM-20 mM EDTA pH 8; 700 μL de solución tampón Tris-HCl 50 mM pH 8; 20 mg de concentrado de proteínas precipitadas. Esta mezcla fue colocada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Posteriormente se agregaron 1 000 μL de caseína a 1 % (m/v) como sustrato y la reacción fue puesta nuevamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Para detener la reacción se adicionaron 3 000 μL de ácido tricloroacético (TCA) 5 % (m/v) y se dejó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Finalmente las muestras de reacción fueron centrifugadas a 8 000 rev/min durante 10 min y el sobrenadante fue medido a 275 nm. La lectura fue corregida por un blanco en el cual el concentrado fue adicionado después de agregar el TCA, la actividad fue determinada por medición de la velocidad de liberación de tirosina a partir de caseína como sustrato; expresada en unidades enzimáticas, una unidad (U) es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de tirosina por minuto a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La actividad específica se calculó como el cociente de la actividad enzimática entre la concentración de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento del fruto permitió obtener muestras representativas, las cuales fueron cáscara, pulpa y corazón. La Fig. 1 presenta que el mayor valor de proteína se registró para la cáscara (857,35 mg/mL) con diferencia significativa respecto a las demás muestras; pulpa (625,09 mg/mL) y corazón (591,04 mg/mL). La Fig. 2 muestra la actividad enzimática (nmol/min) de los extractos obtenidos a partir de las diferentes secciones de la piña, en la cual observamos que para corazón fue de 397,6642 nmol/min, muy similar a pulpa (374,7928 nmol/min) y por arriba de cáscara, cuyo valor fue de 181,1357 nmol/min. La Fig. 3 indica que de manera similar la actividad específica (nmol/min/mg) fue mayor en corazón y pulpa teniendo valores de 19,8832 nmol/min/mg y 18,7396 nmol/min/mg respectivamente, seguida por la cáscara en la cual se obtuvo un valor de 9,0567 nmol/min/mg. Los resultados muestran que en pulpa y corazón se encuentra una mayor cantidad de enzimas proteolíticas a diferencia de las presentes en cáscara, sin embargo, esta última al ser un residuo agroindustrial puede ser potencialmente utilizado a un menor costo en la extracción y purificación, mediante técnicas bioquímicas como diálisis y cromatografía de intercambio catiónico y poder aplicarla en diversos procesos.

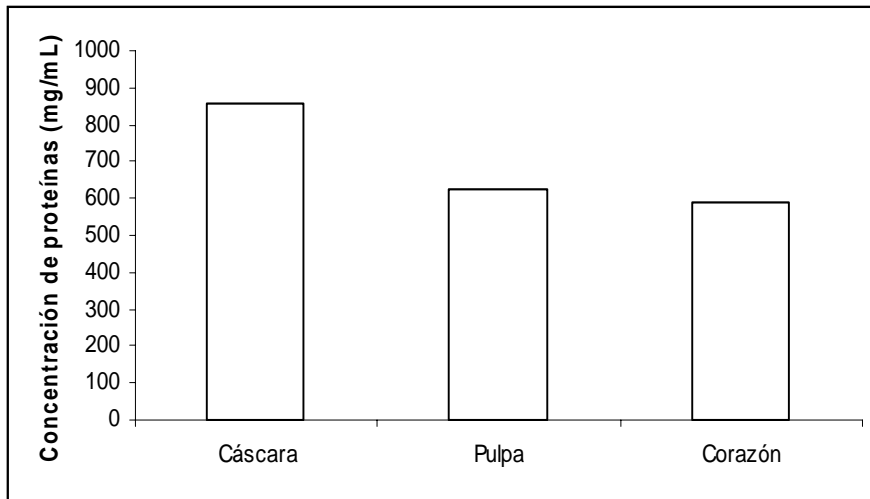


Fig. 1. Concentración de proteínas (mg/mL).

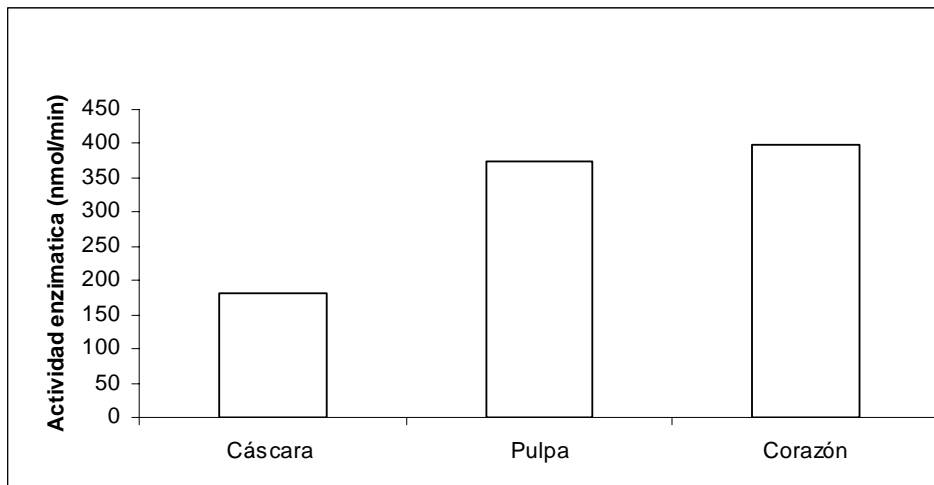


Fig. 2. Actividad enzimática de los diferentes extractos de la piña.

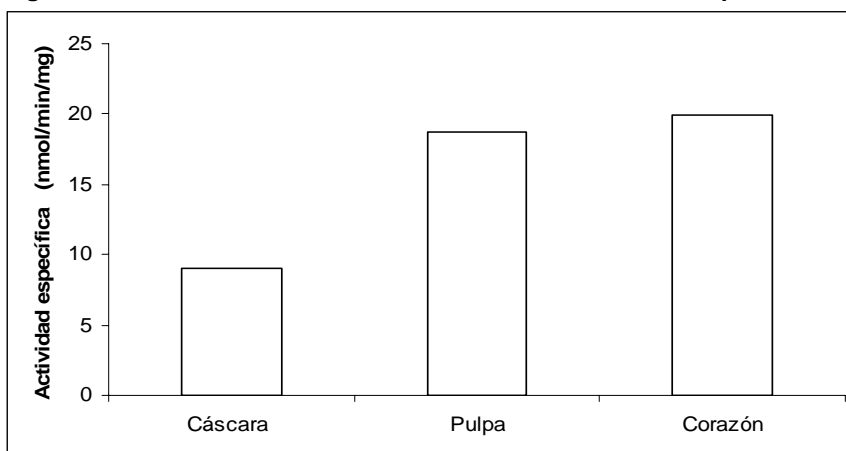


Fig. 3. Actividad específica de los diferentes extractos de la piña.

CONCLUSIONES

Se logró establecer que las mejores condiciones para la extracción de la bromelina fueron con el solvente etanol, temperatura de -10 °C y durante un tiempo de siete días. La mayor cantidad de proteínas se encuentran en la cáscara, sin embargo, esta tiene la menor actividad enzimática y específica. La bromelina extraída de cáscara de piña tiene un menor costo con respecto a la de las demás partes del fruto ya que es un residuo agroindustrial.

Los resultados obtenidos son prometedores para que con un mayor grado de purificación sea factible aplicar esta enzima en tratamientos biomédicos.

REFERENCIAS

1. Kleef, R., Delohery, T. y Boubjerg, D. *Pathobiol.* 64:339-46, 1996.
2. Leipner, J. y Saller, R. *Drugs* 59:769-80, 2000.
3. Hernández, M., Chávez, M., Báez, R., Carvajal, C., Márquez, M., Morris, H., Santos, R., González, J., Quesada V. y Rodríguez C. *Biotechnol. Aplicada* 20:180-182, 2003.
4. Tysnes, B., Maurer, R., Porwol, T., Probst, B., Bjerking R. y Hoover, F. *Neoplasia* 3 (6): 469-479, 2002.
5. Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R. y Kanasawud, P. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1103-1107, 2006.