

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BROMELINA POR LOS MÉTODOS DE
EXTRACCIÓN: BIFASES ACUOSAS Y SALTING OUT CONTENIDA EN LOS
CORAZONES DE LAS TRES VARIEDADES DE PIÑA PROCESADAS EN LA
EMPRESA BETTERS INTERNATIONAL S.A.S.**

**MARTIN DAVID AGUDELO BETANCOURT
JENNIFER BIBIANA ALFONSO HERRERA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2019**

EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BROMELINA POR LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN: BIFASES ACUOSAS Y SALTING OUT CONTENIDA EN LOS CORAZONES DE LAS TRES VARIEDADES DE PIÑA PROCESADAS EN LA EMPRESA BETTERS INTERNATIONAL S.A.S.

**MARTIN DAVID AGUDELO BETANCOURT
JENNIFER BIBIANA ALFONSO HERRERA**

**Proyecto integral de grado para optar por el título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
Alejandra Salinas Barreto
Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2019**

Nota de aceptación:

Firma del jurado 1
Jaime Eduardo Arturo Calvache

Firma del jurado 2
Javier Francisco Rey Rodríguez

Bogotá D.C. Febrero de 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dr. Ana Josefa Herrera Vargas

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

El desarrollo del trabajo de grado el cual fue hecho con mucha dedicación, esmero y esfuerzo se lo dedico a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por motivarme constantemente a alcanzar mis sueños, agradezco porque siempre han estado en mi proceso de formación, además por el apoyo incondicional, por su tiempo y amor; muchos de mis logros se los debo a ellos.

Agradezco a mi hermano Harol por el apoyo absoluto a lo largo de mi vida, por su compañía que siempre me brinda en cada etapa de mi formación y culminación de la carrera.

A mi compañera de tesis, por su paciencia, comprensión, esfuerzo y dedicación en el desarrollo del trabajo de grado.

A mi familia, quienes me han aportado grandes cosas en mi vida y dado la confianza dar lo mejor de mí, por todos los buenos momentos que he pasado con cada uno de ellos.

A mis amigos quienes sin esperar nada a cambio comparten su conocimiento, alegría, apoyo, buena vibra que estuvieron en mi formación de carrera.

Y en general a todas las personas que estuvieron presentes en nuestro proceso de formación de carrera, realización del proyecto por todo el apoyo y confianza por haber podido lograr uno de mis grandes sueños.

.

Martin David Agudelo Betancourt

DEDICATORIA

Este trabajo el cual fue hecho con mucha dedicación, esmero y esfuerzo se lo dedico en primer lugar a Dios, el cual me brindo paz y armonía para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco a mi Padre Fernando Rodríguez, quien ha sido mi mayor inspiración, me ha enseñó a ser fuerte; le doy las gracias por brindarme su compañía, protección, amor y tiempo en cada proceso de mi vida.

Agradezco a mi Mama Sandra Herrera, quien me ha dado la mejor formación y valores en mi vida, por darme siempre ese aliento cuando decaigo, por preocuparse cada minuto por mi bienestar y por su amor incondicional.

Además es dedicado a mi Tia Mary quien ha sido siempre mi ejemplo a seguir, por impulsarme a dar lo mejor de mí, fue quien hizo posible mi formación académica y quien me colaboro en todo el proceso de mi carrera profesional.

A mis hermanos, abuelos y demás familia por las enseñanzas, momentos y apoyo incondicional que me han brindado.

A mi compañero de tesis, por su paciencia, entrega, comprensión, buena actitud frente a las adversidades, esfuerzo y dedicación en cada proceso del desarrollo del trabajo y en general de la carrera y por todos los momentos, experiencias, enseñanzas que nos han servido para avanzar en nuestra vida.

A la vida quien me permitió dar lo mejor de mí, a pesar de los errores y obstáculos cometidos, pero lo importante fue dar solución a cada uno de ellos y de los que no tuvieron solución, aprender.

Y en general a todas las personas que estuvieron presentes en nuestro proceso de formación de carrera y realización del proyecto.

Finalmente también a las personas que tengan la oportunidad de leer este trabajo ya que se enriquecerán de conocimientos y formaran bases para el desarrollo o avance de su propio proyecto.

Jennifer Bibiana Alfonso Herrera

AGRADECIMIENTOS

A la empresa BETTERS INTERNATIONAL S.A.S por darnos la oportunidad de realizar el proyecto y por confiar en nuestras capacidades para el desarrollo del trabajo.

A la Ing. Alejandra Salinas por siempre tener la mejor disposición, entrega frente al proyecto, sus consejos y acompañamiento nos sirvió para el desarrollo del trabajo de grado.

A la Ing. Martha Acosta por sus conocimientos, experiencia, anécdotas, buena energía y actitud que nos brindó en el proceso experimental del trabajo.

Al Tecnoparque – Servicio Nacional de aprendizaje SENA, área de biotecnología y nanotecnología por prestarnos las instalaciones para el desarrollo de nuestro proyecto, por la atención y disposición que siempre recibimos.

A nuestros amigos y compañeros que nos apoyaron y ayudaron en el proceso de la elaboración del proyecto.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	22
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	25
1. GENERALIDADES	26
1.1 PIÑA (<i>Ananas comosus</i>)	26
1.1.1 Variedad Amazónica (<i>Ananas comosus</i> (L. Merr) c.v. India)	29
1.1.2 Variedad Golden MD2 (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.)	31
1.1.3 Variedad Mayanes ó Piña llano Moreno	32
1.2 GRADO DE MADUREZ SEGÚN COLOR	33
1.3 BROMELINA	35
1.3.1 Propiedades químicas	35
1.3.2 Propiedades físicas	36
1.3.3 Aplicaciones	37
1.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	38
1.4.1 Métodos mecánicos	38
1.4.1.1 Molino de cuchillas	38
1.4.1.2 Molino coloidal	38
1.4.1.3 Equipo ultrasónico	39
1.4.2 Métodos no mecánicos	39
1.4.2.1 Métodos químicos	39
1.4.2.2 Métodos enzimáticos	39
1.4.3 Métodos de purificación de proteínas	40
1.4.3.1 Ultrafiltración	40
1.4.3.2 Microfiltración	41
1.4.3.3 Precipitación de proteínas	41
1.4.3.4 Sistema acuoso de dos fases (ATPS)	42
2. MATERIALES Y METODOLOGÍA	44
2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS	44
2.1.1 Reactivos	44
2.1.2 Equipos	46
2.2 METODOLOGÍA	49
2.2.1 Recepción de corazones de las tres variedades de piña	49
2.2.2 Acondicionamiento	49
2.2.2.1 Obtención de jugo de corazón de las variedades de piña analizadas	50
2.2.3 Caracterización de materias primas	51
2.2.3.1 Humedad	51
2.2.3.2 Grados Brix	53

2.2.3.3	Acidez titulable	53
2.2.3.4	pH	54
2.2.3.5	Determinación de concentración de Bromelina (Método de Biuret)	54
2.2.3.6	Determinación de Actividad enzimática – Unidad de Tirosina	56
2.2.4	Extracción de Bromelina	61
2.2.4.1	Sistema bifásico acuoso (ATPS)	61
2.2.4.2	Extracción de Bromelina por Salting Out	64
2.3	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	65
2.3.1	Factores y niveles para Salting Out	66
2.3.2	Factor y tratamiento para sistema bifásico acuoso (ATPS)	67
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	69
3.1	ACONDICIONAMIENTO	69
3.2	CARACTERIZACIÓN DE MATERIA PRIMA	70
3.2.1	Humedad	70
3.2.2	Grados Brix	70
3.2.3	Acidez titulable	71
3.2.4	pH	72
3.2.5	Determinación de concentración de Bromelina (Metodo Biuret)	73
3.2.6	Determinación de actividad enzimática (Curva Tirosina)	73
3.3	EXTRACCIÓN DE BROMELINA	75
3.3.1	Sistema bifásico acuoso (ATPS)	75
3.3.1.1	Variedad Amazónica	79
3.3.1.2	Variedad Mayanes	80
3.3.1.3	Variedad Golden MD2	82
3.3.2	Precipitación salina - Salting Out	84
3.3.2.1	Variedad Amazónica	84
3.3.2.2	Variedad Mayanes	85
3.3.2.3	Variedad Golden MD2	87
4.	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	90
4.1	DESCRIPCIÓN GENERAL	90
4.2	ESCALADO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BROMELINA	91
4.3	BALANCES DE MATERIA	92
4.3.1	Balances para métodos de extracción enzimática	94
4.3.1.1	Precipitación salina – Salting Out	94
4.3.1.2	Bifases acuosas (ATPS)	96
4.4	BALANCES DE ENERGÍA	99
4.5	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE EQUIPOS	101
4.5.1	Distribución del proceso.	110
4.5.1.1	Precipitación salina – Salting Out	110
4.5.1.2	Sistema bifásico acuoso – ATPS	112
5.	COSTOS DE INVERSIÓN Y OPERACIÓN	114
5.1	COSTOS DE INVERSIÓN	114

5.1.1	Costos de inversión método Salting Out	114
5.1.2	Costos de inversión método bifases acuosas (ATPS)	115
5.2	COSTOS DE OPERACIÓN	116
6.	CONCLUSIONES	120
7.	RECOMENDACIONES	121
	BIBLIOGRAFÍA	122
	ANEXOS	128

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Taxonomía Piña.	27
Tabla 2. Caracterización piña Amazónica en estado maduro.	30
Tabla 3. Tabla nutricional de la piña Golden MD2 para 100g.	31
Tabla 6. Volúmenes para construcción curva de calibración.	56
Tabla 7. Diluciones para toma de absorbancias.	57
Tabla 8. Dosificaciones a realizar para cada variedad en % peso/peso.	62
Tabla 9. Factores y niveles - Salting Out.	66
Tabla 10. Corrida experimental - Salting Out.	66
Tabla 11. Factor y tratamientos para Sistema bifásico acuoso ATPS.	68
Tabla 12. Rendimiento de centrifugación.	69
Tabla 13. Humedad corazones de piña.	70
Tabla 14. Grados Brix de cada una de las variedades estudiadas.	71
Tabla 15. %p/p de Ácido cítrico en cada variedad.	71
Tabla 16. pH de jugo crudo.	72
Tabla 17. Concentración de bromelina en jugos extraídos crudos.	73
Tabla 18. Actividad enzimática para extractos de jugo crudos.	73
Tabla 19. Caracterización de Corazones.	74
Tabla 20. %p/p de componentes en sistema bifásico acuosos.	75
Tabla 21. Volúmenes de fases para la variedad Amazónica.	77
Tabla 22. Volúmenes de fases para la variedad Mayanes.	77
Tabla 23. Volúmenes de fases para la variedad Golden MD2.	77
Tabla 24. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Amazónica.	78
Tabla 25. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Mayanes.	78
Tabla 26. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Golden MD2.	79
Tabla 27. Concentraciones de Bromelina Sistema bifásico acuoso (ATPS).	79
Tabla 28. Análisis de varianza para variedad Amazónica – ATPS.	80
Tabla 29. Análisis de varianza para variedad Mayanes - ATPS.	81
Tabla 30. Análisis de varianza para variedad GOLDEN MD2 - ATPS.	82
Tabla 31. Resumen selección de parámetros para bifases acuosas ATPS.	83
Tabla 32. Análisis de varianza para variedad Amazonica – Salting Out.	84
Tabla 33. Análisis de varianza para variedad Mayanes – Salting Out.	86
Tabla 34. Análisis de varianza para variedad Golden MD2 – Salting Out.	87
Tabla 35. Resumen condiciones óptimas para procesamiento por Salting Out	88
Tabla 36. Dimensiones refrigerador 800 L.	103
Tabla 37. Dimensiones Extractor de jugo 120 kg/h	104
Tabla 38. Dimensiones centrifugadora de discos AC2000.	105
Tabla 39. Dimensiones tanque de agitación de 300L	107
Tabla 40. Dimensiones Refrigerador para desarrollo de precipitación salina.	108
Tabla 41. Dimensiones refrigerador Bromelina.	109
Tabla 42. Dimensiones tanque de precipitado ATPS – 300 L.	110
Tabla 43. Convenciones plano 1.	111

Tabla 44. Convenciones plano 2	113
Tabla 45. Costos de equipos – Salting Out	114
Tabla 46. Costos de equipos – Bifases acuosas (ATPS)	115
Tabla 47. Costo materias primas – Precipitación salina (Salting Out)	116
Tabla 48. Costo de materias primas - Bifases acuosas (ATPS)	116
Tabla 49. Costo para servicio energético – Precipitación salina (Salting Out)	117
Tabla 50. Costo para servicio energético – Sistema bifásico acuoso (ATPS)	118
Tabla 51. Costo mano de obra – Precipitación salina (Salting Out)	118
Tabla 52. Costo mano de obra – Bifases acuosas (ATPS)	119
Tabla 53. Costos de operación e inversión	119
Tabla 55. Cantidades de sulfato de amonio a agregar para 1 L de solución	129
Tabla 57. Absorbancias para cada concentración preparada	130

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura morfológica del fruto de la piña en estado de madurez.	28
Figura 2. Escala de maduración según color para fruto fresco de Piña	34
Figura 3. Estructura de la Bromelina.	36
Figura 4. Extracción de proteínas mediante el sistema acuoso de dos fases.	43
Figura 5. Extracción jugo corazón de Piña.	51
Figura 6. Solución de jugo titulada	72
Figura 7. Sistema bifásico acuoso ATPS.	76
Figura 8. Fases sistema bifásico acuoso.	76
Figura 9. Refrigerador para almacenamiento de 800 L.	103
Figura 10. Extractor industrial de jugo y plato rotacional.	104
Figura 11. Centrifugadora de discos.	105
Figura 12. Tanque de agitación de 300 L.	106
Figura 13. Refrigerador solución precipitación salina 500 L.	107
Figura 14. Refrigerador Bromelina – 183 L.	108
Figura 15. Tanque de precipitado – 300 L.	109
Figura 16. Soluciones curva de calibración - Método Biuret	131

LISTA DE BALANCES DE MATERIA

	pág.
Balance de materia 1. Extracción de jugo.	92
Balance de materia 2. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Amazónica.	93
Balance de materia 3. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Mayanes.	93
Balance de materia 4. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Golden MD2.	94
Balance de materia 5. Precipitación salina para variedad Amazónica.	94
Balance de materia 6. Precipitación salina para variedad Mayanes.	95
Balance de materia 7. Precipitación salina para variedad Golden MD2.	95
Balance de materia 8. Sistema bifásico acuoso para variedad Amazónica.	96
Balance de materia 9. Sistema bifásico acuoso para variedad Mayanes.	97
Balance de materia 10. Sistema bifásico acuoso para variedad Golden MD2.	98

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Determinación de humedad.	53
Ecuación 2. Determinación de acidez	54
Ecuación 3. Determinación actividad enzimática.	61
Ecuación 4. Coeficiente de partición de actividad enzimática.	63
Ecuación 5. Coeficiente de partición de Bromelina.	63
Ecuación 6. Factor de purificación.	63
Ecuación 7. Balance de materia extracción de jugo.	92
Ecuación 8. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Amazónica.	93
Ecuación 9. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Mayanes.	93
Ecuación 10. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Golden MD2.	94
Ecuación 11. Balance de materia precipitación salina – Variedad Amazónica.	94
Ecuación 12. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Amazónica.	94
Ecuación 13. Balance de materia precipitación salina – Variedad Mayanes.	95
Ecuación 14. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Mayanes.	95
Ecuación 15. Balance de materia precipitación salina – Variedad Golden MD2.	95
Ecuación 16. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Golden MD2.	95
Ecuación 17. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Amazónica.	96
Ecuación 18. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Amazónica.	96
Ecuación 19. Bromelina extraída ATPS – Variedad Amazónica.	97
Ecuación 20. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Mayanes.	97
Ecuación 21. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Mayanes.	97
Ecuación 22. Bromelina extraída ATPS – Variedad Mayanes.	98
Ecuación 23. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Golden MD2.	98
Ecuación 24. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Golden MD2.	98
Ecuación 25. Bromelina extraída ATPS – Variedad Golden MD2.	99
Ecuación 26. Balance de energía para corazones de piña.	99
Ecuación 27. Potencia refrigerador de almacenamiento de corazones de piña.	100
Ecuación 28. Balance de energía para solución de jugo centrifugado y sulfato de amonio.	100
Ecuación 29. Potencia refrigerador para almacenamiento de solución de jugo centrifugado y sulfato de amonio.	100

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Acondicionamiento de jugo crudo.	50
Diagrama 2. Determinación de humedad.	52
Diagrama 3. Determinación de acidez titulable.	53
Diagrama 4. Elaboración curva de calibración - Albumina de suero bovino.	55
Diagrama 5. Determinación concentración de Bromelina en jugos extraídos crudos.	55
Diagrama 6. Construcción curva de Tirosina.	57
Diagrama 7. Preparación sustrato de Caseína.	58
Diagrama 8. Solución tampón de Cisteína.	59
Diagrama 9. Solución de parada de TCA (30%).	59
Diagrama 10. Determinación actividad enzimática.	60
Diagrama 11. Implementación sistema bifásico acuoso.	62
Diagrama 12. Precipitación salina - Salting Out.	64
Diagrama 13. Proceso de extracción de Bromelina	91
Diagrama 14. Proceso de precipitación salina - Salting Out	101
Diagrama 15. Proceso de sistema bifásico acuoso – ATPS.	102

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Porcentaje de saturación de sulfato de amonio para soluciones acuosas	129
Anexo B. Curva de calibración – Método biuret	130
Anexo C. Cotización reactivos	132
Anexo D. Proceso de escalamiento – Análisis dimensional	135

GLOSARIO

ALBUMINA SUERO DE BOVINO: proteína extraída del suero de bovino rica en aminoácidos esenciales.

CENTRIFUGACIÓN: método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria.

DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS: pérdida de la conformación tridimensional de la misma.

EXTRACCIÓN: procedimiento de separación de una sustancia que se disuelve en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad.

FILTRACIÓN: método de separación física utilizado para separar sólidos a partir de fluidos (líquidos o gases) mediante la interposición de un medio permeable que tiene como funcionalidad retener partículas sólidas que permite únicamente el paso de líquidos.

LIOFILIZACIÓN: es un proceso que tiene como objetivo separar el agua u otro solvente de una disolución por sublimación.

PRECIPITACIÓN SALINA: es un fenómeno físico-químico basado en las interacciones electrolito-no electrolito, en cual emplea concentraciones salinas altas, donde las proteínas precipitan debido a un aumento de las interacciones hidrofóbicas entre ellas.

POLÍMERO: macromoléculas formadas por la unión de enlaces covalentes de uno o más monómeros.

PROTEÍNAS: moléculas formadas por aminoácidos que están unidos por un enlaces peptídicos.

PURIFICACIÓN: es la separación física de una sustancia química de interés de contaminantes.

RENDIMIENTO: razón de jugo centrifugado sobre jugo sin centrifugar que describe el comportamiento del proceso de centrifuga.

RESIDUO: material que pierde utilidad tras haber cumplido con su misión o servicio para realizar un determinado trabajo.

SAL: compuestos formados por un metal y un no metal, obtenidos al sustituir el hidrogeno de un hidrácido por un metal.

SISTEMA BIFASICO ACUOSO (ATPS): es un equilibrio liquido-líquido que está compuesto por una disolución acuosa en la que se encuentran disueltos polímeros, polímero/sal o sales.

SOBRENADANTE: parte superior clara de cualquier mezcla después de ser centrifugada.

LISTA DE ABREVIATURAS

(% P/P): porcentaje peso a peso

ATPS: sistema bifásico acuoso

FD: factor de dilución

FP: factor de purificación

g: gramos

Kact: coeficiente de partición de actividad de Bromelina

Kprot: coeficiente de partición de proteína

L: litros

mL: mililitros

N: normalidad

PEG: polietilenglicol

rpm: revoluciones por minuto

TU/mL: unidad enzimática expresada en unidades de Tirosina

. : separador de decimales

, : separador de miles

‘ : separador de millones

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de los métodos Salting Out y Bifases acuosas (ATPS) para la extracción de Bromelina contenida en los corazones de piña de tres variedades, que son subproductos de los procesos de despulpado y pelado desarrollados por la empresa BETTERS International S.A.S. Cada una de las variedades fue caracterizada determinando su cantidad de humedad, grados brix, acidez titulable y pH antes del proceso de extracción de Bromelina; durante todo el proceso de desarrollo experimental se requirió el almacenamiento de la materia prima bajo refrigeración con el propósito de ralentizar su deterioro.

Seguido de esto se implementaron los dos procesos de extracción enzimática a cada una de las tres variedades trabajadas, que fueron: Amazónica, Mayanes y Golden MD2; se realizó un diseño experimental para cada método de extracción, con el propósito de evaluar estadísticamente la interacción de los factores sobre la variable respuesta. Para el proceso de Salting Out se seleccionaron como factores, el pH de la solución y porcentaje de saturación de la mezcla. La implementación del sistema de bifases acuosas (ATPS) generó dos fases en cada uno de los sistemas experimentales, la fase de interés fue la fase TOP de cada sistema donde se ubicó la mayor cantidad de Bromelina que había en el sistema, el factor evaluado fue la cantidad de fosfato de potasio dibásico presente en la solución.

Palabras clave: extracción enzimas, Salting Out, Sistema bifásico acuoso, Piña, Bromelina. Proteolítica

INTRODUCCIÓN

La empresa BETTERS International S.A.S. con sede en la ciudad de Bogotá, dedicada a la venta de frutas exóticas liofilizadas y deshidratadas, aceites y chocolates, todos estos elaborados con materias primas obtenidas en diferentes zonas del país. En las actividades desarrolladas por la empresa se ha evidenciado la gran cantidad de residuos que los procesos dejan. Una de la materias primas usadas para liofilización y deshidratación es la Piña, que deja un aproximado de 44.9% en masa de desechos (23% cascara, 17% corazón y 4% corona), los cuales no son aprovechados y que se dispone a las zonas destinadas. Actualmente se procesan tres tipos de piña: Amazónica, Mayanes y Golden MD2, donde solo el 55.1% se destina para procesamiento. La disposición de estos residuos en zonas del territorio nacional, que no cuentan con un plan de gestión de residuos o lugar donde realizar su correcta disposición, generan contaminación ambiental y visual, aparición de plagas y roedores, y sanciones legales por parte de las autoridades competentes que implican altos costos económicos.¹

Los desechos generados son llevados a zonas donde son enterrados para su posterior degradación, la cáscara y corazón son aprovechados en el desarrollo de proyectos e investigaciones buscando la producción de alcohol, la corona se usa como compostaje y fibra para reforzar materiales compuestos², por otro lado al ser toda la fruta rica en Bromelina se ha extraído por solventes orgánicos o sales, y purificado por precipitación de fuerzas iónicas, ultrafiltración y cromatografía de adsorción.³ Para dar un aprovechamiento significativo de las propiedades y componentes de la piña, se propone la extracción de Bromelina, ya que dentro de todos los componentes activos de la fruta, es el que ha presentado mayor interés durante los últimos años y del que se pueden obtener múltiples provechos. La Bromelina es una enzima proteolítica, que consiste en una cisteína proteinasa de naturaleza ácida, tiene importantes aplicaciones dentro del área de Biotecnología, usándose en la industria alimenticia como ablandador de carne, fabricación de cerveza y quesos. En medicamentos se usa como antiinflamatorio, anticoagulante y agente antitumoral del sistema digestivo.⁴

En el presente trabajo se desarrolla la extracción de Bromelina, donde el jugo de Piña se somete a un acondicionamiento que involucra la separación del material

¹ RODRIGUEZ, Romelino, et al. Producción de frutos de Piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2 a partir de Vitroplantas. En: Cultivos Tropicales. 2016, no. 37. 41 p. ISSN 1819-4087.

²TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACION Y LAS COMUNICACIONES DE LA ORINOQUIA. Aprovechamiento residuos biomasa de producción de Piña (*Ananas comosus*) para municipio de Aguazul Casanare, 2014. 151 p,

³ DALGO, Violeta. Obtención de un concentrado con Bromelina a partir de Piña (*Ananas comosus*), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de ciencia e ingeniería de alimentos. Ingeniería Bioquímica. 2012. p. 25.

⁴ GALLARDO, Linda, et al. Extracción de Bromelina a partir de residuos de Piña. México: Universidad Politécnica de Puebla. Posgrado en ciencias ambientales. 2008. p. 4.

fibroso y recuperación del sobrenadante que es sometido a los procesos de extracción enzimática los cuales son: Salting Out y Sistema bifásico acuoso (ATPS).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la obtención de Bromelina por los métodos de extracción Bifases Acuosa y Salting Out contenida en los corazones de las tres variedades de piña procesadas en la empresa BETTERS International S.A.S.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los corazones de las tres variedades de piña a procesar.
2. Obtener Bromelina por los métodos de extracción Bifases Acuosa y Salting Out para las tres variedades de piña.
3. Establecer las especificaciones técnicas del proceso.
4. Estimar los costos de inversión y operación del proceso.

1. GENERALIDADES

Con el objetivo de dar un panorama al tema que se desarrolló en el presente trabajo de grado, es de gran importancia la aclaración de ciertos conceptos como lo son: la descripción de las variedades de Piña (*Ananas comosus*) trabajadas, descripción de la proteína Bromelina y por último los métodos de extracción y purificación de proteínas que se implementan en la actualidad; con lo anterior se podrá tener un panorama más claro para entender el propósito del trabajo.

1.1 PIÑA (*Ananas comosus*)

La piña (*Ananas comosus*) pertenece a la familia de las bromeliáceas dentro del género de *Ananas* y de especie *comosus*⁵ (Ver tabla 1), actualmente la piña comprende 56 géneros y 3000 especies donde se destacan *Ananas sativus*, *Ananas comosus*, *Ananas lucidus*⁶; se originó en América del sur, entre Brasil, Paraguay y el norte de Argentina; su fruto tiene forma cilíndrica, es fibroso y cuenta con un buen aroma debido a la presencia de esteres, cultivado de manera satisfactoria en altitudes entre los 800 y 1200 metros sobre el nivel del mar, sin embargo dependiendo de la variedad del fruto también se puede cultivar a nivel del mar. Demanda un suelo con propiedades permeables al aire, con un pH óptimo de 5 a 5.8⁷.

⁵ MAG. Generalidades de la actividad. En: Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agro cadena de Piña en la región Huetar Norte. Ciudad Quesada, Costa Rica: Septiembre, 2007. p. 25.

⁶ BASANTES, Santiago A. y CHASIPANTA, José U. Determinación del requerimiento nutricional del fosforo sobre la inducción floral en el cultivo de piña. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. Sangolqui, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. 2012. p. 8.

⁷ DANE. Principales características del cultivo de la Piña (*Ananas comosus* L.). Variedades de Piña más importantes en Colombia. 54 ed. Colombia. 2016. p. 1.

Tabla 1. Taxonomía Piña.

Reino	Planta
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Orden	<i>Bromeliales</i>
Familia	<i>Bromeliaceae</i>
Subfamilia	<i>Bromelioideae</i>
Genero	<i>Ananas</i>
Especie	<i>comosus</i>

Fuente: GARCIDUEÑAS, Jose. Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento *in vitro*. México: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de fitotecnia, 2013. p. 7.

Está conformada por un conglomerado de hojas duras, más o menos espinosas, que se organizan alrededor de un tallo el cual tiene la función de eje⁸, para su correcto desarrollo la temperatura del cultivo no puede ser menor a 25 °C lo cual garantiza un crecimiento normal y su buena fructificación, es un cultivo que no demanda grandes cantidades de agua⁹, a cambios bruscos de temperatura el desarrollo morfológico se ve afectado, por esta razón se presentan maduraciones prematuras¹⁰. Luego de la maduración la planta busca lograr una reproducción a partir de brotes generados en las yemas axilares; la planta adulta logra alcanzar una altura y anchura de 1 a 2 metros¹¹, el fruto presenta una parte comestible correspondiente al 60% del fruto fresco, que se compone de los ovarios, brácteas, corteza del eje y bases de los sépalos (Ver figura 1).

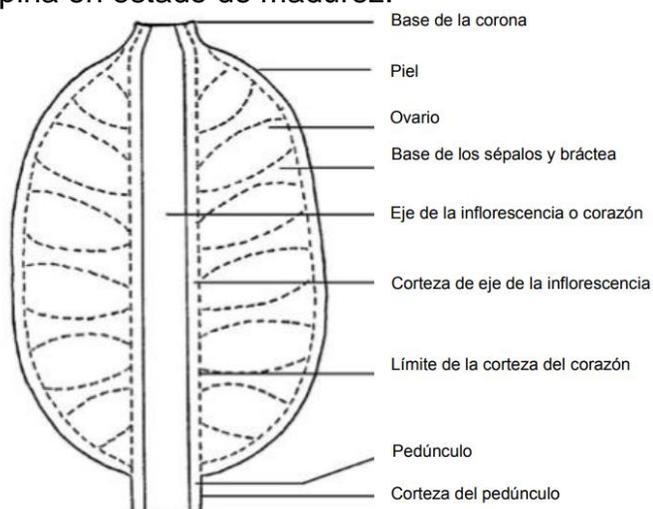
⁸ PIÑA [en línea]. Nations Unies CNUCED, 2011- [citado en 14 de Julio 2018]. Disponible en Internet: <http://unctad.org/es/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp09_Pineapple_es.pdf> p. 3.

⁹ Ibid., p. 4.

¹⁰ BASANTES, Op. cit., p. 25.

¹¹ GARCIDUEÑAS, José. Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento *in vitro*. México: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de fitotecnia, 2013. p.11.

Figura 1. Estructura morfológica del fruto de la piña en estado de madurez.



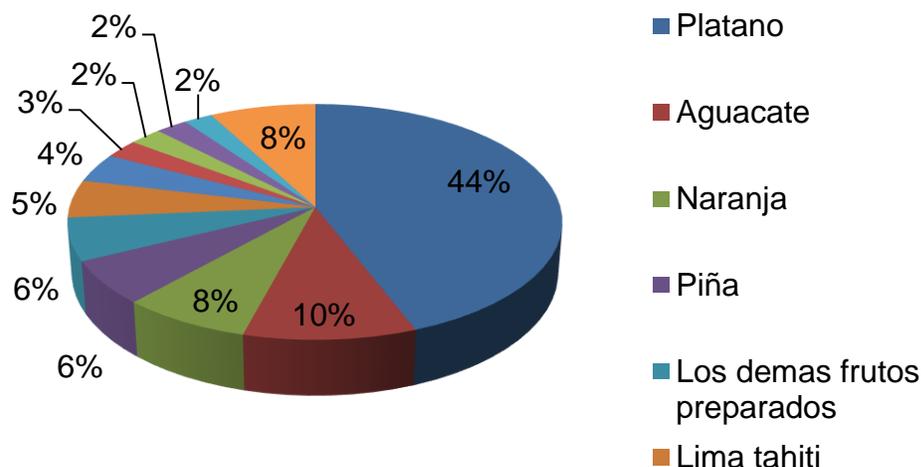
Fuente: GARCIDUEÑAS, José. Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento *in vitro*. México: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de fitotecnia, 2013. p. 16.

Es la tercera fruta tropical más importante a nivel comercial en el mundo seguida del banano y los cítricos.¹² En la actualidad la piña ocupa parte del protagonismo dentro de las exportaciones de hortofrutícolas, según ASOHOFRUCOL durante el periodo de Enero a Diciembre del año 2017 se exportaron 14,210 toneladas de Piña, abarcando el 6.0% de las exportaciones (Ver grafica 1). El cultivo permite ser sembrado durante todo el año solo si se cuenta con un sistema de riego, la profundidad de siembra es un factor determinante debido a que en la maduración se pueden presentar eventos de rasgado o volcamiento de la planta.¹³

¹² MURCIA, Dora; TOVAR, María y TOVAR, María E. Propiedades físicas, químicas y mecánicas de la piña Golden y Mayanes utilizada para la indumentaria en Bogotá. *En: Teoría y Praxis investigativa*. Bogotá, Colombia. Julio-Diciembre, 2013, no.2. p. 34.

¹³ SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION. Planeación agrícola nacional 2017 – 2030. México, 2017. 16 p.

Grafica 1. Principales productos importados (2017) – Colombia.



Fuente: ASOHOFRUCOL. Balance del sector Hortifruticultor en 2017. Colombia. Diciembre, 2017. p. 13.

Esta fruta es rica en agua, tiene una participación de hasta un 87%, contiene carbohidratos, fibra, proteína vegetal, cuenta con vitaminas C, B9, B3, además posee minerales tales como el potasio, magnesio, calcio, fósforo, yodo, hierro y zinc. La piña es una de las frutas tropicales más apetecidas por su excelente sabor, propiedades medicinales y alimenticias. Es la tercera fruta más importante del mundo, el 70% de la piña es consumida como fruta fresca¹⁴; contiene enzimas como la Bromelina, fosfatasa acida, ananaina, carboxipeptidasa, celulasa, peroxidasa y fosfatasa¹⁵.

1.1.1 Variedad Amazónica (*Ananas comosus* (L. Merr) c.v. India). La piña amazónica es una fuente importante de ácido ascórbico, es rica en carbohidratos, vitamina y minerales, aporta lípidos y fibra a la dieta humana.¹⁶

Basados en Soledad y et al¹⁷, la piña nativa amazónica a lo largo de su proceso de cultivo atraviesa por una variedad de tonalidades, en un principio con tonalidades

¹⁴ GARCIA, Yelene, et al. Determinación de las propiedades de calidad de la piña (*Ananas comosus*) variedad Cayena lisa almacenada a temperatura ambiente. En: Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 2011. vol 20, no. 01, p. 62.

¹⁵ POLAINA, Julio. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, Citado por MAGALLANES, Jhon y SALCEDO, Nancy. Extracción, caracterización y secado por aspersion de Bromelina cruda obtenida a partir de residuos de Piña "Perolera" (*Ananas Comosus*). Tesis de grado Ingeniería de Alimentos. Guayaquil, Ecuador.: Escuela Superior Politécnica del Litoral. 2013. p. 7.

¹⁶ MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Colombia Frutas de la amazonia. Bogotá, 2008. 36 p.

rojas y violeta hasta llegar a un color opaco entre amarillo y verde. Los cultivos de piña ubicados en el pie de monte amazónico tienen una fase vegetativa que comprende desde su siembra hasta los inicios de su fase reproductiva una duración de 14 a 16 meses y otra etapa posterior del mes 17 al 31 que involucra la aparición de la flora y posterior cosecha. Los frutos en el momento de su cosecha presentan una coloración marrón con bordes amarillos y verdes, su pulpa tiene un color entre blanco y amarillo pálido, presentando una estructura carnosa y sabor dulce.

A continuación se presenta la caracterización del fruto maduro de piña (*Ananas comosus* c.v. India):

Tabla 2. Caracterización piña Amazónica en estado maduro.

Variable	Contenido
Materia seca	8.46%
Humedad	84.5 - 88%
Proteína	0.78 - 3.20%
Extracto etéreo	1.54 - 5.56%
Pectina	0.86%
Hidratos de carbono	6.79%
Fibra total	6.26%
Fibra cruda	1.29%
Cenizas	0.22% ¹⁸
Vitamina C	14.08 mg/100 g
Calcio	134.12 mg/100g
Potasio	2445.0 mg/100g
Fósforo	1.41 mg/100g
Hierro	8.5 mg/100g

Fuente: Barrera et al.,2001; Hernández (2000); Morales (2001); Oviedo (2000), Citado por SOLEDAD, María, et al. Aspectos biológicos y conservación pos cosecha de la piña nativa (*Ananas comosus* L. Merr v.v. India) en la Amazonia Occidental Colombiana. En: Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia. Bogotá D.C.: Dioned Victoria González, 2004. p. 63.

¹⁷ SOLEDAD, María, et al. Aspectos biológicos y conservación pos cosecha de la piña nativa (*Ananas comosus* L. Merr v.v. India) en la Amazonia Occidental Colombiana. En: Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia. Bogotá D.C.: Dioned Victoria González, 2004. p. 59-84.

¹⁸ MIHALACHE, Loor. Análisis de la demanda de la piña en el mercado de España. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de ciencias administrativas. Ingeniería en Comercio Exterior. 2015. p. 22.

Su principal característica es tener un sabor ácido y su principal forma de uso es como jugo de fruta. A partir de su pulpa se pueden fabricar mermeladas, confites y salsas. Posee un alto contenido de vitamina C y antocianinas, esto le confiere una importante acción antioxidante que ayuda a prevenir de manera paulatina el cáncer, enfermedades del corazón, disminución de estrés, además su acción antioxidante protege al organismo de los radicales libres.¹⁹

1.1.2 Variedad Golden MD2 (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Está variedad es un híbrido proveniente de la Cayena lisa, actualmente cuenta con una mayor favorabilidad en el mercado gracias a su alto contenido de sólidos solubles lo que le confiere ser la variedad de piña más dulce del mercado, por otro lado es una planta de rápido crecimiento y en consecuencia de un ciclo de producción menor en comparación a otras variedades. La piña Golden MD2 tiene un alto porcentaje de vitaminas A, B1, B6, C y E, junto con minerales como lo son cobre, potasio, magnesio, manganeso y yodo los cuales están distribuidos entre la fibra y el agua que los contiene. Estos componentes hacen que el fruto cuente con propiedades que contribuyen a una dieta sana.²⁰

Tabla 3. Tabla nutricional de la piña Golden MD2 para 100g.

Nutriente	Cantidad
Calorías	46 kcal
Proteína	0.5 g
Hidratos de carbono	11.5 g
Fibra	1.2 g
Calcio	12 mg
Hierro	0.5 mg
Sodio	3 mg
Potasio	250 mg
Magnesio	14 mg
Fósforo	11 mg
Vitamina E	0.1 mg
Yodo	30 mg
Vitamina C	20 mg
Vitamina A	13 mg
Ácido fólico	11 µg

Fuente: GARZON, Javier. Establecimiento y manejo de un cultivo de piña en la sede de la asociación de ingenieros agrónomos del llano en Villavicencio. Colombia: 2016. p. 24.

¹⁹ MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Colombia Frutas de la amazonia, Op. cit., p. 20.

²⁰ BASANTES, Op. cit., p. 8.

Tiene un tamaño uniforme de aproximadamente 20 a 25 cm de alto lo que la hace ser la variedad más pequeña dentro de las demás, su peso promedio es de 1.8 a 2.0 kg por fruto²¹, el color de la pulpa es muy llamativo por ser un amarillo encendido, compacto y altamente fibroso, además de ser dulce y compacta; posee un alto contenido de azúcar (15 - 17°Brix) y también de ácido ascórbico. Su corazón es comestible, delgado y muy suave; características bastante significativas a la hora de su consumo²², otra de sus cualidades que la hacen una variedad de altos estándares de calidad es la baja tendencia a la oxidación, de igual forma presenta mayor resistencia a plagas y enfermedades; este fruto híbrido presenta gran fortaleza en el mercado internacional por las características ya mencionadas. Dentro de sus desventajas se encuentra la baja firmeza de su corteza conformada por la aglomeración de brácteas, siendo esto un problema en el momento de su transporte²³. A lo largo del territorio nacional, esta variedad se cultiva en los departamentos de Caldas, Valle del Cauca, Santander, Quindío y Meta.

Ayuda con la correcta evacuación de alimentos en el organismo, previene problemas de estreñimiento, retención de líquidos, problemas estomacales. De la misma manera previene el envejecimiento y ayuda a mantener la piel limpia y suave.

1.1.3 Variedad Mayanes ó Piña llano Moreno. Es una especie nativa que se originó en la inspección de Maya, perteneciente al municipio de Paratebuena (Cundinamarca), sus principales características involucran ser un fruto endémico, sin procesos químicos; tiene un alto nivel de dulzor lo cual hace que se vea favorecido en su alto consumo. Posee vitaminas B1, B6, C, E, ácido fólico y cítrico, proporciona minerales como lo son potasio, magnesio y yodo. Esta especie es bastante apetecida por poseer una textura muy suave, no lastima el paladar y esta característica hace que sea una de las mejores especies del país. Presenta una gran variedad de tamaños debido a la aridez de la tierra en donde es sembrada, suceso que la hace apetecida al consumidor según sus requerimientos y presupuesto. El peso promedio de la piña oscila entre (2 kg - 2.5 kg).²⁴

Una de sus principales ventajas es poseer un alto rendimiento de Bromelina, además de ser cultivada en los llanos orientales, varios agrónomos admiten que

²¹ GARZON, Javier. Establecimiento y manejo de un cultivo de piña en la sede de la asociación de ingenieros agrónomos del llano en Villavicencio. Colombia: Universidad de los Llanos. Facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales. Escuela de ingeniería y ciencias agrónomas. Ingeniería Agronómica. 2016. p. 26.

²² MARCA, Carlos. Fertilización mineral y bio fertilización en piña (*Ananas comosus* L. Merr) cv. "GOLDEN" EN RIO NEGRO (SATIPO). Lima: Universidad nacional agraria la Molina. Ingeniería Agrónoma. 2017. p. 20.

²³ RODRIGUEZ, Romelio y et al. Producción de frutos de piña (*Ananas comosus* L. Merr) MD-2 a partir de Vitroplantas. En: Cultivos Tropicales. 2016, vol. 37, no. especial, p. 40 – 48.

²⁴ MURCIA, Dora; TOVAR, María y TOVAR, María E. Op. cit., p. 35.

en esta región las características estructurales de los suelos, las condiciones climáticas y geográficas hacen que sea la mejor zona del país para el cultivo de la piña.²⁵ Esta especie es uno de los motores económicos de la región, la economía es altamente controlada por la comercialización de esta variedad. Los productores ejecutan la agricultura verde u orgánica, lo que le confiere al producto ser natural debido a que es libre de sustancias químicas. La piña Mayanes tiene propiedades significativas en procesos de digestión, acidez estomacal, pesadez, llenura, problemas intestinales debido a que tiene un alto contenido de fibra, además de ser un diurético 100% natural, lo cual proporciona mejoría en problemas de obesidad.²⁶

La piña Mayanes es cultivada en mayor proporción en los llanos orientales por eso es llamada también “*Llano moreno*”, abarca el 13.51% de la producción en el país²⁷, también es cultivada en los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Quindío.²⁸

1.2 GRADO DE MADUREZ SEGÚN COLOR

Según la norma NTC 729-1 que especifica el estado para frutos frescos de Piña, el color del fruto permite conocer su estado de maduración. La escala brindada por la norma técnica se presenta a continuación.

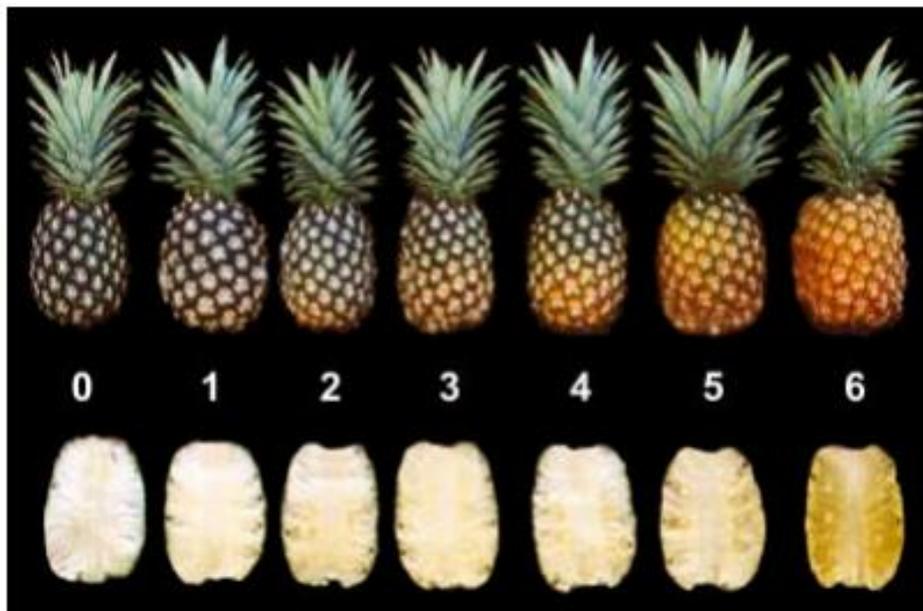
²⁵ RUA, Edwin; BARRERA, Andrea y PINZON, Benjamín. Caracterización y diagnóstico de la cadena productiva de la piña en el departamento del Casanare. En: Revista Estrategia Organizacional. Marzo – Junio, 2016, no. 5. p. 26. ISSN 2339-3866.

²⁶ RIVERA, Robert y SALGADO, Didier. Sistematización de las técnicas ancestrales empleadas en la siembra y cultivo de la piña en el municipio de Paratebuena. Villavicencio: Corporación Universitaria Minuto de Dios. Tecnólogo en comunicación gráfica. 2017. p. 24.

²⁷ COMISIÓN REGIONAL DE COMPETITIVIDAD DEL CASANARE. Plan sectorial para la producción de piña en el departamento del Casanare y su comercialización competitiva. Colombia. 2015. 108 p.

²⁸ MURCIA, Dora; TOVAR, María y TOVAR, María E. Op. cit., p. 35.

Figura 2. Escala de maduración según color para fruto fresco de Piña



Fuente: COLOMBIA. INCONTEC. 21 de Agosto de 1996. NTC 729-1. Frutas frescas. Piña. Especificaciones. p. 1-12.

COLOR 0: Color verde oscuro.

COLOR 1: El color de las brácteas a disminuido en la intensidad del color verde y pasa a ser amarillo.

COLOR 2: La cantidad de brácteas de color verde pasan a ser amarillas en la base del fruto.

COLOR 3: La intensidad del color amarillo aumenta en las brácteas de la tercer parte inferior.

COLOR 4: Las brácteas de la zona basal pasa de color amarillo a anaranjado.

COLOR 5: En la zona media las brácteas pasan de amarillo a anaranjado y las brácteas cercanas a la zona de la corono se tornan de color amarillento.

COLOR 6: La tonalidad de la totalidad de las brácteas es de color anaranjado.²⁹

²⁹ COLOMBIA. INCONTEC. 21 de Agosto de 1996. NTC 729-1. Frutas frescas. Piña. Especificaciones. p. 1-12.

1.3 BROMELINA

La Bromelina es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en proteínas, esta glicoproteína se encuentra en la piña, la cual pertenece a la familia de las bromeliáceas. Esta enzima se encuentra distribuida tanto en la pulpa, cascara y el tallo de la piña³⁰. Su pH óptimo se encuentra en un rango de 5 a 8, tiene un peso molecular de 24.5 kDa, compuesta por cinco enzimas proteolíticas que se diferencian entre sí por su actividad de óxido reducción (Cisteína, Actina, Miosina, Elastina y Reticulina)³¹, contiene 212 aminoácidos reductores, incluyendo 7 cisteínas; actúa de manera preferencial sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, principalmente sobre cadenas de péptidos cortos³², su tolerancia térmica es baja. La enzima cuenta con la facultad de digerir aproximadamente 1,000 veces su peso en proteínas, llegando a tener una actividad enzimática análoga a la Papaína contenida en la Papaya (*Carica papaya*); cuenta con un lugar activo compuesto por un agrupamiento tiol (SH) libre.³³.

1.3.1 Propiedades químicas. La Bromelina es una glicoproteína que está compuesta de un oligosacárido por molécula, este está unido a la cadena peptídica, además posee aminoácidos como los son ácido aspártico, arginina, serina, prolina, alanina, valina, glicina, entre otros³⁴.

³⁰ PULIDO, Analleli. Estudio Técnico - Económico para la fabricación de Bromelina. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico Industrial. México D.F. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas. 2007. p. 14.

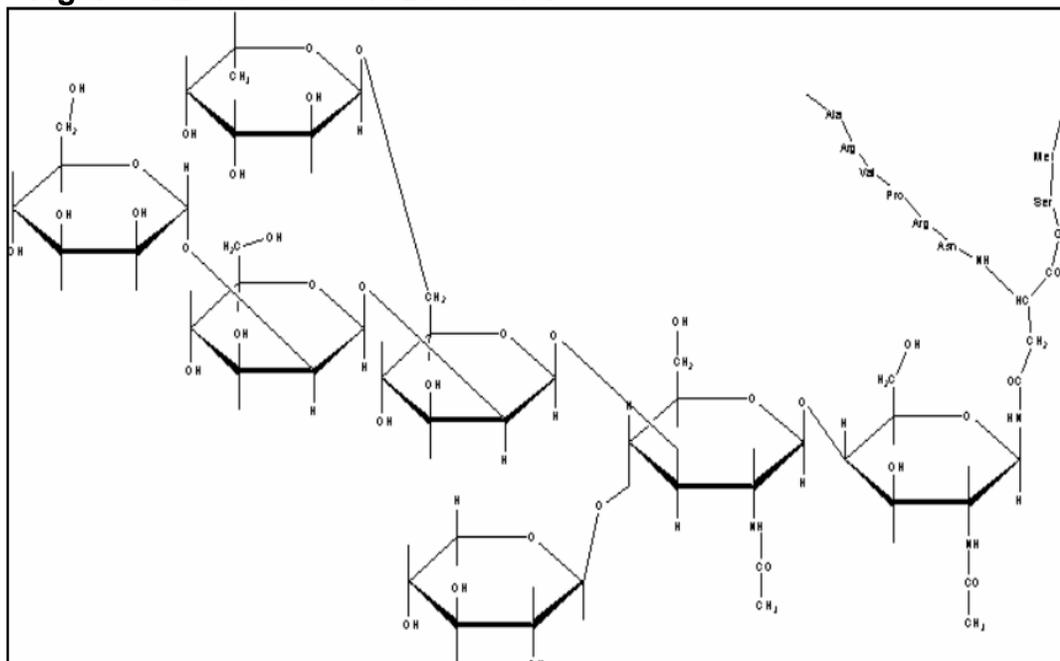
³¹ DALGO, Violeta. Obtención de un concentrado con Bromelina a partir de piña (*Ananas comosus*), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos. Ecuador, Ambato: Universidad técnica de Ambato. Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos. Ingeniería Bioquímica. 2012. p. 56.

³² GALARZA, David. Efecto ablandador de extractos de cascara, pulpa y corazón de piña en el lomo (*Longissimus toracis*) y la mano de piedra (*Semitendinosus*) de res. Honduras: Facultad de Ingenierías. Ingeniería agrónoma. 2002. p. 8.

³³ CARRERA, Eliecer. Producción y aplicación de enzimas industriales. En: Facultad de ciencias agropecuarias. Marzo, 2003, no. 1. 50 p.

³⁴ GALARZA, David. Op. cit., p. 15.

Figura 3. Estructura de la Bromelina.



Fuente: GUERRA, José. Propiedades medicinales de la piña (*Ananas comosus*). Perú: Universidad Nacional del Altiplano, 2016. 10 p.

1.3.2 Propiedades físicas. La Bromelina es de color blanco, soluble en agua, posee una temperatura de inactivación de 70°C, su temperatura de almacenamiento es de 25°C³⁵. Su pH óptimo oscila entre 7 y 8.³⁶

³⁵ PULIDO, Analleli. Estudio Técnico Económico para la fabricación de Bromelina. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico Industrial. México D.F. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas. 2007. p. 17.

³⁶ GUERRA, José. Propiedades medicinales de la piña (*Ananas comosus*). Perú: Universidad Nacional del Altiplano, 2016. 10 p.

1.3.3 Aplicaciones. En la industria de alimentos la Bromelina se utiliza como ablandador de carnes, en la fabricación de quesos, galletas (para eliminar el gluten de estas), para la clarificación de cerveza, ya que las proteínas hidrolizadas por la enzima dejan como residuo polipéptidos que le confieren sabor a la cerveza y le brindan la capacidad de generar espuma³⁷. Tiene la capacidad de coagular la leche y desdoblar las proteínas con una acción equivalente a la que desarrolla la Papaína³⁸. En la industria Oleoquímica, se utiliza para refinar aceites vegetales y otros productos grasos, esta enzima degrada impurezas del producto, además permite que los residuos floten sobre este gracias a una floculación, facilitando la separación de estos.³⁹

En la industria farmacéutica se emplea en medicamentos como anti-inflamatorios, anticoagulantes para el sistema digestivo⁴⁰, también es utilizada como agente terapéutico, además para eliminar microorganismos, bacterias y parásitos causantes de dolores en los intestinos⁴¹, es implementada para la desinflamación de hematomas y lesiones de la piel⁴², también presenta aplicaciones en tratamientos contra el cáncer, porque la Bromelina es un potente inhibidor de la formación de nitrosaminas, quienes son las causantes del cáncer de estómago⁴³, además esta enzima ejerce un efecto inmune modulador positivo frente al desarrollo de distintos tumores.

En la industria cosmética tiene propiedades desmanchadoras y cicatrizantes en la piel⁴⁴, también se utiliza como suavizante de pieles de animales, puesto que modifica la permeabilidad, también para la elaboración de productos que alivien problemas de picazón, acné y piel seca, digiriendo las proteínas de las células muertas, dando mejor apariencia en la piel. Ha sido utilizada como asistente en la

³⁷ QUINDE, Carmina y SÁNCHEZ, Nancy. Extracción, purificación parcial y secado de la enzima Bromelina obtenida a partir del Corazón de la Piña (*Ananas comosus*). Guyaquil, Ecuador: Escuela superior politécnica del litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la producción. Ingeniería de alimentos. 2013. p. 18.

³⁸ DÍAZ, Abanto y REBAZA, Juan. Obtención de la enzima Bromelina de los desechos industriales del procesamiento de *Ananas comosus*, producida en el distrito de Poroto. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de ingeniería Química. Ingeniería Química. 2011. p. 22.

³⁹ CLAVIJO, Diego; PORTILLA, Maghdriel y QUIJANO, Alfonso. Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas comosus*) de Lebrija- Santander. En: Bistua. Octubre, 2012, no. 2. p. 41-49. ISSN 0120-4211.

⁴⁰ QUINDE, Carmina y SÁNCHEZ, Nancy, Op. cit., p. 20.

⁴¹ PULIDO, Analleli. Estudio Técnico - Económico para la fabricación de Bromelina. México D.F.: Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Ingenierías. Ingeniería Química Industrial. 2007. p. 17.

⁴² DÍAZ, Abanto y REBAZA, Juan, Op. cit., p. 17.

⁴³ VEGA, Karla. Extracción de bromelina obtenida a partir de residuos del procesamiento de Piña (*Ananas comosus*). Quito: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Ingeniería Agroindustrial. 2017. p. 21.

⁴⁴ RAMÍREZ, Laura y GUTIÉRREZ, Johana. Purificación de la enzima Bromelina del *Anana comosus* para su uso potencial en la industria cosmética. Medellín: Tecno academia SENA. 2015. p. 1.

etapa lútea del embarazo, colaborando con la implantación del óvulo fertilizado, promoviendo el crecimiento y la expansión.⁴⁵

1.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula, estas constituyen más del 50% del peso seco en ella. La extracción de proteínas empieza con una ruptura celular o lisis, para ello se utilizan métodos que se basan en la homogenización de los tejidos y en la ruptura de las paredes celulares con el fin de obtener un extracto crudo y así recuperar gran parte de los compuestos de interés. Partiendo del extracto celular, existen varios métodos que permiten obtener y purificar una o más proteínas que se usan a escala laboratorio y se clasifican así.

1.4.1 Métodos mecánicos. Son métodos que utilizan la fuerza y fricción para forzar la célula con el fin de llegar a su ruptura, para ello emplean molinos y equipos de ultrasonido; estos métodos deben ser manipulados de manera rigurosa debido a que la generación de calor puede llegar a desnaturalizar las proteínas.⁴⁶

1.4.1.1 Molino de cuchillas. Es un equipo formado por cuchillas afiladas y una cámara de molienda, su funcionamiento se basa en un movimiento rotatorio, que por efecto de corte logra triturar alimentos blandos y semiduros, separando la fase líquida de la fase sólida.⁴⁷

1.4.1.2 Molino coloidal. Es un equipo formado por un estator (superficie estacionaria) y un rotor (superficie rotatoria), estas superficies están separadas por un pequeño espacio que permite el paso de un líquido que es sometido a cizalla y turbulencia, obteniendo con ayuda de la fuerza de centrifugación la fase de interés.⁴⁸

⁴⁵ PULIDO, Analleli, Op. cit., p. 18.

⁴⁶ UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. Quilmes: Universidad Nacional de Quilmes, 2010. 5 p.

⁴⁷ VEGA, Karla, Op. cit., p. 6.

⁴⁸ Ibid., p. 7.

1.4.1.3 Equipo ultrasónico. Es un conjunto de ondas mecánicas cuya frecuencia es superior a 16 kHz. Estas ondas viajan por la superficie y el material a una velocidad determinada.⁴⁹ Cuando las ondas pasan a través de un líquido, esta interacción conduce a un fenómeno de excitación denominado cavitación acústica cuya función es la generación de micro burbujas en el líquido. Estas micro burbujas liberan toda la energía acumulada que poseen, esto junto con el choque mecánico provocando la ruptura de las paredes celulares que permiten la salida de los compuestos intracelulares.⁵⁰

1.4.2 Métodos no mecánicos. Estos métodos incluyen la adición de químicos o enzimas los cuales degradan principalmente los componentes de las paredes celulares. En algunas ocasiones emplean la combinación de métodos mecánicos para asegurar una completa ruptura celular⁵¹. Por lo general estos métodos son menos agresivos que los métodos mecánicos por lo que se favorece la purificación del producto de interés.⁵²

1.4.2.1 Métodos químicos. Estos métodos se basan en emplear solventes orgánicos, detergentes los cuales cambian las características de la pared celular, que en algunas ocasiones afectan la estructura de las membranas celulares. Los solventes orgánicos destruyen los compuestos hidrofóbicos de las membranas celulares para que se vuelvan permeables, el uso de este tipo de solventes es de preferencia cuando el compuesto de interés es resistente a pH básicos.⁵³

1.4.2.2 Métodos enzimáticos. Estos métodos emplean compuestos enzimáticos de celulosas, pectinasas, alfa-amilasas, etc. Se basa en la capacidad inherente para catalizar reacciones mediante la degradación o modificación de las paredes celulares permitiendo así una adecuada liberación y extracción de los compuestos intracelulares con un alto rendimiento. Este método tiene la ventaja de ser amigable con el medio ambiente, porque el uso de enzimas reduce el porcentaje de solvente a utilizar.⁵⁴

⁴⁹ GONZALEZ, Antia. Efecto de ultrasonidos en el proceso de extracción de proteínas de coproductos animales y escalado del proceso. España: Universidad de Oviedo. Master universitario en biotecnología alimentaria. 2017. p. 28.

⁵⁰ VEGA, Karla, Op. cit., p. 7.

⁵¹ UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN. Bioquímica de proteínas [diapositivas]. San Martín. 98 diapositivas, color.

⁵² VEGA, Karla, Op. cit., p. 8.

⁵³ Ibid., p. 8.

⁵⁴ Ibid., p. 8.

1.4.3 Métodos de purificación de proteínas. Los métodos de purificación de proteínas se basan en las diferentes características respecto del resto de biomoléculas presentes en las muestras biológicas. En algunos casos es necesario que las proteínas reaccionen con un reactivo, para que les permita adquirir diferentes propiedades. Para ello existen una serie de factores que se deben tener en cuenta como lo son la naturaleza de la muestra y la presencia de sustancias que puedan interferir.⁵⁵

Por tal motivo es necesario analizar varios métodos acerca de la obtención y purificación de estos componentes, tanto en las frutas como en los residuos que deja su procesamiento. Además, es importante saber elegir adecuadamente el método dependiendo del tipo de proteína a obtener, aplicación a la que se quiere llegar porque los parámetros más importantes son maximizar la eficiencia de la extracción, evitar la desnaturalización e incrementar el porcentaje de proteína recuperada.⁵⁶ Para ello, se somete el extracto a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones, estos basados en propiedades tales como la carga o el tamaño que también es llamado fraccionamiento. Estos tratamientos dependen del pH, temperatura, fuerza iónica y tamaño⁵⁷. Los tratamientos más comunes son:

1.4.3.1 Ultrafiltración. Consiste en desarrollar una serie de procesos que involucran el fraccionamiento, concentración y separación de componentes de interés sin someterlos a cambios en su estructura, empleando una membrana semipermeable que se somete a presiones que oscilan entre 4 a 8 atm, con poros de tamaño definido para establecer el tamaño de las partículas que pasaran a través de ella, un factor importante para determinar que solidos se encuentran suspendidos o disueltos.

Existen dos categorías de membranas las cuales son: Membranas formadas con polímeros orgánicos las cuales están constituidas por una capa que determina el tamaño de las partículas que podrán pasar a través de ella, además de estar soportada sobre una estructura macro porosa. Por otro lado las membranas formadas a partir de materiales cerámicos las cuales son unas capas sucesivas que generan poros residuales cuyos tamaños dependen del tipo de grano, para obtener esta capa es necesario usar suspensiones coloidales de óxidos que luego se depositan sobre un material macro poroso.⁵⁸

⁵⁵ ROCA, Pilar; OLIVER, Jordi y RODRIGUEZ, Ana. Bioquímica Técnicas y Métodos. no. 01. España: Hélice, 2003. p. 153.

⁵⁶ VEGA, Karla, Op. cit., p. 10.

⁵⁷ UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. Op. cit. p. 1.

⁵⁸ AMOROS, Leslei, *et al.* Diálisis y Ultrafiltración. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes, 2011. p. 3.

1.4.3.2 Microfiltración. Es el proceso capaz de separar partículas de tamaño inferior a 10 μm en un fluido mediante uso de membranas poliméricas y termoplásticas. Empleando presiones que oscilan entre los 0.5 y 4 atm; para ello se debe tener en cuenta el flujo de alimentación, tamaño de partícula a separar y temperatura para elegir adecuadamente el diámetro de poro de la membrana y velocidad de flujo. La Microfiltración se basa en impulsar un flujo a una velocidad relativa de manera rotativa o lineal, dependiendo de la superficie del medio filtrante, el objetivo de este proceso es la eliminación de sólidos suspendidos sin alterar las propiedades químicas de la solución⁵⁹.

1.4.3.3 Precipitación de proteínas. La precipitación de proteínas se desarrolla utilizando diferentes métodos que se basan en las solubilidades de estas, determinadas por el pH y polaridad que son modificadas por la adición de sales, que producen un precipitado. A continuación se explicarán cada una de ellas.

- **Adición de sales.** La capacidad de la adición de sales neutras que influyen en la solubilidad de las proteínas está ligada a su fuerza iónica, que constituye una cantidad de la concentración como en el número de las cargas eléctricas existentes entre los cationes y aniones aportados por la sal. Por otra parte, a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de la proteína disminuye en un proceso llamado Salting Out.⁶⁰ La pérdida de solubilidad por salado es importante en la separación de mezclas de proteínas. Las proteínas precipitadas por salado retienen su conformación y pueden disolverse de nuevo sin desnaturizarse. A menudo se utiliza el sulfato de amonio para precipitar las proteínas debido a su gran solubilidad en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas elevadas.⁶¹

- **Adición de solventes polares.** La adición de solventes orgánicos como el etanol y la acetona son utilizados porque disminuyen la solubilidad de la mayor parte de las proteínas en el agua, de tal manera que se precipitan⁶². Este proceso muestra que la solubilidad de una proteína a un pH y fuerza iónica está en función de la constante dieléctrica del medio. Puesto que el etanol y la acetona son buenos precipitantes porque poseen constantes dieléctricas menores que la del agua y así incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, dando como resultado el precipitado de las proteínas⁶³. Este método emplea temperaturas cercanas a los 4°C y no mayores porque podría presentarse desnaturización de la proteína.

⁵⁹ VEGA, Karla, Op. cit. p. 11.

⁶⁰ VEGA, Karla, Op. cit. p. 12.

⁶¹ AMOROS, Leslei, Op. cit. p. 2.

⁶² Ibid., p. 3.

⁶³ VEGA, Karla, Op. cit. p. 12.

- **Efecto del pH.** La solubilidad de las proteínas se ve influenciada por el pH del proceso. El pH al que una proteína muestra un mínimo de solubilidad es llamado pH isoeléctrico, definido como aquel valor de pH al que la molécula no genera carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico⁶⁴. Cuando el pH de una mezcla de proteínas se ajusta al pH isoeléctrico de uno de sus componentes, la cantidad de proteína a precipitar es mayor. La proteína isoeléctrica precipitada permanece en su conformación nativa y puede disolverse de nuevo en un medio de pH apropiado, debido a que un pH determinado para la proteína de interés hace que las cargas positivas o negativas se equilibren con mayor exactitud.⁶⁵

1.4.3.4 Sistema acuoso de dos fases (ATPS). Los sistemas de dos fases acuosas se forman al mezclar dos polímeros inmiscibles o un polímero y una sal en alta presencia de agua. Al alcanzar el equilibrio el sistema se separa en dos fases. Los polímeros más utilizados son Polietilenglicol (PEG) y Dextrano y para las sales son fosfato de potasio y sulfato de sodio, entre otras⁶⁶. La ubicación del compuesto de interés en las muestras está afectada por los enlaces iónicos, pH, temperatura, peso molecular del polímero y tipo de sal. Para la siguiente ilustración el compuesto de interés se posiciona en la parte superior de la muestra.⁶⁷

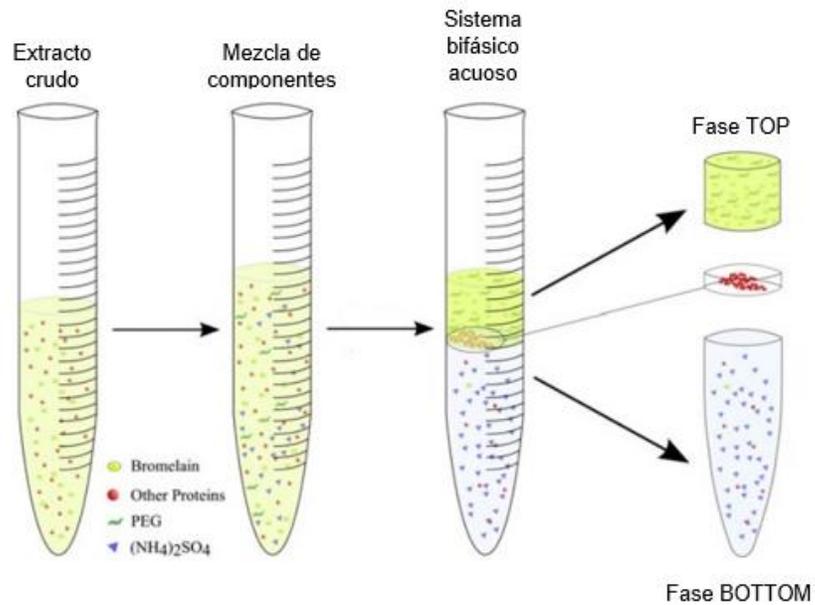
⁶⁴ AMOROS, Leslei, Op. cit. p. 4.

⁶⁵ VEGA, Karla, Op. cit. p. 13.

⁶⁶ CORTES, María. Predicción del coeficiente de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas a través de la caracterización bioinformática de su superficie. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Ingeniero civil en Biotecnología. p. 2.

⁶⁷ VEGA, Karla, Op. cit. p. 14.

Figura 4. Extracción de proteínas mediante el sistema acuoso de dos fases.



Fuente: COELHO, Diego, et al. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). En: Bioprocess and biosystems engineering.12 de Junio 2012. p. 9.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Con el objetivo de describir detalladamente la metodología se exponen a continuación los materiales, equipos y métodos utilizados.

2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

El desarrollo experimental requiere una serie de reactivos y equipos, a continuación, se describen cada uno de esos y su función dentro del proceso.

2.1.1 Reactivos. En la tabla 4 se describen los reactivos necesarios para el desarrollo experimental y los usos que cada uno tiene dentro del proceso, además de esto una descripción de su composición.

Cuadro 1. Reactivos necesarios para desarrollo experimental.

Reactivos	Función
Amoniaco 33%	Compuesto químico utilizado para modificar el pH de la solución (Extracto crudo de piña), con el objetivo de acondicionar la muestra para posteriormente realizar el método de Salting Out.
Sulfato de amonio 90-95%	Es una sal que actúa como agente precipitante del proceso Salting Out.
Acetona 99%	Compuesto orgánico líquido, incoloro, empleado como agente de lavado usado posteriormente a la obtención de la pastilla centrifugada, obtenida del proceso Salting Out.
Polietilenglicol 6000 (PEG)	Componente del sistema bifásico acuoso (ATPS).
Fosfato de potasio dibásico – 90%	Es una sal inodora que se involucra en el desarrollo del proceso de sistema bifásico acuoso (ATPS).
Caseína	Es una proteína empleada para la preparación de su sustrato, que posteriormente es proteolizado por el extracto de bromelina obtenido en los 2 métodos usados y de esta manera cuantificar su actividad.

Cuadro 1. (Continuación).

Reactivos	Función
Cisteína	Es un aminoácido que se emplea para la preparación del Buffer, encargado de proteger al extracto de Bromelina que se obtiene por ambos métodos para posteriormente, realizar el proceso de determinación de actividad enzimática.
L- tirosina	Es una aminoácido no esencial que se usa para la construcción de la curva patrón involucrada en la determinación de actividad enzimática, esta se mezcla con ácido clorhídrico.
Ácido clorhídrico 0.1N	Líquido incoloro usado como solvente en la construcción de la curva Tirosina, además de ser la muestra estándar en el espectrofotómetro para la medición de las muestras.
Ácido tricloroacetico 30%	Acido orgánico usado para detener la reacción de proteólisis que se lleva a cabo en el proceso de determinación de actividad enzimática.
Ácido cítrico	Ácido orgánico empleado para acondicionar la solución de caseína desde un pH de 7 a un pH de 6.

Fuente: elaboración propia.

2.1.2 Equipos. Los equipos especializados necesarios para llevar a cabo la metodología que posteriormente se describe son.

Cuadro 2. Equipos a utilizar en el desarrollo experimental.

	Descripción	Imagen
Centrifuga	Es un dispositivo el cual se encarga de separar componentes o fases generalmente sólidos o líquidos según su densidad por medio del movimiento rotativo: Fuerza centrífuga, en este dispositivo se gradúa las revoluciones por minuto, temperatura y tiempo al cual se desea separar las fases de la muestra. Se utiliza en el proceso para separar el precipitado del jugo de piña y precipitado del Salting Out.	
pH-metro	Es un instrumento el cual permite realizar mediciones de acidez de soluciones acuosas, utilizado en el proceso para medir la acidez del extracto de jugo a lo largo de la caracterización.	
Cabina extractora de gases y humos	Su función es capturar, contener y expulsar las emisiones generadas por sustancias químicas peligrosas, para prevenir el vertimiento de contaminantes en el laboratorio.	

Cuadro 2. (Continuación).

Equipo	Descripción	Imagen
Espectrofotómetro	Es un instrumento usado para medir la cantidad de intensidad de luz absorbida al pasar por una solución muestra llamada "patrón o estándar", también es utilizado para la cuantificación de sustancias y microorganismo. Este dispositivo se emplea en la determinación de concentración de Bromelina y determinación de actividad enzimática.	
Agitador Vortex	Es un dispositivo encargado de agitar los tubos de ensayo con el propósito de ofrecer mayor estabilidad y homogenización a las muestras.	
Plancha de agitación y calentamiento	Dispositivo encargado de calentar y agitar las muestras requeridas. Fue utilizado para controlar la temperatura y homogenizar la elaboración del sustrato de caseína, homogenización del polietilenglicol con agua destilada y extracto de jugo.	
Bomba de vacío	Es un dispositivo encargado de extraer moléculas de gas por medio de una presión determinada. Fue utilizado en sistemas de filtración en los procesos de determinación de actividad enzimática y desalado de precipitados.	

Cuadro 2. (Continuación).

Equipo	Descripción	Imagen
Incubadora	Dispositivo encargado de mantener una temperatura, humedad y otras condiciones de forma constante. Utilizado para mantener la temperatura de algunas muestras en los procesos de determinación enzimática y de concentración.	
Balanza analítica	Es un equipo cuya función es pesar masas pequeñas con exactitud, capaces de reportar valores hasta la cuarta cifra decimal.	
Mufla	Horno cuya funcionalidad es la cocción de materiales cerámicos, calcinación de sustancias, secado de sustancias, fundición y procesos de control. Utilizada en el proceso para la caracterización de los corazones de piña con el fin de determinar la humedad presente en ellos.	
Refractómetro	Es un instrumento óptico de alta precisión que basa su funcionamiento en la refracción de luz al pasar por un prisma, permitiendo determinar el porcentaje de sólidos solubles en una disolución líquida. Utilizada en la caracterización de la materia prima: Corazones de piña.	

Cuadro 2. (Continuación).

Equipo	Descripción	Imagen
Extractor de jugo	Funciona a través de un mecanismo de rotación que permite el cizallamiento de material húmedo, obteniendo una corriente líquida y otra sólida correspondiente al material fibroso de la materia procesada. Se usa para extraer jugo de Piña.	

Fuente: elaboración propia.

2.2 METODOLOGÍA

A continuación, se describe cada uno de los procesos que fueron implementados, con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos.

2.2.1 Recepción de corazones de las tres variedades de piña. Los corazones de las tres variedades de piña deben estar clasificados dependiendo su variedad en bolsas plásticas impermeables para evitar el ingreso de material particulado y microorganismos que estén presentes en el ambiente, posterior a esto deben ser almacenados en un refrigerador a una temperatura de 4°C, con el propósito de ralentizar su descomposición. Su almacenamiento debe permanecer bajo estas condiciones hasta su posterior tratamiento.

⁶⁸

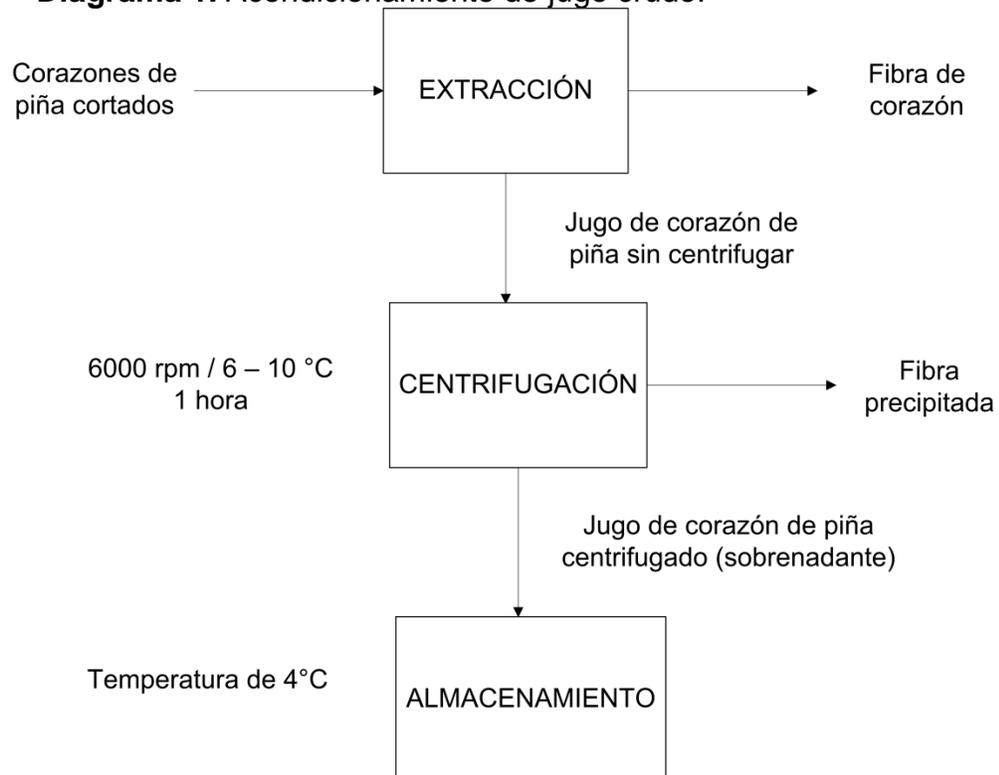
2.2.2 Acondicionamiento. Los corazones de piña para ser procesados en el extractor de jugo, deben estar descongelados, para esto se sumergen en bolsas plásticas impermeables en agua durante 30 minutos, esto se realiza con el fin de obtener una materia prima blanda que pueda ser fácilmente procesada en el disco rotatorio del extractor de jugo. Transcurridos los 30 minutos, se tendrá una materia prima aceptable y lista para ser procesada en el extractor.⁶⁹

⁶⁸ BOLETÍN DEL CONSEJO EUROPEO DE INFORMACIÓN SOBRE LA ALIMENTACIÓN. FOODTODAY: La congelación. no. 1. España: The European food information council, 2010. p. 2.

⁶⁹ SERVICIO DE INOCUIDAD DE ESTADOS UNIDOS. El descongelar completamente: Métodos inocuos para descongelar alimentos para los consumidores. no. 1. Estados Unidos: USDA, 2005. p. 2.

2.2.2.1 Obtención de jugo de corazón de las variedades de piña analizadas. Descongelados cada uno de los corazones se llevan al extractor, donde un disco rotatorio extraerá por acción del rozamiento el jugo contenido en estos (Ver figura 5), es importante que cada uno de los corazones sea cortado en trozos de aproximadamente 2.0 cm de radio y 1.5 cm de alto para lograr una mejor digestión en el extractor, el jugo se almacenará en frascos de vidrio hasta su posterior tratamiento que consiste en el procesado y caracterizado, el material fibroso restante se desechará.

Diagrama 1. Acondicionamiento de jugo crudo.



Fuente: elaboración propia.

El jugo obtenido en el extractor deberá ser centrifugado para eliminar cualquier material fibroso restante que se encuentra suspendido en la solución, para este caso no se hace uso de una filtración al vacío, porque no se cuenta con un filtro que garantice la eliminación total de los sólidos suspendidos en la solución de jugo extraído. El jugo extraído se dosificará en tubos Falcon de 50 mL y se llevarán una centrifugadora de marca HERMLE. El jugo será centrifugado a una temperatura entre 6 y 10°C, rango que le confiere al proceso de centrifugación mayor efectividad, sus condiciones rotacionales deberán ser de 6000 rpm durante una hora. Transcurrido el tiempo programado se pesará el sobrenadante y precipitado para determinar el rendimiento del proceso, el sobrenadante se almacenará en

frascos de 1 L y será llevado al congelador a una temperatura de 4°C hasta su próximo tratamiento.

Figura 5. Extracción jugo corazón de Piña.

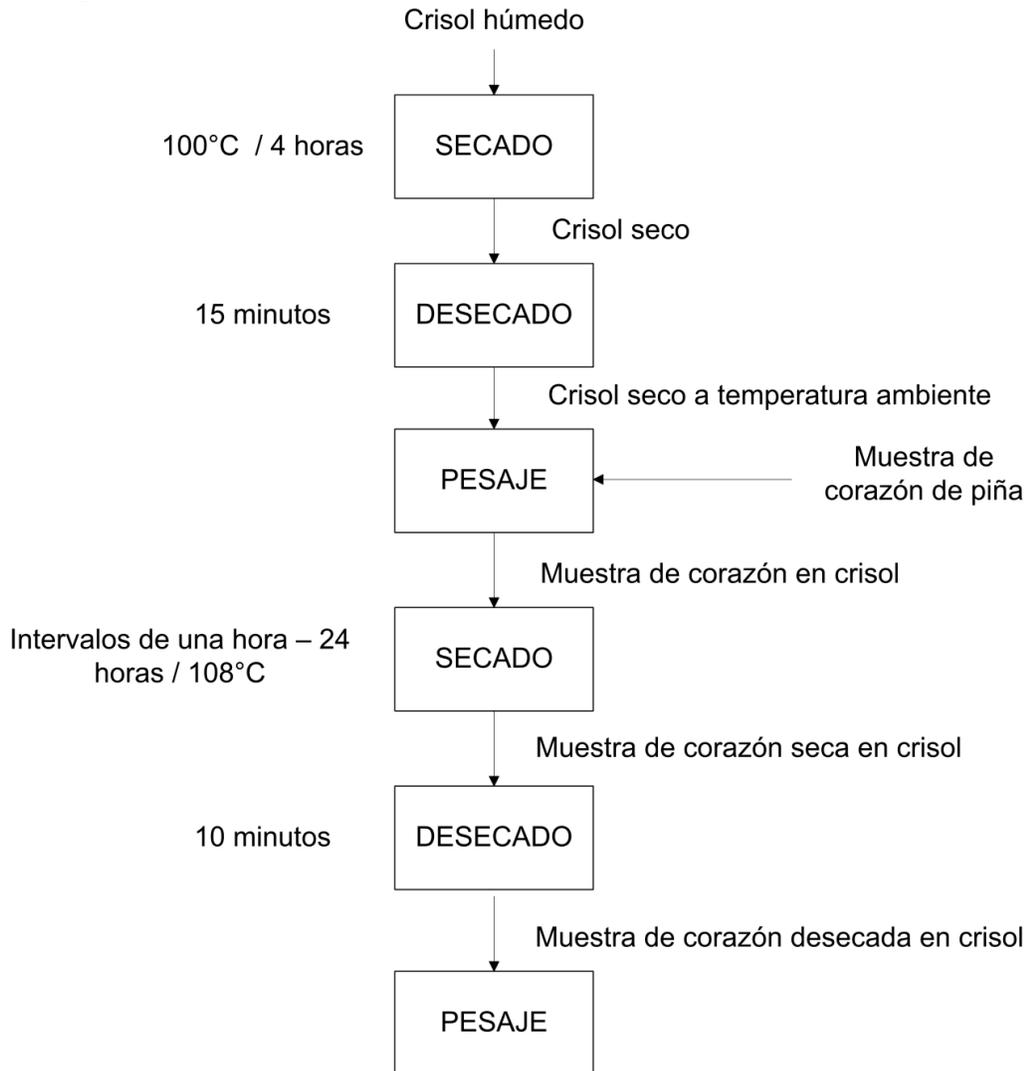


Fuente: elaboración propia.

2.2.3 Caracterización de materias primas. La caracterización de los corazones de las tres variedades de piña, incluye la determinación de pH, humedad, grados Brix y acidez titulable, para el desarrollo de estos procedimientos se requiere el uso de un ph-metro, mufla, balanza analítica y refractómetro que se presenta en la tabla 5.

2.2.3.1 Humedad. La determinación de humedad requiere el uso de una mufla y crisoles, el siguiente es el diagrama de bloques para el proceso.

Diagrama 2. Determinación de humedad.



Fuente: elaboración propia.

Los crisoles que se utilizarán en el proceso deben ser secados en la mufla durante 4 horas a una temperatura de 100°C, buscando la evaporación de cualquier partícula de agua que se encuentre fijada en la superficie. Como se indica en el diagrama de bloques 2, a la mufla se ingresará cada crisol con una muestra de corazón de piña que tiene dimensiones de aproximadamente 2.0 cm de radio y 1.5 cm de ancho, el proceso tendrá que realizarse en intervalos de una hora, transcurrido este intervalo se retirará el crisol con la muestra y se trasladará al desecador, donde permanecerá 10 minutos buscando un enfriamiento a condiciones de humedad baja. A continuación la muestra se pesará en una balanza analítica, pesado el crisol y la muestra se retornará a la mufla, este proceso deberá replicarse hasta obtener valores de peso cercanos, lo que indicará una eliminación total de la humedad. La humedad expresada en porcentaje para

cada una de las muestras estudiadas se determinará usando la siguiente ecuación⁷⁰:

Ecuación 1. Determinación de humedad.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

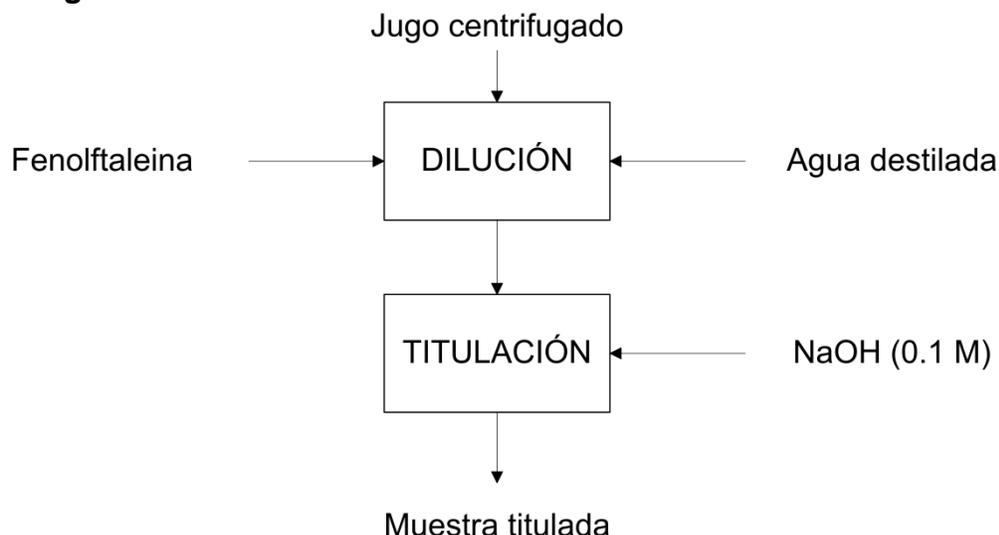
Dónde.

- ✓ m_1 : Masa de crisol vacío y seco en gramos
- ✓ m_2 : Masa de crisol con muestra antes del secado en gramos
- ✓ m_3 : Masa del crisol con muestras secada luego del desecado en gramos

2.2.3.2 Grados Brix. Para la determinación de los grados brix para cada una de las variedades se debe hacer uso de un refractómetro, se agregarán dos gotas de jugo proveniente del extractor, en el prisma del refractómetro haciendo uso de una pipeta pasteur, a través del ocular se podrá observar la medición de los grados brix dada por la frontera que se muestra en el instrumento de medición.⁷¹

2.2.3.3 Acidez titulable. El siguiente es el diagrama de bloques que muestra la metodología a ser implementada para la determinación de acidez titulable.

Diagrama 3. Determinación de acidez titulable.



Fuente: elaboración propia.

⁷⁰ CHILE. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. PRT-701.02-023. Determinación de humedad. Sub departamento laboratorios del Ambiente. p. 1 – 2.

⁷¹ ESTADOS UNIDOS DE MEXICO. SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL. NMX-F-275-1992. 24 de Enero del año 1992. Determinación de grado brix en muestras de jugo de especies vegetales productoras de azúcar – Método de prueba. p. 1 – 6.

La muestra que será titulada deberá diluirse al 1:2 con agua destilada, se agregarán 3 gotas de solución indicadora de Fenolftaleína (Punto de viraje pH=8.3). En seguida se homogenizará y se titulará con NaOH (0.1M), hasta la formación del color característico de viraje que indica que la muestra alcanzó un pH de 8.3. El porcentaje de acidez se calculará haciendo uso de la siguiente expresión que relaciona las variables involucradas.⁷²

Ecuación 2. Determinación de acidez

$$\% \text{ Acidez} = \left(\frac{M \times V \times 0.064}{v} \right) * 100$$

Dónde.

- ✓ *M*: Molaridad de la solución de NaOH
- ✓ *V*: Volumen de la solución de NaOH usada hasta alcanzar el punto de viraje
- ✓ *v*: Volumen de la muestra de jugo de piña sin centrifugar diluida
- ✓ 0.064: meq de Ácido Cítrico

2.2.3.4 pH. La evaluación del pH para cada uno de los jugos extraídos, se desarrollará con ayuda del ph-metro. En cada una de las muestras se introducirá el electrodo del equipo, antes de ser centrifugados. El equipo utilizado deberá ser calibrado usando las soluciones buffer disponibles para el rango básico y el rango ácido antes de cada medición.⁷³

2.2.3.5 Determinación de concentración de Bromelina (Método de Biuret). El procedimiento se implementará basados en la norma AOAC 1999 para la cuantificación de proteínas⁷⁴, la prueba se basa en la formación de un complejo entre el Cu²⁺ y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La tonalidad de la muestra aumenta conforme la cantidad de proteínas presente es mayor, la reacción es altamente específica permitiendo que la determinación tenga una gran aproximación. El reactivo de Biuret se preparará haciendo uso de tartrato de sodio potasio, sulfato cúprico y NaOH. En seguida se presentan los diagramas de bloques que puntualizan la metodología seguida.⁷⁵

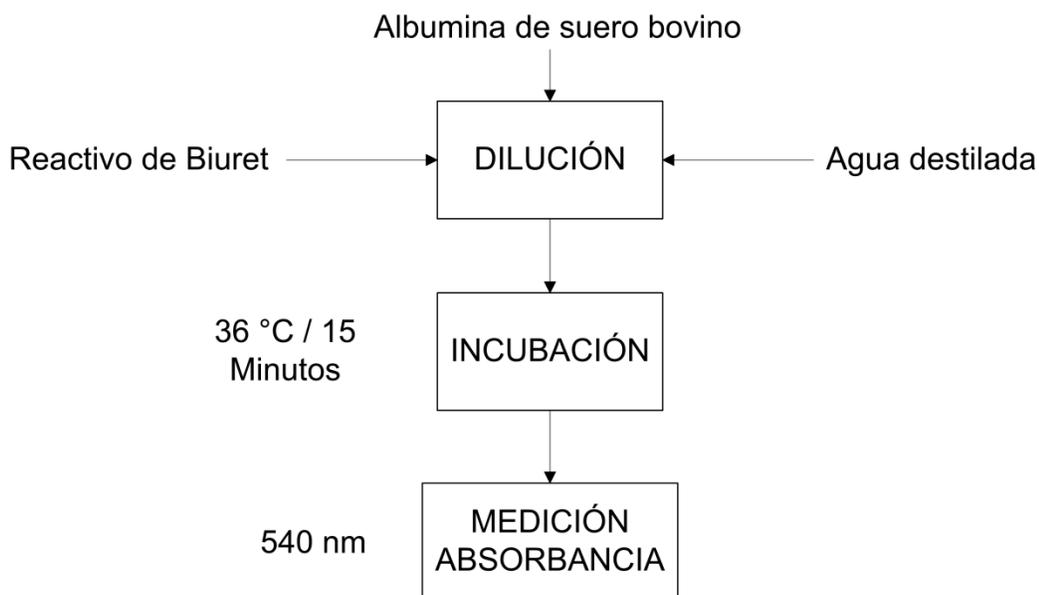
⁷² CORONEL, Claudia. Cinética de inactivación enzimática y de degradación de sabor en función de la temperatura en jugo de piña. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciada en Ingeniería de Alimentos. Estados Unidos de México, Puebla: Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. 2003. p. 34.

⁷³ CORONEL, Op. Cit., p. 34.

⁷⁴ OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Biuret method. AOAC 1999. Estados Unidos. 1990. p. 2.

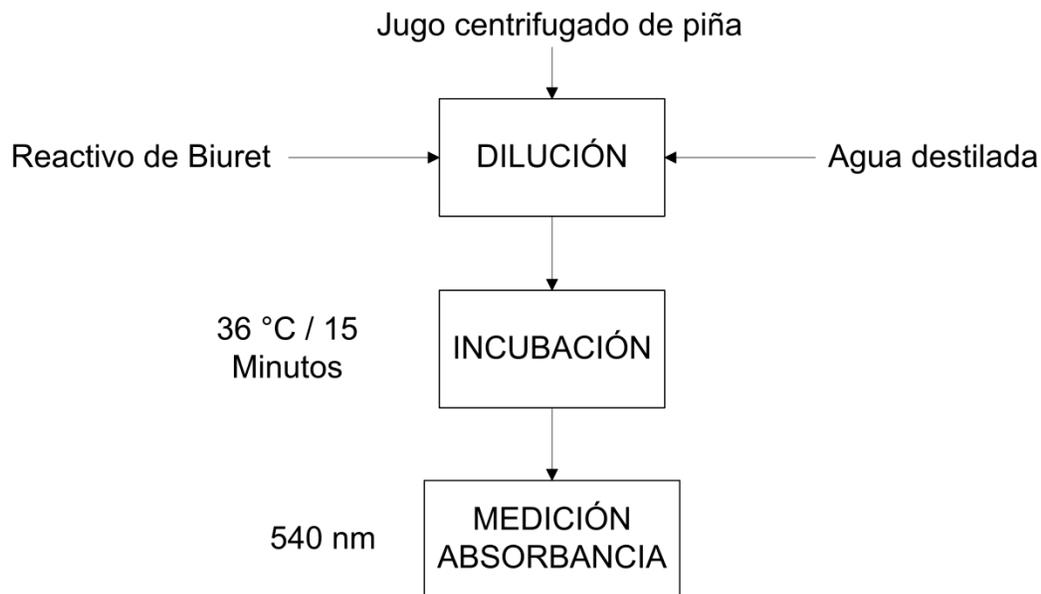
⁷⁵ CUERVO, Laura y ECHEBERRY, Julio. Evaluación de la síntesis de ácido poli láctico proveniente del suero de Quesería a nivel laboratorio. Bogotá: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Ingeniería Química. p. 50.

Diagrama 4. Elaboración curva de calibración - Albumina de suero bovino.



Fuente: elaboración propia.

Diagrama 5. Determinación concentración de Bromelina en jugos extraídos crudos.



Fuente: elaboración propia.

En el diagrama de bloques 4 se muestra el procedimiento, para la elaboración de la curva de calibración, que será útil en la determinación de la concentración de

Bromelina en cada muestra problema, para esto se prepararán las siguientes diluciones con albumina de suero bovino.

Tabla 4. Volúmenes para construcción curva de calibración.

Tubo	Albumina patrón (mL)	Agua (mL)
1	0	2
2	0,2	1,8
3	0,4	1,6
4	0,6	1,4
5	0,8	1,2
6	1	1
7	1,2	0,8
8	1,4	0,6
9	1,6	0,4
10	1,8	0,2

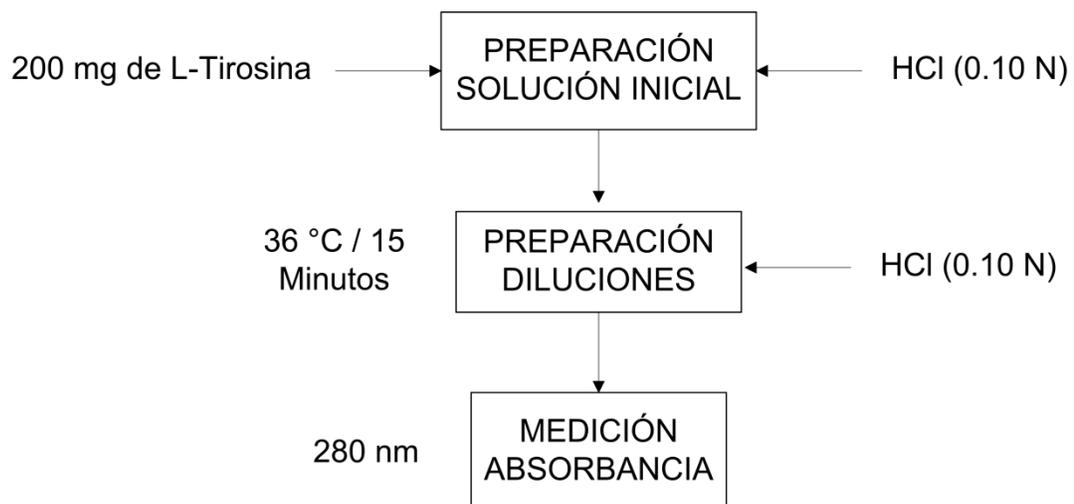
Fuente: elaboración propia.

Las muestras serán preparadas en tubos de ensayo de 25 mL, al adicionar el reactivo de Biuret los tubos se llevarán a la incubadora por 15 minutos a 36°C, para alcanzar la coloración deseada. El diagrama de bloques 5 representa el procedimiento a desarrollar para la determinación de concentración en las muestras problema, que serán: Jugo de piña centrifugado de la variedad Mayanes, Amazónica y Golden MD2. Posterior a esto deberán ser comparadas con la curva de calibración construida con albumina de suero bovino y de esta manera se establecerá la concentración inicial de cada una de las variedades.

2.2.3.6 Determinación de Actividad enzimática – Unidad de Tirosina. La determinación de la actividad enzimática se desarrollará por el método analítico de unidad de tirosina (BTU/ml) descrito por ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION, 2012⁷⁶. El principio que rige el método es la formación de aminoácidos que ocurre posterior a la adición de enzimas proteolíticas a un sustrato proteico, a partir de este procedimiento se obtendrán aminoácidos de L-Tirosina suspendidos en el sustrato, que son absorbidos a 280 nm siguiendo la Ley de Beer-Lambert. En seguida se muestra el diagrama de bloques para la elaboración de la curva tirosina, donde su pendiente será de interés para la posterior determinación de actividad enzimática.

⁷⁶ ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. Tyrosine Unit (TU) Analytical Method. 2012. 4 p.

Diagrama 6. Construcción curva de Tirosina.



Fuente: elaboración propia.

Las diluciones que deben ser preparadas para el desarrollo de la curva Tirosina, se presentan en la tabla 7.

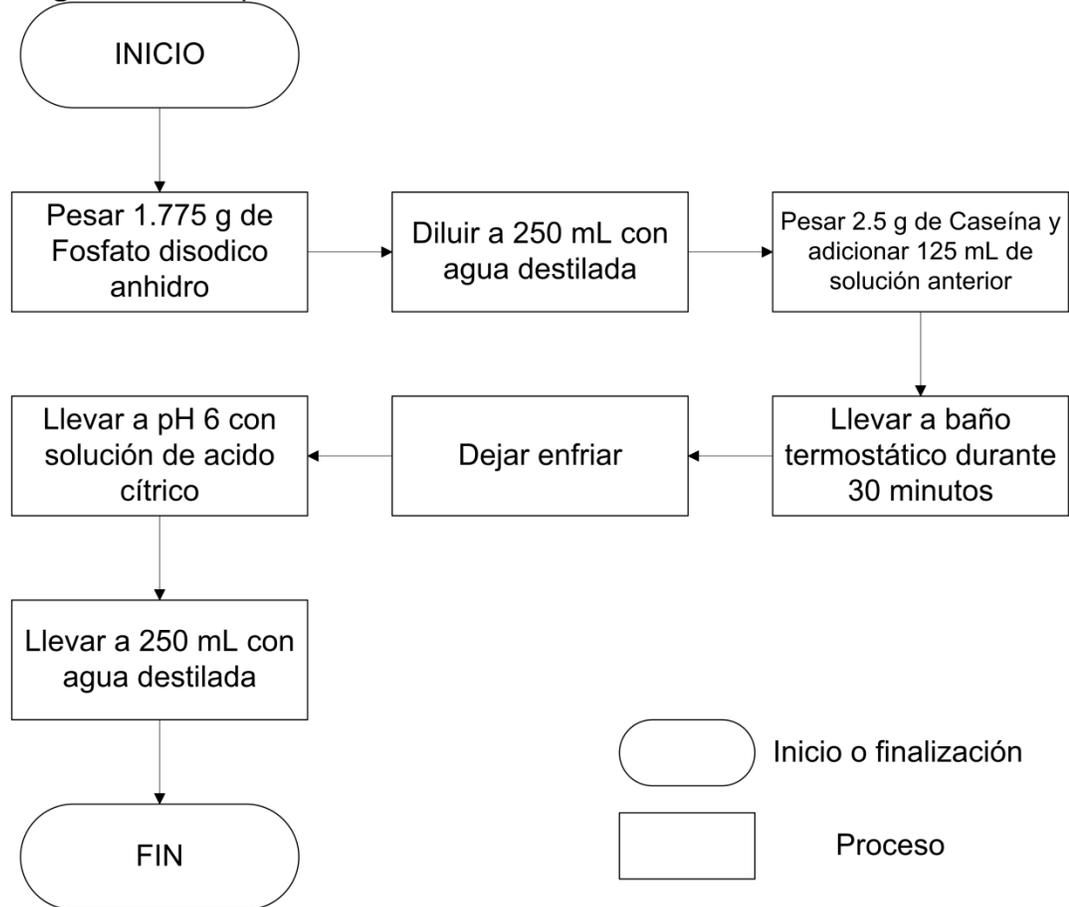
Tabla 5. Diluciones para toma de absorbancias.

Concentración Final ($\mu\text{g/mL}$)	Dilución de la solución de Tirosina
25	25 mL/100 mL
50	50 mL/100 mL
75	75 mL/100 mL
100	-

Fuente: elaboración propia.

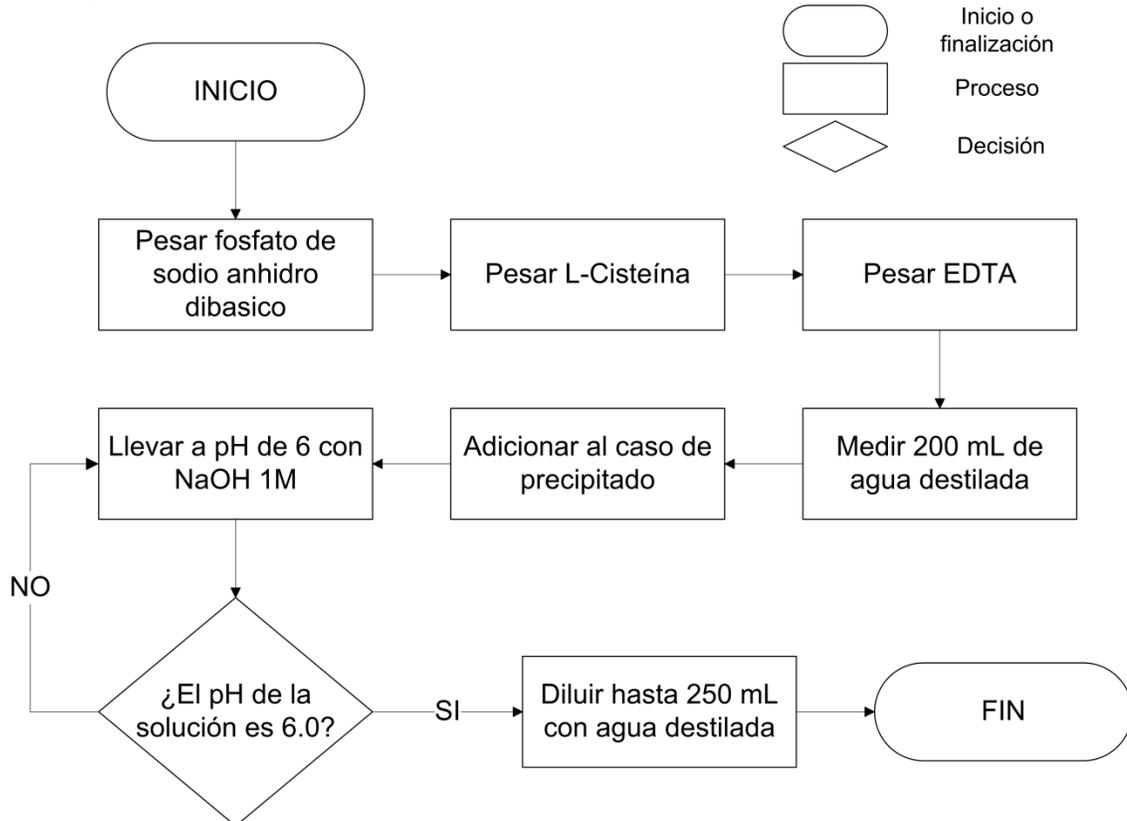
Ya obtenida la curva tirosina, se procederá a preparar sustrato de caseína, solución tampón de cisteína, solución de parada TCA; cada una la de las soluciones nombradas son descritas por los siguientes diagramas de flujo.

Diagrama 7. Preparación sustrato de Caseína.



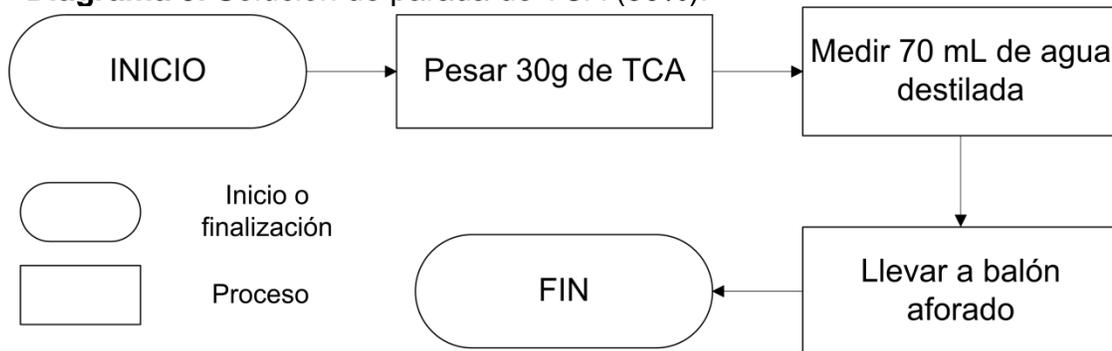
Fuente: elaboración propia.

Diagrama 8. Solución tampón de Cisteína.



Fuente: elaboración propia.

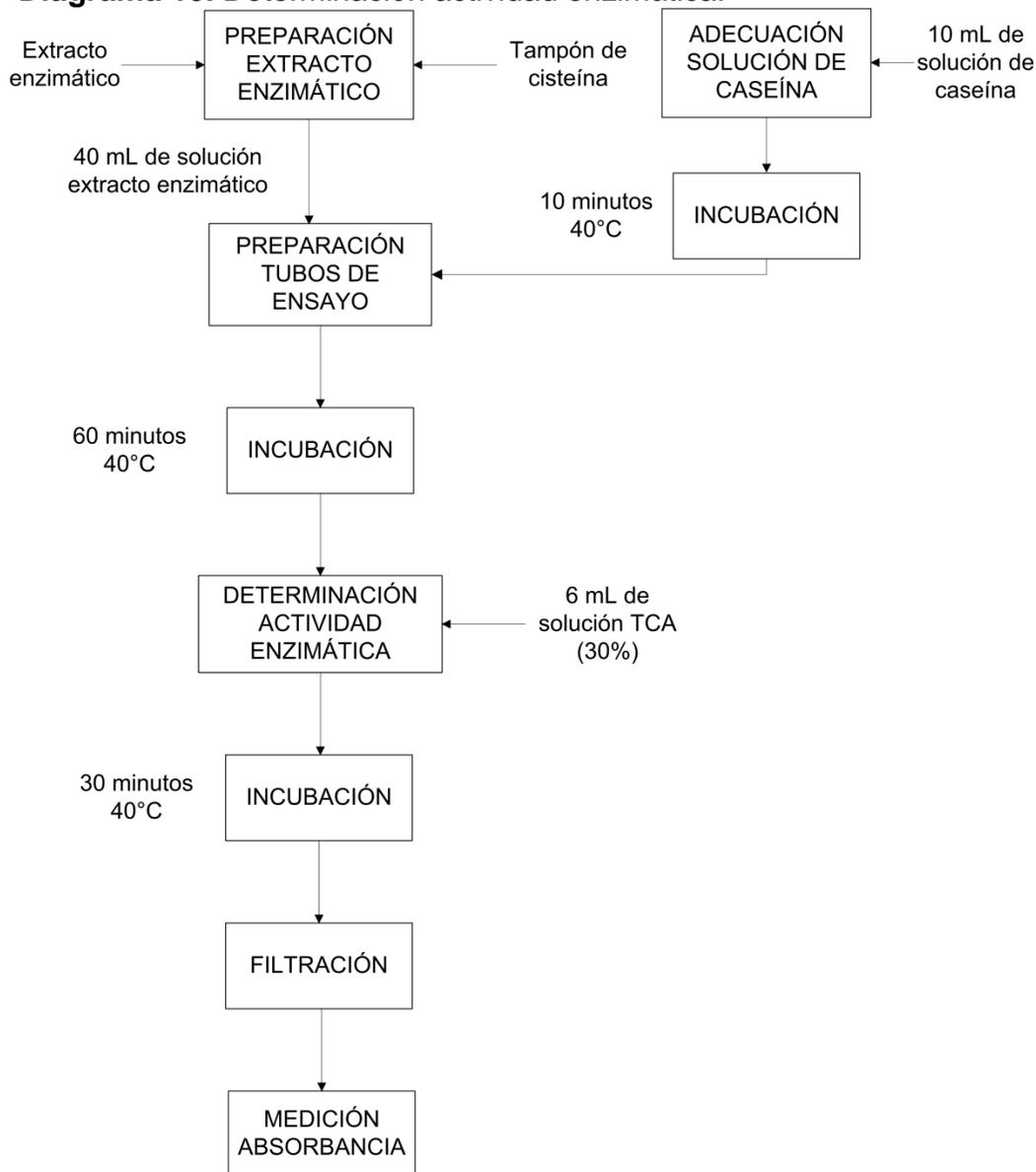
Diagrama 9. Solución de parada de TCA (30%).



Fuente: elaboración propia.

Preparadas las anteriores soluciones, se desarrollará una serie de procesos para la adecuación de las muestras, de igual manera se realizará la medición de absorbancia, todo esto buscando una determinación de la actividad enzimática. El procedimiento seguido se muestra a continuación:

Diagrama 10. Determinación actividad enzimática.



Fuente: elaboración propia.

La preparación del extracto enzimático se desarrollará de la siguiente manera: para la fase TOP o superior generada en el sistema bifásico acuoso, el extracto enzimático se diluirá en el tampón o Buffer de Cisteína en una relación 1:2, para la fase BOTTOM o inferior del mismo sistema se mezclará el extracto y el buffer en una relación 1:1, los extractos generados en el proceso de Salting Out se disolverán en 10 mL de solución tampón de Cisteína. Para cada extracto enzimático se prepararán dos muestras, una que será el blanco y la otra muestra problema, de esta manera únicamente para la muestra problema se adicionarán 4.0 mL de solución de extracto diluida a el tubo de ensayo con 10 mL de Caseína

que debe ser previamente calentada. Transcurrido el tiempo de incubación a 40°C se agregarán 6 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA) 30% p/p a cada tubo de ensayo calentado, a los blancos de las muestras evaluadas se agregará posterior del TCA, los 4.0 mL de extracto de enzima diluido. Se llevará a incubación durante 30 minutos a 40°C, buscando la precipitación de toda la caseína disuelta que no será afectada por la proteólisis producida por la Bromelina. Con la medición de absorbancia de cada una de las muestras que se prepararán se logrará determinar la actividad enzimática de cada una de estas usando la siguiente expresión:

Ecuación 3. Determinación actividad enzimática.

$$\frac{TU}{mL} = DO_{280} \times \frac{V_{Total}}{(V_{Enzima} \times tiempo)} \times \frac{1}{Pendiente} \times FD$$

Dónde:

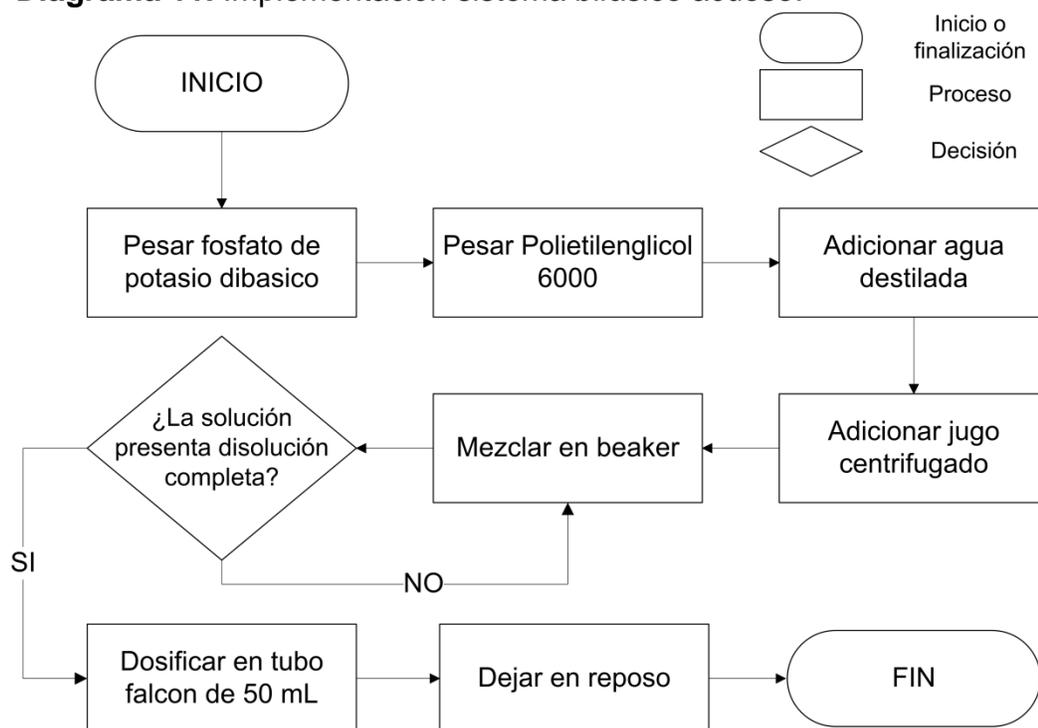
- ✓ $\frac{TU}{mL}$: Unidad enzimática expresada en unidades de Tirosina
- ✓ DO_{280} : Densidad óptica medida a 280 nm menos la densidad óptica del blanco
- ✓ V_{Total} : Volumen de sustrato, enzima y reactivo de terminación (TCA).
- ✓ $tiempo$: Duración de la hidrólisis en minutos
- ✓ $Pendiente$: Pendiente curva de Tirosina
- ✓ FD : Factor de dilución

2.2.4 Extracción de Bromelina. Se desarrollarán dos técnicas de extracción de enzimas, Salting Out y Bifases Acuosa (ATPS), su metodología se describe a continuación.

2.2.4.1 Sistema bifásico acuoso (ATPS). El desarrollo experimental para la extracción mediante el sistema de bifases acuosa se basará en las investigaciones desarrolladas por RAVINDRA, Babu⁷⁷, con algunas modificaciones, que se muestra en el siguiente diagrama de flujo.

⁷⁷ BABU, Ravindra. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification: Liquid-Liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. no. 1. Unitd States: Department of Food Engineering, 2007. p. 83-89.

Diagrama 11. Implementación sistema bifásico acuoso.



Fuente: elaboración propia.

El sistema bifásico acuoso lo componen Fosfato de potasio dibásico, Polietilenglicol (PEG) 6000, agua destilada y jugo centrifugado de cada una de las variedades de piña. Cada uno de los compuestos anteriormente nombrados, deben ser dosificados en un beaker siguiendo el porcentaje en peso mostrado en la tabla 8.

Tabla 6. Dosificaciones a realizar para cada variedad en % peso/peso.

% Fosfato de potasio dibásico	% Agua destilada	% PEG 6000	% Jugo centrifugado
14	54	12	7
16	52	12	7
18	50	12	7
20	48	12	7

Fuente: elaboración propia.

Las anteriores combinaciones se implementarán para cada una de las variedades de piña estudiadas, estas deberán mezclarse en una plancha de agitación magnética a 1000 rpm, verificando por intervalos si la disolución presenta una homogeneidad completa, en el momento de estarlo se dosificarán cada una de las

soluciones en tubos Falcon de 50 mL, que permanecerán en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la solución presentará dos fases, que posteriormente se separarán haciendo uso de una jeringa de 20 mL, se determinará su concentración proteínica y actividad enzimática.

Enseguida se calcularán los coeficientes de partición que representan las concentraciones de Bromelina en las fases superior e inferior de cada combinación y sus actividades enzimáticas, con el propósito de calcular la eficiencia del proceso implementado luego de haber alcanzado el equilibrio. La siguiente expresión se usará para calcular el coeficiente de partición de actividad de la Bromelina (K_{act}):

Ecuación 4. Coeficiente de partición de actividad enzimática.

$$K_{act} = \frac{Act_t}{Act_b}$$

Dónde:

- ✓ Act_t : Actividad enzimática en BTU/mL de la fase TOP o superior
- ✓ Act_b : Actividad enzimática en BTU/mL de la fase BOTTOM o inferior

De igual manera el coeficiente de partición de proteína (K_{prot}) que relaciona las concentraciones de Bromelina en cada fase:

Ecuación 5. Coeficiente de partición de Bromelina.

$$K_{prot} = \frac{Prot_t}{Prot_b}$$

Dónde:

- ✓ $Prot_t$: Concentración de Bromelina en mg/mL de la fase TOP o superior
- ✓ $Prot_b$: Concentración de Bromelina en mg/mL de la fase BOTTOM o inferior

El factor de purificación se calculará con el propósito de saber cuántas veces ha sido purificada la Bromelina respecto de cada uno de los extractos crudos.

Ecuación 6. Factor de purificación.

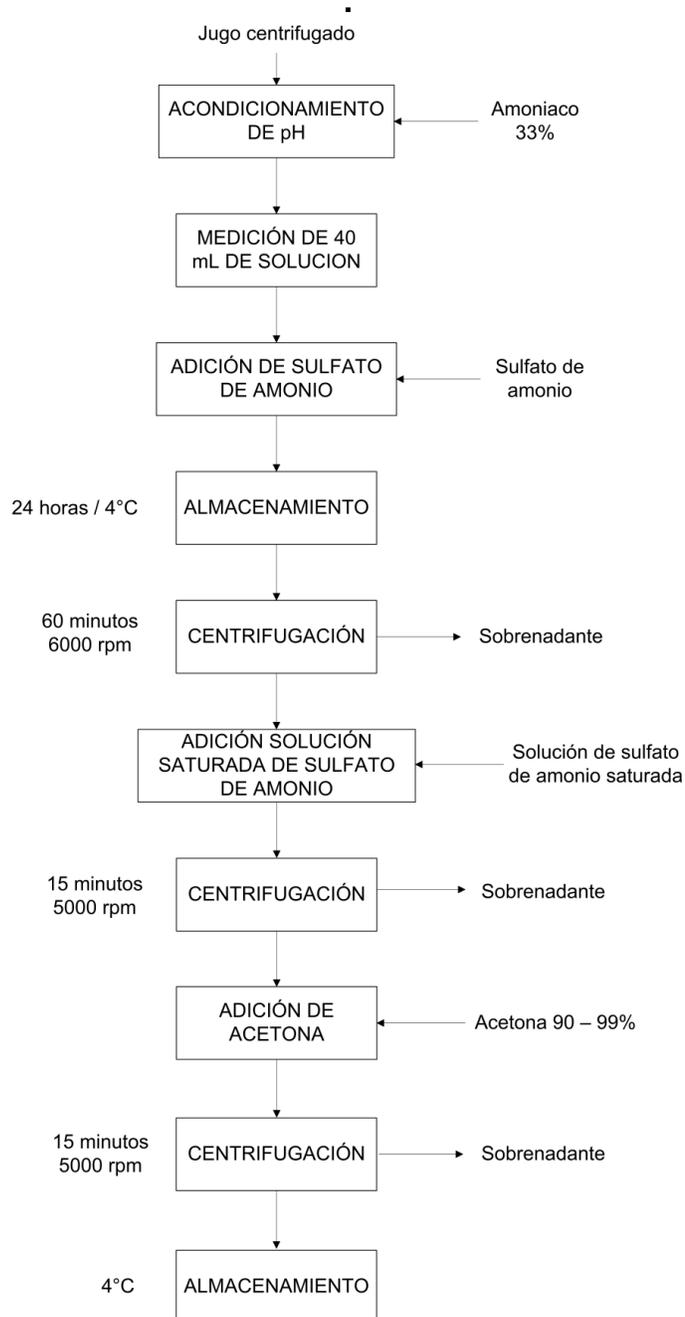
$$FP = \frac{(Act)_t}{(Act)_i}$$

Dónde:

- ✓ Act_t : Actividad enzimática en BTU/mL de la fase TOP o superior
- ✓ Act_b : Actividad enzimática en BTU/mL de cada extracto crudo

2.2.4.2 Extracción de Bromelina por Salting Out. La extracción de Bromelina por medio de la precipitación salina también conocida como Salting Out, se implementará usando sulfato de amonio, amoniaco y acetona como lo describe el siguiente diagrama de bloques.

Diagrama 12. Precipitación salina - Salting Out.



Fuente: elaboración propia

Volúmenes de jugo centrifugado de cada variedad deberán ser llevados a pH de 5, 6 y 7 usando Amoniacó al 33% que se dosificará haciendo uso de una pipeta pasteur y un pH-metro. Ya logradas cada una de las condiciones de pH se procederá a medir 40 mL de jugo centrifugado, esta cantidad se llevará a tubos Falcon de 50 mL, posteriormente se pesará el sulfato de amonio con el propósito de llevar cada una de las muestras a porcentajes de saturación del 35%, 40%, 45% y 50% que se calcularán haciendo uso de la tabla citada en el **ANEXO A**. Cada muestra deberá ser almacenada durante 24 horas a 4°C, buscando una precipitación considerable de Bromelina que perderá solubilidad en el medio inicial, las muestras serán centrifugadas durante 60 minutos a 10°C transcurridas las 24 horas, de esta manera se obtendrá un precipitado rico en Bromelina, será lavado con 4 mL de solución de sulfato de amonio saturada (100%) y 7 mL de Acetona con el propósito de realizar el proceso de desalado, ambas soluciones deberán ser centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos. En la última centrifugación se recuperará el sobrenadante (Acetona) y el precipitado que deberá ser almacenado hasta su posterior uso a 4°C.

2.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Buscando el análisis de variables que intervienen dentro del proceso de extracción enzimática mediante la implementación de procesos de precipitación salina – Salting Out y generación de sistemas bifásicos acuosos (ATPS), se describe a continuación los factores y niveles seleccionados para cada método. Se decide optar por la elaboración de un diseño factorial para cada uno de los dos métodos planteados; las corridas experimentales se desarrollaron por duplicado para cada una de las variedades. Para los análisis estadísticos necesarios se hizo uso del software MINITAB 15, usando un orden aleatorio y un 95% como nivel de confianza.

2.3.1 Factores y niveles para Salting Out. Según la bibliografía citada durante el documento para el proceso de precipitación salina, influyen variables como porcentaje de saturación de la mezcla mediante la adición de sales y pH de la solución, sobre la obtención de precipitado enzimático. Para el factor: Porcentaje de saturación, se seleccionaron niveles en un rango de 35% a 50%, en este rango la enzima según los estudios de ABANTO y REBAZA para la variedad Cayena lisa se presenta mayor cantidad de precipitado. Se opta por trabajar bajo intervalos de 5 unidades porcentuales de saturación para el desarrollo experimental. A porcentajes menores a 35% la enzima no logra precipitarse de manera estable y pronunciada, en cuanto a los porcentajes superiores al 50% de saturación se presentan de igual forma precipitaciones bajas⁷⁸. Para la selección del factor pH, se seleccionaron niveles en un rango de 5 a 7, en este rango la enzima presenta una mejor cantidad de precipitado según ABANTO y REBAZA, de igual forma la Bromelina precipitada no se desnaturaliza por acción de este factor, ambos factores modifican de manera directa las fuerzas iónicas que se presentan en el medio, razón principal de la precipitación de la enzima diana. A continuación en la tabla 9 se resumen los factores y correspondientes niveles seleccionados.

Tabla 7. Factores y niveles - Salting Out.

Factor	Nivel
pH	5
	6
	7
% de saturación	35%
	40%
	45%
	50%

Fuente: elaboración propia.

Enseguida se muestran las corridas experimentales generadas con aleatoriedad para este diseño experimental:

Tabla 8. Corrida experimental - Salting Out.

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	pH	% saturación
20	1	1	1	6	50%
18	2	1	1	6	40%
22	3	1	1	7	40%
4	4	1	1	5	50%
13	5	1	1	5	35%
10	6	1	1	7	40%

⁷⁸ DIAZ, Abanto y REBAZA, Juan, Op. cit., p.44.

Tabla 10. (Continuación)

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	pH	% saturación
17	7	1	1	6	35%
3	8	1	1	5	45%
2	9	1	1	5	40%
1	10	1	1	5	35%
5	11	1	1	6	35%
21	12	1	1	7	35%
11	13	1	1	7	45%
7	14	1	1	6	45%
14	15	1	1	5	40%
24	16	1	1	7	50%
19	17	1	1	6	45%
16	18	1	1	5	50%
23	19	1	1	7	45%
6	20	1	1	6	40%
9	21	1	1	7	35%
8	22	1	1	6	50%
12	23	1	1	7	50%
15	24	1	1	5	45%

Fuente: elaboración propia.

2.3.2 Factor y tratamiento para sistema bifásico acuoso (ATPS). Para la implementación del método ATPS se opta por desarrollar un diseño de experimento de un solo factor, para esto se selecciona como factor el porcentaje en peso de fosfato de potasio dibásico que hace parte del sistema conformado por: agua destilada, polietilenglicol 6000 y extracto crudo. Los tratamientos seleccionados son: 14%, 16%, 18% y 20% peso a peso de fosfato de potasio dibásico que según los estudios de BABU, Ravindra es donde se presenta mayor actividad enzimática para la extracción de Bromelina; basados en los tratamientos propuestos se conforman las combinaciones que se muestran en la tabla 8⁷⁹.

⁷⁹ BABU, Ravindra, Op. cit., p. 88.

Tabla 9. Factor y tratamientos para Sistema bifásico acuoso ATPS.

Factor	Tratamientos
	14%
% p/p de fosfato de potasio dibásico	16%
	18%
	20%

Fuente: elaboración propia.

La participación del Polietilenglicol (PEG) 6000 para cada una de las combinaciones será del 12% p/p, a este porcentaje se presentan los mejores comportamientos de actividad enzimática para la fase TOP, que será la fase deseada y donde se ubicará la mayor cantidad de enzima⁸⁰. Para dar cumplimiento al diseño experimental propuesto, se opta por realizar un análisis de varianza que permitirá determinar si los tratamientos del factor son relevantes y causan efectos sobre la variable respuesta. Para esto se plantean las siguientes hipótesis.

- ✓ *Hipótesis nula:* El efecto de los porcentajes en peso de fosfato de potasio dibasico, sobre la actividad enzimática de la Bromelina separada en la fase TOP son el mismo, por lo tanto el factor seleccionado no es relevante sobre la actividad enzimática.
- ✓ *Hipótesis alterna:* Uno o más tratamientos del factor producen diferentes efectos sobre la actividad enzimática de la fase TOP del sistema, por lo tanto el factor seleccionado es relevante.

⁸⁰ Ibid., 84 p.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se desglosan los resultados obtenidos para cada uno de los procedimientos desarrollados basados en la metodología descrita en el capítulo anterior y paralelamente se analizarán, la experimentación tuvo lugar en las instalaciones del Tecnoparque – Nodo: Biotecnología y nanotecnología, área perteneciente al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).

3.1 ACONDICIONAMIENTO

Inicialmente se extrae el jugo contenido en los corazones haciendo uso del extractor de marca SALADMASTER donde se obtiene un rendimiento promedio del 90% para las tres variedades procesadas, de esta manera un 10% corresponde a fibra que se descarga por un conducto lateral del extractor, esto se ve reflejado en el diagrama de bloques 1.

La centrifugación de cada porción líquida de jugo de corazón de piña a procesar proveniente del extracto de jugo, permite determinar el rendimiento hacia jugo centrifugado libre de fibra, listo para ser tratado por los métodos de extracción enzimática. A continuación se presenta el promedio de la participación del peso de sobrenadante libre de fibra respecto al peso de jugo sin centrifugar para cada una de las variedades.

Tabla 10. Rendimiento de centrifugación.

Variedad	Rendimiento
Amazónica	70 - 90%
Golden MD2	70 - 90%
Mayanes	70 - 90%

Fuente: elaboración propia.

El proceso de centrifugación de las tres variedades de piña presenta rendimientos altos, lo que permite asegurar que la eliminación de material fibroso suspendido en este proceso es considerable. Es importante eliminar en su totalidad el material fibroso, debido a que puede influir en el análisis de características de extractos enzimáticos obtenidos en los procesos de extracción posteriores.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE MATERIA PRIMA

3.2.1 Humedad. La determinación de humedad de corazón, para cada una de las tres variedades de piña se realiza por cuadruplicado, los promedios se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 11. Humedad corazones de piña.

Variedad	Humedad
Amazónica	80 - 90%
Mayanes	80 - 90%
Golden MD2	80 - 90%

Fuente: elaboración propia.

La variedad Amazónica alcanza un promedio de 80 - 90%, valor cercano al registrado por BARRERA, Jaime, et al. que fue del 88% para la misma variedad (c.v. India).⁸¹ La variedad Mayanes presenta una humedad similar a la Amazónica, sin embargo dentro del proceso de determinación de humedad se puede observar, que esta variedad presenta mayor dificultad para ser deshidratada por presentar un tipo de agua libre o absorbida, encerrada en tejidos que limitan su evaporación.⁸² Dentro de la literatura la variedad que por excelencia presenta una mayor cantidad de azúcares es la variedad Golden MD2; su porcentaje de humedad fue el menor en comparación a las otras variedades, debido a su excesiva maduración, efecto que surge por la exposición a el ambiente que se hace al fruto posterior a su cosecha de manera prolongada.⁸³

3.2.2 Grados Brix. En la actualidad no existe alguna normativa referente a los grados brix que debe presentar el tallo o corazón de la piña, sin embargo los grados brix que debe presentar la pulpa de un fruto fresco y maduro según la NTC 729-1 de 1996 debe ser como mínimo de 14.1⁸⁴. Los resultados obtenidos a partir de la determinación de los grados brix haciendo uso de un refractómetro para cada una de las variedades de piña se presenta en la tabla 14.

⁸¹ AREVALO, Symey. Agua en los alimentos. Trabajo de grado para optar por el título profesional de Ingeniero en industrias Alimentarias. Iquito, Perú. Escuela de formación profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. 2017. p. 1.

⁸² DANE. Op. cit., p. 2.

⁸³ REINA, Carlos. Manejo pos cosecha y evaluación de la calidad para la piña (*Ananas comosus*). Que se comercializa en la ciudad de Neiva. Trabajo de grado para optar por el título profesional de Ingeniero Agrícola. Neiva, Colombia. Universidad Surcolombiana. 1994. p. 76.

⁸⁴ COLOMBIA. INCONTEC. Op. cit., p. 1-12.

Tabla 12. Grados Brix de cada una de las variedades estudiadas.

Variedad	Grados Brix (°Bx)
Amazónica	10
Mayanes	8
Golden MD2	12

Fuente: elaboración propia.

Los valores obtenidos para el jugo de corazón de piña, de cada una de las variedades son inferiores a los que reporta la NTC 729-1, sin embargo es importante aclarar que por tratarse del tallo del fruto, la cantidad de azúcares es menor debido a que la producción de azúcares se concentra en la pulpa⁸⁵. Según los estudios adelantados por VEGA, Karla se logró una determinación de los grados brix del corazón o tallo de la piña Cayena Lisa dando como resultado 7.0⁸⁶, valor cercano a los obtenidos para las variedades de piña Amazónica, Mayanes y Golden MD2. Los grados brix son una determinación de los sólidos solubles presentes en una muestra, expresados como el peso aproximado de azúcares; teniendo así valores coherentes por tratarse del corazón que es una parte del fruto de la piña que presenta menor proporción de azúcares con respecto a la pulpa de esta donde normalmente los grados brix se encuentran entre 14 y 18.⁸⁷

3.2.3 Acidez titulable. El procedimiento para la determinación de acidez para cada variedad, permite determinar el porcentaje de ácido cítrico en cada variedad; los valores determinados se encuentran cercanos al presentado por la NTC 729-1, que es del 0.30% de ácido cítrico para la el fruto de la Piña⁸⁸. La determinación del parámetro para cada variedad se realiza por triplicado como se muestra en la figura 6.

Tabla 13. %p/p de Ácido cítrico en cada variedad.

Variedad	% (p/p) Ácido cítrico
Amazónica	0.26%
Mayanes	0.27%
Golden	0.64%

Fuente: elaboración propia.

⁸⁵ VEGA, Karla, Op. cit., p. 43

⁸⁶Ibid., p. 43.

⁸⁷ QUINDE, Carmina y SANCHEZ, Nancy. Op. cit., p. 13.

⁸⁸ COLOMBIA. INCONTEC. Op. cit., p. 1-12.

Figura 6. Solución de jugo titulada



Fuente: elaboración propia.

3.2.4 pH. Al jugo extraído se le determina el pH haciendo uso de un potenciómetro por triplicado para cada variedad, los valores obtenidos se enuncian en la tabla 16.

Tabla 14. pH de jugo crudo.

Variedad	pH
Amazónica	4.54
Mayanes	4.36
Golden	3.22

Fuente: elaboración propia.

Aunque la norma técnica Colombia 729-1 no realiza una aclaración para pH óptimo del fruto maduro, los valores determinados son cercanos a los hallados por VEGA, Karla para jugo de corazón de piña que fue de 4.02. Como lo enuncia GARCIA, Yelene, el fruto de piña presenta mayor acidez en su pulpa que en el resto del fruto, teniendo valores promedio de 3.2, sin embargo se aclara que el fruto en su totalidad tiende con el paso de los días a aumentar su pH, por efecto del estrés provocado en la recolección y maduración por efectos de temperatura y condiciones de humedad ambiental.⁸⁹

⁸⁹ GARCIA, Yelene, et al., Op. cit., p. 4.

3.2.5 Determinación de concentración de Bromelina (Metodo Biuret). Cada uno de los jugos centrifugados de cada variedad, es sometido a la prueba de Biuret para la determinación de concentración proteínica, que arrojo los valores expuestos en la siguiente tabla; la curva de calibración para el ensayo se muestra en el ANEXO B:

Tabla 15. Concentración de bromelina en jugos extraídos crudos.

Variedad	Concentración (mg/mL)
Amazónica	40 - 60
Mayanes	90 - 110
Golden MD2	30 - 50

Fuente: elaboración propia.

El proceso se desarrolla por triplicado, a condiciones de incubación estrictas, donde el jugo de la variedad Mayanes presenta mayor concentración de Bromelina; siendo un precedente importante, pues su elección en procesos posteriores de extracción llevara a la obtención de extractos enzimáticos concentrados y altos rendimientos hacia cantidad de Bromelina. Según las revisiones de AVELLA, Juan, et al. la concentración de Bromelina de tallo varía según las condiciones a las que es sembrada la planta de Piña, como lo son pH del suelo, humedad relativa del ambiente y tasa de riego del cultivo; donde se encuentra que la variedad Mayanes presenta una concentración de 110 a 120 mg/mL, concentración aproximada a la determinada.⁹⁰

3.2.6 Determinación de actividad enzimática (Curva Tirosina). La determinación de actividad enzimática para cada jugo centrifugado crudo, se resume en la tabla 18, que agrupa los valores obtenidos en el desarrollo de la ecuación 3.

Tabla 16. Actividad enzimática para extractos de jugo crudos.

Variedad	Actividad enzimática (TU/mL)
Amazónica	0.5 – 1
Mayanes	0.3 – 0.7
Golden MD2	3.0 – 4.0

Fuente: elaboración propia.

⁹⁰ AVELLA, Juan, et al. Aprovechamiento residuos biomasa de producción de piña (*Ananas comosus*) para municipio de Aguazul Casanare. Aguazul, Casanare. Tecnologías de la información de la Orinoquia (TICSO). p. 101 -108.

La evaluación de la actividad enzimática de los extractos de jugo de piña permite conocer el estado enzimático de la Bromelina, actividad que depende de su temperatura, pH y concentración de sustrato⁹¹. Es importante resaltar que esta característica permite desarrollar un análisis posterior a los métodos de extracción evaluados, debido a que los métodos de extracción permiten recuperar la actividad enzimática de la Bromelina. Para este caso los extractos de jugo crudo presentan actividades enzimáticas cercanas a las reportadas por MOHAN, Resmi, et al. donde para un extracto crudo se tuvo un valor de 4.02 TU/mL.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos para el proceso de caracterización de las tres variedades de corazón de piña analizadas.

Tabla 17. Caracterización de Corazones.

Variedad	Humedad	°Brix	Acidez titulable %(p/p) Ácido cítrico	pH	Concentración (mg/mL)	Actividad enzimática (TU/mL)
Amazónica	80 - 90%	10	0.26%	4.54	40 - 60	0.5 – 1
Mayanes	80 - 90%	8	0.27%	4.36	90 - 110	0.3 – 0.7
Golden MD2	80 - 90%	12	0.64%	3.22	30 - 50	3.0 – 4.0

Fuente: elaboración propia.

La tabla 19 resume las características de cada uno de los extractos de jugo de corazón de piña sin procesar, que permite concluir que los frutos se encontraban en estado maduro por las razones ya presentadas y que su concentración enzimática es considerable por tratarse de frutos maduros. Aunque las actividades enzimáticas se encuentran por debajo de la reportada por MOHAN, Resmi, et al., es importante aclarar que la actividad se puede recuperar, por acción de condiciones de operación de los procesos de extracción enzimática y de igual forma por los componentes de cada uno de los métodos a evaluar.⁹² La Piña es la única fruta que presenta concentraciones altas de proteasas en condiciones de maduración avanzada en comparación con frutas con contenido de enzimas proteolíticas como la Papaya.⁹³

⁹¹ AVELLA, Juan, et al. Op. cit., p. 100.

⁹² MOHAN, Resmi, et al. Optimisation of Bromelain enzyme extraction from Pineapple (*Ananas comosus*) and application in process industry. India. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 18 de Agosto del año 2016 188 – 195 p.

⁹³ QUINDE, Carmina y SANCHEZ, Nancy, Op. cit., p. 34.

3.3 EXTRACCIÓN DE BROMELINA

3.3.1 Sistema bifásico acuoso (ATPS). Para el desarrollo experimental de los sistemas de bifases acuosas se agregan cada uno de los componentes como lo indica la tabla 20, donde se muestran cada una de las participaciones en % p/p de los componentes que para este caso fueron: Polietilenglicol 6000, fosfato de potasio dibasico, agua y por ultimo jugo centrifugado de corazón de piña de cada variedad.

Tabla 18. %p/p de componentes en sistema bifasico acuosos.

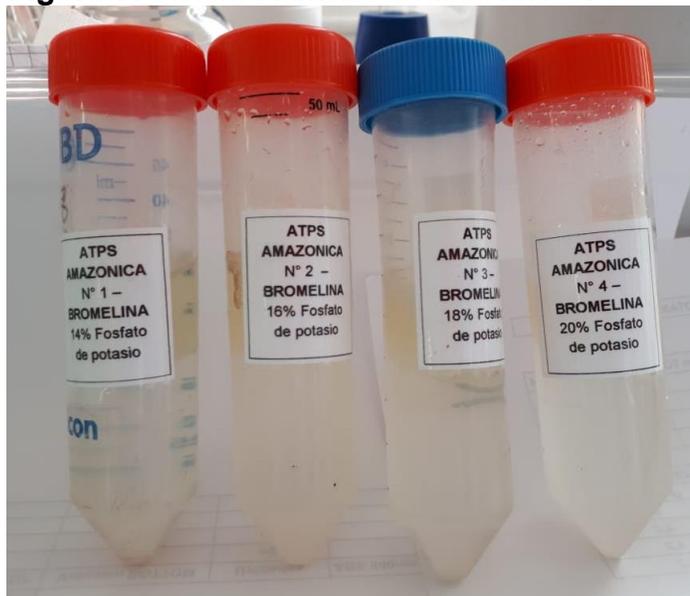
Combinación	% Fosfato de potasio dibasico	% Agua destilada	% PEG 6000	% Jugo centrifugado
1	10 - 30	40 - 60	10 - 20	5 -15
2	10 - 30	40 - 60	10 - 20	5 -15
3	10 - 30	40 - 60	10 - 20	5 -15
4	10 - 30	40 - 60	10 - 20	5 -15

Fuente: elaboración propia.

Se agrega cada uno de los componentes a un beaker de 200 mL que se ubica sobre una plancha de agitación magnética, donde se desarrolla el proceso de homogenización, ya mezclados en su totalidad todos los componentes se trasladaron a tubos falcon de 50 mL que fueron almacenados a temperatura ambiente y total oscuridad durante 24 horas, transcurrido este tiempo se logra estabilizar el sistema y se forman dos fases como lo muestra la figura 5. El proceso se desarrolla por duplicado para cada combinación y variedad utilizada.⁹⁴

⁹⁴ BABU, Ravindra, Op. cit., p. 88.

Figura 7. Sistema bifásico acuoso ATPS.



Fuente: elaboración propia.

Cada una de las fases (TOP y BOTTOM) se lleva por separado a frascos como lo muestra la siguiente figura.

Figura 8. Fases sistema bifásico acuoso.



Fuente: elaboración propia.

Los volúmenes de cada fase fueron medidos haciendo uso de una jeringa aforada que permitió conocer cada uno de los volúmenes de las fases dentro del sistema, los resultados para cada variedad y fase se presentan a continuación.

Tabla 19. Volúmenes de fases para la variedad Amazónica.

Combinación	Volumen TOP (mL)	Volumen BOTTOM (mL)	Razón de volumen
1	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
2	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
3	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
4	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6

Fuente: elaboración propia.

Tabla 20. Volúmenes de fases para la variedad Mayanes.

Combinación	Volumen TOP (mL)	Volumen BOTTOM (mL)	Razón de volumen
1	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
2	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
3	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
4	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6

Fuente: elaboración propia.

Tabla 21. Volúmenes de fases para la variedad Golden MD2.

Combinación	Volumen TOP (mL)	Volumen BOTTOM (mL)	Razón de volumen
1	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
2	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
3	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6
4	6 - 8	10 - 15	0.2 – 0.6

Fuente: elaboración propia.

La participación de la fase TOP en cada uno de los sistemas disminuye conforme el porcentaje de sal aumenta, esto por tratarse de un efecto de salado o Salting Out que obedece a una partición de la Bromelina hacia la fase superior, concentrándola en la fase rica en polietilenglicol 6000, efecto deseado para este tipo de sistemas. Se varía únicamente el porcentaje de participación de fosfato de potasio y porcentaje de agua, porque un aumento en la concentración del polímero en el sistema puede llegar a particionar la enzima hacia la fase BOTTOM o inferior, fenómeno que dificulta la separación de la enzima de esta fase⁹⁵.

La determinación de concentración enzimática se llevó a cabo como lo describe el diagrama de bloques 5 que involucro el Metodo de Biuret, para una buena determinación de absorbancia en el espectrofotómetro cada una de la fases fue diluida en una proporción de 2:3 para volumen de fase y agua respectivamente. De la dilución anteriormente descrita se evalúa su absorbancia, que es comparada con la curva de calibración mostrada en el **ANEXO B** y sus valores de

⁹⁵ BABU, Ravindra, Op. cit., p. 83.

concentración de Bromelina se resumen a continuación para cada una de las variedades y combinaciones.

Tabla 22. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Amazónica.

Combinación	Fase	Concentración (mg/mL)
1	TOP	20 - 25
	BOTTOM	8 - 12
2	TOP	18 - 22
	BOTTOM	8 - 12
3	TOP	14 - 16
	BOTTOM	8 - 10
4	TOP	12 - 16
	BOTTOM	6 - 8

Fuente: elaboración propia.

Tabla 23. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Mayanes.

Combinación	Fase	Concentración (mg/mL)
1	TOP	38 - 42
	BOTTOM	10 - 13
2	TOP	36 - 39
	BOTTOM	10 - 13
3	TOP	28 - 33
	BOTTOM	20 - 24
4	TOP	30 - 34
	BOTTOM	10 - 14

Fuente: elaboración propia.

Tabla 24. Concentración de Bromelina en fases para la variedad Golden MD2.

Combinación	Fase	Concentración (mg/mL)
1	TOP	27 – 31
	BOTTOM	8 – 11
2	TOP	9 – 12
	BOTTOM	9 – 11
3	TOP	9 – 12
	BOTTOM	9 – 11
4	TOP	16 – 19
	BOTTOM	9 – 12

Fuente: elaboración propia.

La combinación para cada una de las variedades que presenta mayor concentración de Bromelina se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 25. Concentraciones de Bromelina Sistema bifásico acuoso (ATPS).

Variedad	Combinación	Fase	Concentración (mg/mL)
Amazónica	1	TOP	18 – 23
Mayanes	1	TOP	37 – 40
Golden MD2	1	TOP	27 - 31

Fuente: elaboración propia.

La fase TOP en general tiene una concentración de Bromelina mayor en relación con la fase BOTTOM, debido a las condiciones que favorecen la partición de la Bromelina hacia dicha fase, como lo es la concentración de sal en la solución que es del 14% p/p y concentración de polietilenglicol 6000. Determinadas cada una de las concentraciones se procede a realizar la determinación de la actividad enzimática de cada fase generada, que corresponde a la variable respuesta del diseño de experimentos propuesto para este método. Enseguida se muestra el análisis de varianza ANOVA que se desarrolla con el objetivo de determinar si el factor: % p/p de Fosfato de potasio dibásico tiene influencia sobre la variable respuesta: Actividad enzimática para la fase TOP de cada una de las variedades. Este análisis de desarrolla para cada una de las tres variedades estudiadas.

3.3.1.1 Variedad Amazónica. La siguiente tabla muestra los resultados del análisis estadístico, que serán descritos e interpretados a continuación.

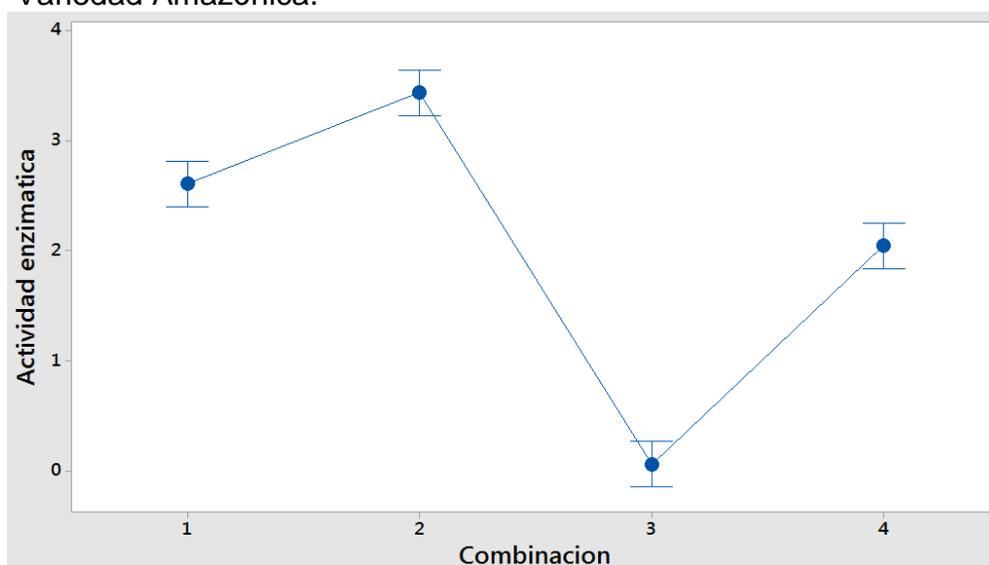
Tabla 26. Análisis de varianza para variedad Amazónica – ATPS.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Combinación	3	12.3038	4.1013	368.2400	0.0000
Error	4	0.0445	0.0111		
Total	7	12.3484			

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Según el “Valor P” que hace referencia al estadístico de prueba para el modelo, indica que el factor tiene efecto sobre la actividad enzimática de cada uno de los experimentos, delimitado por la condición de $p < 0.05$, que al cumplirse hace que la hipótesis alterna presentada en la sección 2.3.2 se acepte. La grafica 2 muestra el comportamiento de la actividad enzimática en la fase TOP para cada uno de las combinaciones propuestas en la tabla 20, donde se observa que para la combinación 2 que corresponde a un 16% de concentración de sal en la solución, se presenta una mayor actividad enzimática, determinando así la combinación que más favorece a la variedad Amazónica.

Grafica 2. Intervalos de actividad enzimática y combinación – Variedad Amazónica.



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

3.3.1.2 Variedad Mayanes. Se muestra a continuación el análisis estadístico aplicado a las corridas experimentales para la variedad Mayanes implementando ATPS, la siguiente tabla resume el análisis ANOVA de un solo factor que se determinó.

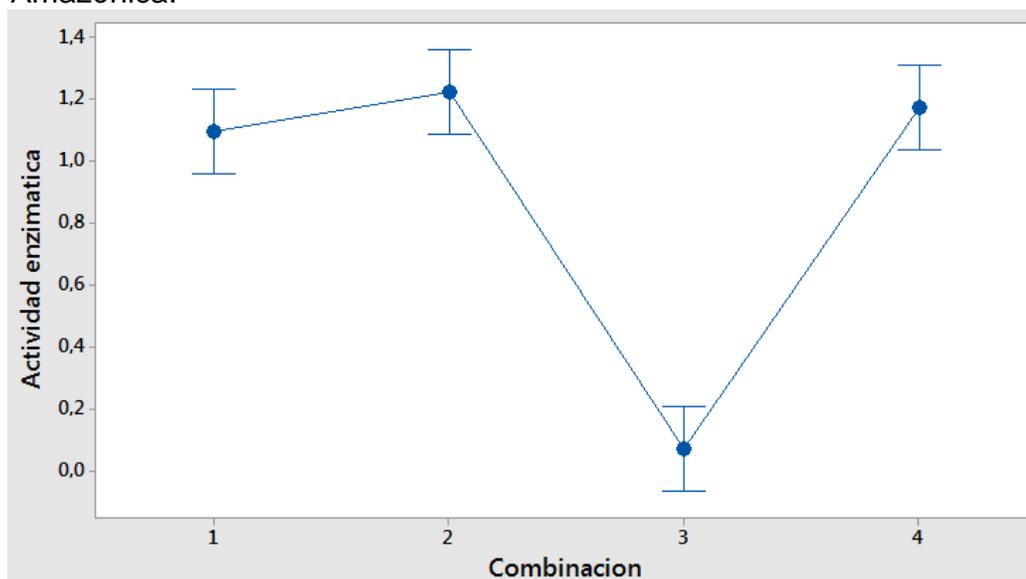
Tabla 27. Análisis de varianza para variedad Mayanes - ATPS.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Combinación	3	1.8157	0.6052	123.8400	0.0000
Error	4	0.0196	0.0049		
Total	7	1.8353			

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

El análisis estadístico presenta el mismo dictamen que se dio para la variedad Amazónica, de esta manera se logra aceptar la hipótesis alterna, concluido lo anterior se procede a determinar que combinación resulta más apropiada para la obtención de extractos enzimáticos con mayor actividad enzimática al procesar corazones de la variedad Mayanes.

Grafica 3. Intervalos de actividad enzimática y combinación – Variedad Amazónica.



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

En la gráfica 3 se logra observar que la combinación 2 correspondiente al sistema conformado por 16% p/p de fosfato de potasio dibásico, presenta una fase TOP que contiene Bromelina con la actividad enzimática más alta de los demás tratamientos, con esto se determina la mejor combinación para la variedad Mayanes. A pesar de ser la variedad que tiene mayor concentración de Bromelina en su corazón, no es la que mejor condición enzimática tiene dentro de las variedades estudiadas, esto permite concluir que las variables concentración y actividad enzimática no son directamente proporcionales y que no dependen una de la otra.

3.3.1.3 Variedad Golden MD2. El análisis de varianza de un factor para los sistemas bifásicos acuosos correspondientes a la variedad Golden MD2 se presenta a continuación.

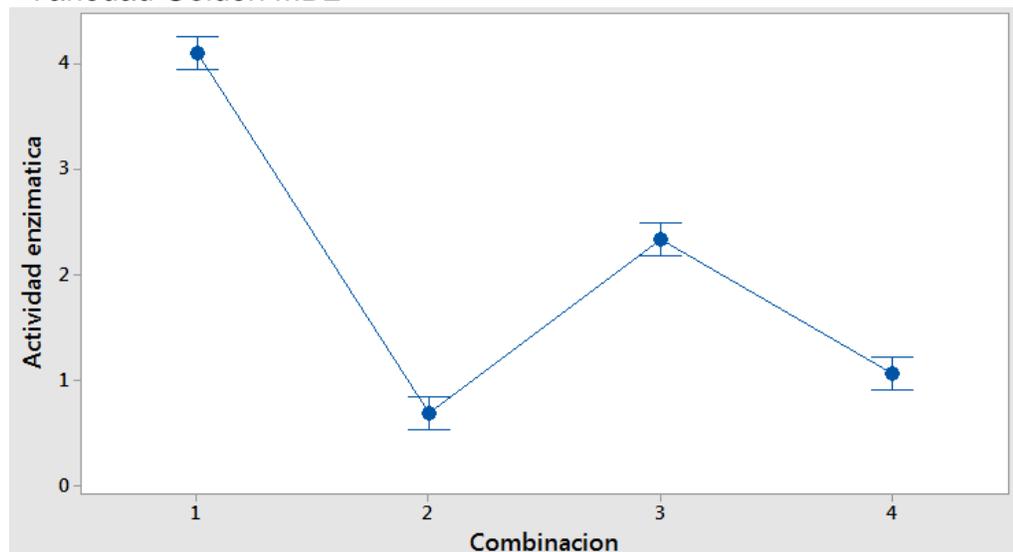
Tabla 28. Análisis de varianza para variedad GOLDEN MD2 - ATPS.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Combinación	3	14.2597	4.7533	750.0200	0.0000
Error	4	0.0254	0.0063		
Total	7	14.2851			

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

La grafica 4 presenta un comportamiento, que permite concluir que la interacción entre los factores es significativa sobre la variable respuesta cuando se trata de la formulación de sistemas bifásicos acuosos para la variedad Golden MD2. La grafica 4 de intervalos, permite aseverar que la combinación 1 (14% de fosfato de potasio dibásico) es provechosa cuando se quiere implementar el método de bifases acuosas usando la variedad Golden MD2 por tener la actividad enzimática más alta.

Grafica 4. Intervalos de actividad enzimática y combinación – Variedad Golden MD2



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Al realizar un proceso de extracción enzimático no solo son importantes las características enzimáticas de proteína extraída, sino también la concentración con la que cuenta el extracto, pues de estas dependerá su rendimiento en escenarios donde se requiera el uso de sus propiedades. El siguiente es un resumen de la combinación seleccionada para cada variedad, incluyendo la

concentración de Bromelina, coeficientes de partición y factores de purificación para cada una.

Tabla 29. Resumen selección de parámetros para bifases acuosas ATPS.

Variedad	Combinación	Concentración (mg/mL)	Actividad enzimática (TU/mL)	Kact	Kprot	PF
Amazónica	2	19 – 22	3 – 5	2.71	1.88	3 - 4
Mayanes	2	36 – 39	1 – 3	0.65	3.25	2 - 4
Golden MD2	1	28 - 31	4 - 7	1.51	2.92	1 - 3

Fuente: elaboración propia.

La variedad que mejor combinación presenta respecto a actividad enzimática y concentración en el sistema bifásico acuoso es la Golden MD2, que obtiene un valor de actividad y concentración de 4 - 7 TU/mL y 28 - 31 mg/mL respectivamente. De igual forma se puede observar que gracias al cálculo del coeficiente de partición de actividad (Kact) para cada una de las condiciones seleccionadas, se evidencia que la actividad enzimática logra ser superior para la variedad Amazónica y Golden MD2 y para la variedad Mayanes alcanza a ser un 65% de la que presenta la fase BOTTOM de la misma. Concluyendo que el extracto presenta un mejor comportamiento enzimático para la fase deseada TOP por la no interferencia de la sal en su conformación enzimática; de igual forma se calcula el coeficiente de partición de proteína (Kprot) que relaciona la concentración de Bromelina de ambas fases, brindando valores que expresan que la concentración de la fase TOP para todos los preparados es de mayor magnitud lo que traduce a mayor cantidad de Bromelina que puede ser extraída.

El factor de purificación para esta evaluación fue superior al presentado por QUINDE, Carmina y SÁNCHEZ, Nancy, donde se desarrolló el mismo método, a diferencia que en la etapa de acondicionamiento se agregó solución de benzoato de sodio, que tiene el objetivo de preservar la muestra pero que afecta de manera notoria la actividad enzimática de la Bromelina a particionar por efecto de las interacciones entre las sustancias.⁹⁶

⁹⁶ QUINDE, Carmina y SANCHEZ, Nancy. p. 92.

3.3.2 Precipitación salina - Salting Out. Para el proceso de precipitación salina se usa Sulfato de amonio como agente precipitante, porque sus propiedades de generar fuerzas iónicas elevadas permiten que la Bromelina pierda solubilidad en el medio conformado únicamente por jugo de corazón de piña centrifugado y sulfato de amonio⁹⁷; las cantidades de sulfato de amonio a agregar se calculan haciendo uso del ANEXO A que brinda cantidades de Sulfato de amonio para distintos grados de saturación. Se establecen factores para el experimento que tienen importancia en la purificación de Bromelina durante el método de Salting Out, variables que inciden sobre la cantidad de precipitado, las cuales fueron pH y porcentajes de saturación. Las cantidades de sal a agregar se pesan haciendo uso de una balanza analítica, desarrollado este procedimiento se llevan a un tubo falcon de 50 mL haciendo uso de un embudo de vidrio, el tubo falcon contiene 40 mL de jugo centrifugado, este sistema se agita con ayuda de un vortex y se almacena a 4°C en el refrigerador, transcurridas 24 horas se retira y centrifuga para obtener el precipitado de Bromelina deseado. A continuación se presenta el análisis estadístico para cada una de las variedades bajo el diseño de experimentos planteado en la sección 2.3.1. para el método Salting Out.

3.3.2.1 Variedad Amazónica. Haciendo uso del software MINITAB 15 se desarrolla el análisis estadístico para la interacción de los factores ya mencionados, enseguida se muestra el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 30. Análisis de varianza para variedad Amazonica – Salting Out.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Modelo	11	0.042541	0.003867	47.83	0.000
Lineal	5	0.026004	0.005201	64.33	0.000
pH	2	0.008729	0.004364	53.98	0.000
% de saturación	3	0.017275	0.005758	71.22	0.000
Interacciones de 2 términos	6	0.016537	0.002756	34.09	
pH * % saturación	6	0.016537	0.002756	34.09	
Error	12	0.000970	0.000081		
Total	23	0.043511			

Resumen del modelo

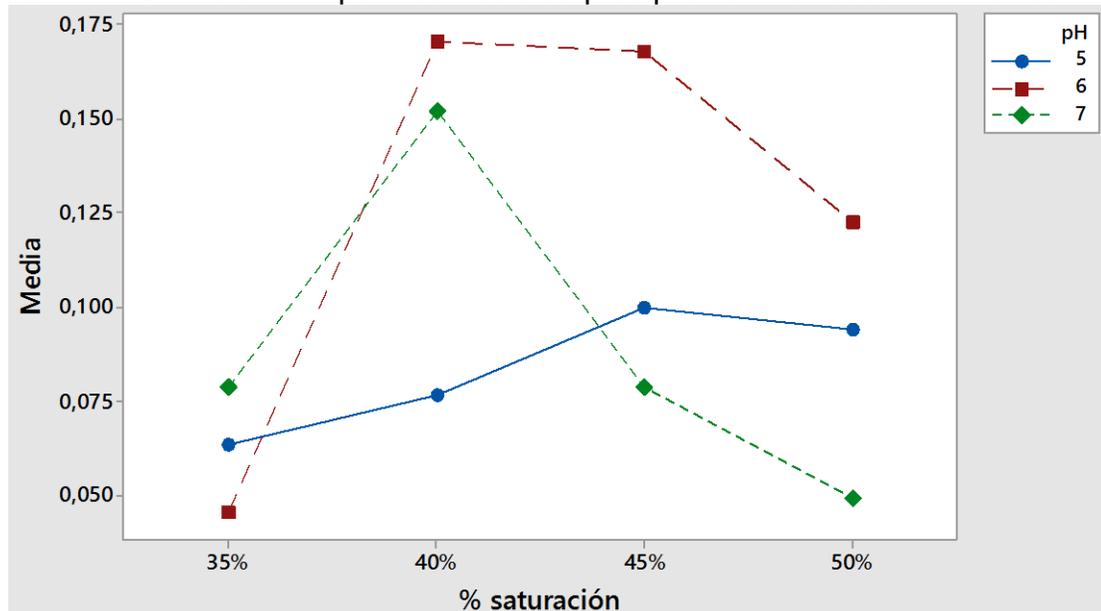
	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0089916	97.77%	91.08%

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

⁹⁷ DUONG, Krisna y GABELLI, Sandra. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *En: Methods in Enzymology*. Volumen 541. Baltimore, USA: Elsevier Inc, 2014. p. 85 – 88.

El valor p del modelo indica la significancia que genera la interacción de los factores involucrados sobre la variable respuesta, que para este caso fue la cantidad de precipitado generado medida en gramos; otro factor importante fue el coeficiente de correlación predecible y calculado que presentan una proximidad considerable al 100%, demostrando una vez más que la interacción de los factores es determinante sobre la variable respuesta. La grafica 8 representa las interacciones entre los factores y medias para cantidad de precipitado obtenido.

Grafica 5. Interacción para cantidad de precipitado - Variedad Amazónica.



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Para la variedad Amazónica las condiciones de pH y porcentaje de saturación que más se ajustan para obtener la mayor cantidad de precipitado son: pH=6 manejando un porcentaje de saturación del 40%, el comportamiento de las otras combinaciones muestra comportamientos descendentes, generando valores para la variable respuesta indeseados.

3.3.2.2 Variedad Mayanes. Se desarrolla de igual forma un análisis de varianza para las interacciones de las corridas experimentales que generan los siguientes resultados.

Tabla 31. Análisis de varianza para variedad Mayanes – Salting Out.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Modelo	11	0.166373	0.015125	64.29	0.000
Lineal	5	0.099442	0.019888	84.54	0.000
pH	2	0.012544	0.006272	26.66	0.000
% de saturación	3	0.086898	0.028966	123.12	0.000
Interacciones de 2 términos	6	0.66931	0.011155	47.42	0.000
pH * % saturación	6	0.66931	0.011155	47.42	0.000
Error	12	0.002823	0.000235		
Total	23	0.169197			

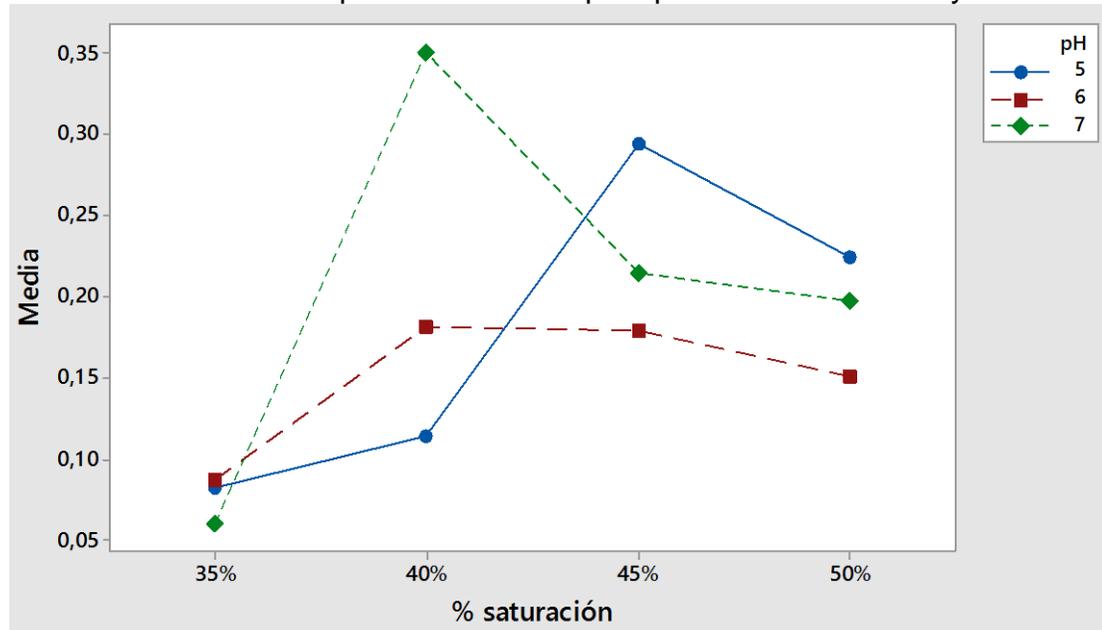
Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0153381	98.33%	93.33%

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Se comprueba nuevamente que las interacciones entre los factores son significantes sobre la variable respuesta, a partir de esto se puede generar la gráfica que evalúa las interacciones, determinando la mejor combinación que presenta mejor comportamiento en el momento de procesar corazones de la variedad Mayanes.

Grafica 6. Interacción para cantidad de precipitado - Variedad Mayanes.



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Para esta variedad el porcentaje de saturación permanece igual que para la variedad Amazónica, pero trabajando el extracto de jugo centrifugado a pH=7. Al aumentar el porcentaje de saturación de la mezcla, la tendencia a que exista precipitado disminuye en casi un 50% para pH=7.

3.3.2.3 Variedad Golden MD2. Dando continuidad al análisis estadístico, se presenta en la siguiente tabla el análisis de varianza donde se comprueba que los factores evaluados para la variedad Golden MD2 son significantes sobre la variable respuesta.

Tabla 32. Análisis de varianza para variedad Golden MD2 – Salting Out.

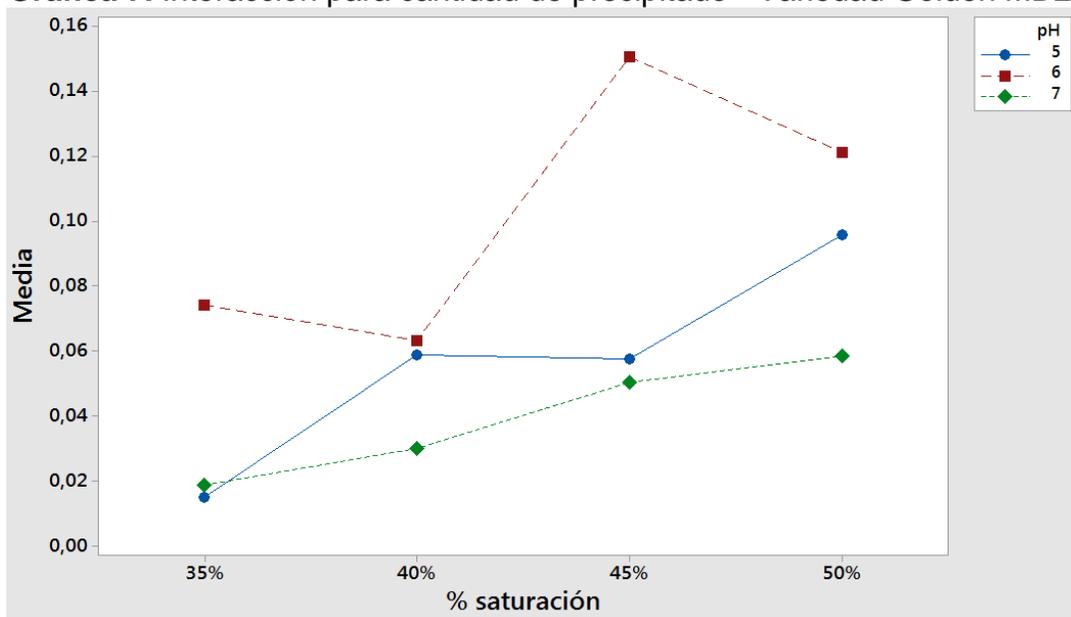
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Modelo	11	0.035284	0.003208	76.29	0.000
Lineal	5	0.029996	0.005999	142.68	0.000
pH	2	0.016783	0.008392	199.59	0.000
% de saturación	3	0.13213	0.004404	104.75	0.000
Interacciones de 2 términos	6	0.005288	0.000881	20.96	0.000
pH * % saturación	6	0.005288	0.000881	20.96	0.000
Error	12	0.000505	0.000042		
Total	23	0.035789			

Resumen del modelo			
	R-cuad.	R-cuad.	
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0064842	98.59%	97.30%	94.36%

Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

Basados en los comportamientos gráficos que resumen el desarrollo experimental, se determina que la variedad Golden MD2 presenta la mayor formación de precipitado a pH 6 y porcentaje de saturación de mezcla de 45%. Trabajar la variedad en procesos de extracción a esta condición de pH garantiza la obtención de mayores cantidades de precipitado.

Grafica 7. Interacción para cantidad de precipitado - Variedad Golden MD2



Fuente: programa estadístico. MINITAB 15.

El resumen de las condiciones óptimas para la generación de precipitados enzimáticos basados en el procedimientos de Salting Out, se muestran en la tabla 35 para cada una de las variedades, de igual forma se evaluaron las actividades enzimáticas de los precipitados seleccionados.

Tabla 33. Resumen condiciones óptimas para procesamiento por Salting Out

Variedad	pH	% de saturación	Precipitado (g)	Actividad enzimática (TU/mL)
Amazónica	5 - 7	35 – 50	0.1 – 0.2	0.5 – 1.5
Mayanes	5 - 7	35 – 50	0.3 – 0.5	2.5 – 3.7
Golden MD2	5 - 7	35 – 50	0.1 – 0.2	5 - 7

Fuente: elaboración propia.

La variedad que mejor se comporta bajo el método de Salting Out es la variedad Mayanes, que tiene los valores de precipitado con mayor magnitud respecto a las otras dos variedades, además de tener una actividad enzimática de 2.5 – 3.7 TU/mL, este fenómeno se da por tratarse de una Bromelina en solución con poca afinidad con el agua que es el solvente, facilitando que en la presencia de el sulfato de amonio pierda solubilidad una gran cantidad y pueda ser extraída.⁹⁸ El

⁹⁸ DUONG, Krisna y GABELLI, Sandra. Op. cit., p. 87.

método para las variedades Amazonica y Golden MD2 resulta ser un 50% menos efectivo que para la variedad Mayanes donde únicamente se precipitan 0.1 – 0.2 g y 0.1 – 0.2 g respectivamente; en el caso de la actividad enzimática los valores reportados son mayores en comparación al estudio realizado por AVELLA, Juan, et al. donde se utilizó un método de precipitación con Acetona dando un valor promedio de 0.65 TU/mL para el mejor tratamiento, lo que permite concluir que el método de precipitación salina recupera en gran medida la actividad enzimática en comparación a la extracción por solventes que según las revisiones bibliográficas, desnaturaliza la enzima durante su extracción.⁹⁹

Otro factor que fue evaluado en el proceso de precipitación salina fue el pH de la solución, que de igual manera influyo sobre la actividad enzimática de la Bromelina, en los estudios de MOHAN, Resmi, et al. para el rango de pH evaluado en este trabajo que fue de 5 a 7, la Bromelina presento una actividad enzimática de 0.7 TU/mL valor inferior al presentado en la tabla 35 para cada una de las variedades, esto por tratarse de la no existencia de preservantes que disminuyen la actividad de la enzima pero que prolongan su vida útil.¹⁰⁰

⁹⁹ AVELLA, Juan, et al. Op. cit. p. 136.

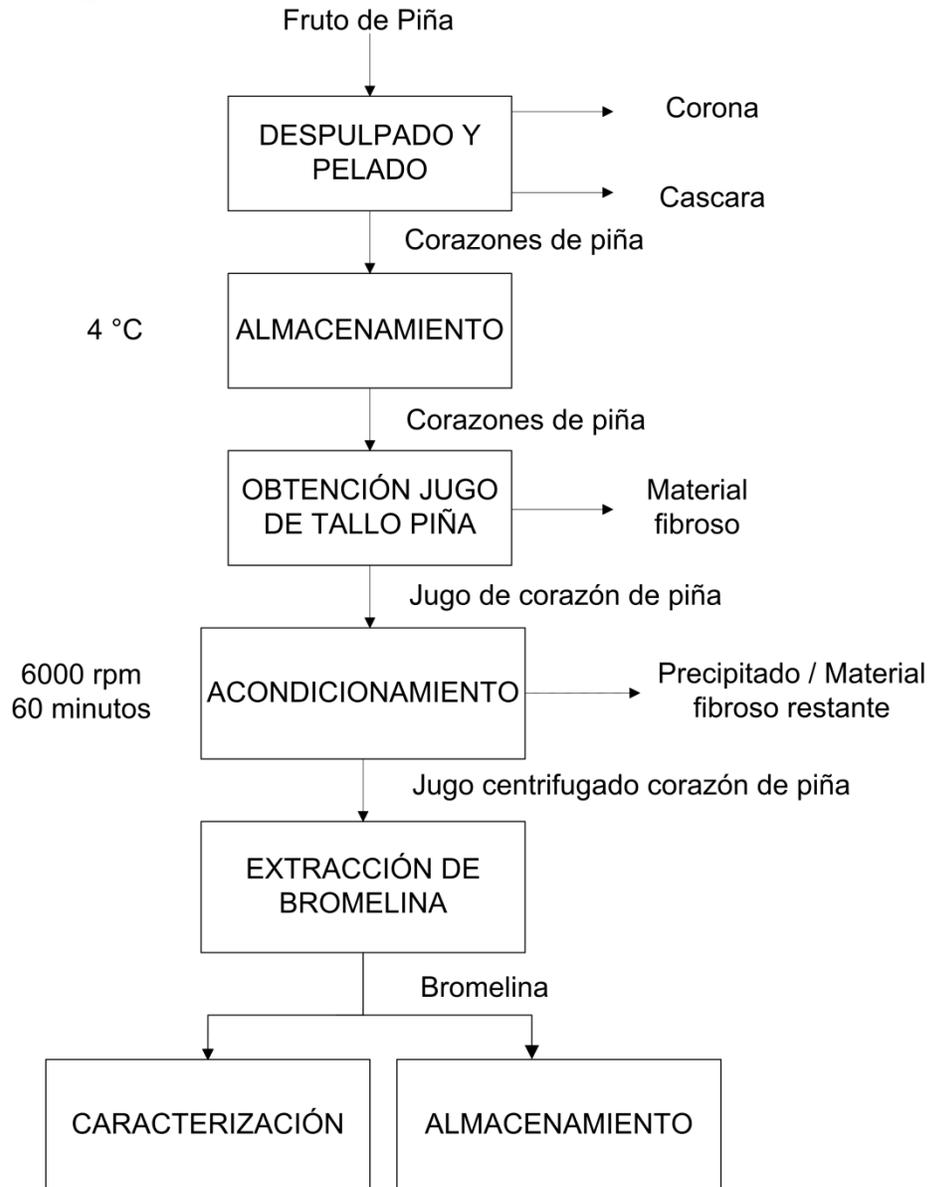
¹⁰⁰ MOHAN, Resmi, et al. p. 190.

4. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La extracción de Bromelina contenida en el jugo de la piña, específicamente en su tallo o también llamado corazón, requiere de la implementación de un proceso que se especifica y direcciona en miras a la obtención de un extracto con altas concentraciones de proteína y con alta actividad enzimática, que pueda ser implementado por la Empresa BETTERS International S.A.S. para cada una de las tres variedades analizadas. Las especificaciones técnicas que a continuación se resumen, se basarán en la cantidad estimada de cada variedad de Piña que la empresa tiene pensado procesar para el año 2019, esta cantidad corresponde a 1 Ton de cada variedad de piña por mes. Considerando este lote y el porcentaje en peso que tiene el corazón de piña en promedio sobre el peso total de fruto es del 17%, se estima que por mes la empresa dejara como subproducto de sus procesos de pelado y despulpado un total de 510 kg de corazones de piña que agrupa las tres variedades. De esta manera se harán los balances de masa para solo 170 kg, que corresponden a los corazones de piña de cada variedad. El siguiente es un diagrama de bloques que resumen las operaciones necesarias para la extracción de Bromelina, operaciones que se analizan en el presente documento.

Diagrama 13. Proceso de extracción de Bromelina



Fuente: elaboración propia.

4.2 ESCALADO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE BROMELINA

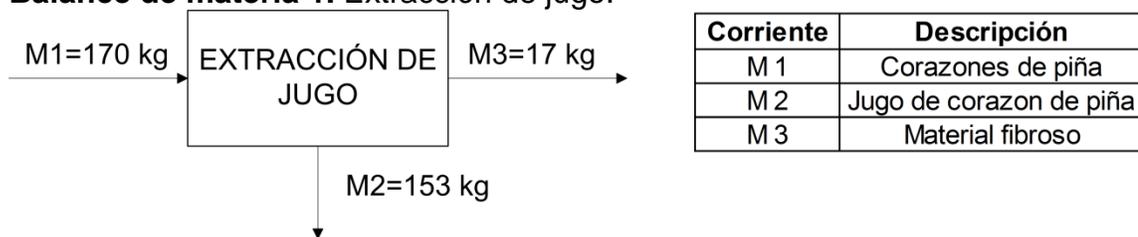
El diseño experimental permitió establecer una serie de experimentos que fueron desarrollados, buscando la determinación de las mejores condiciones para cada uno de los dos métodos de extracción de Bromelina, que favorecieran su producción. Determinadas las condiciones apropiadas para cada variedad y método, se presenta enseguida el proceso de escalado para la cantidad de materia prima que la empresa tiene presupuestado procesar por mes.

Cabe señalar que el proceso de escalamiento es una herramienta, que permite reducir errores en diseños de procesos, debido a correlaciones inexactas o falta de información en el oficio del Ingeniero Químico¹⁰¹. Para los balances de materia de los procesos de extracción de jugo y acondicionamiento, que se presentan en la sección 4.3 se tienen en cuenta los rendimientos experimentales de cada unidad de proceso, de esta manera se determina cada una de las corrientes involucradas. Para la determinación de las corrientes de los balances de materia, de los métodos de extracción de Bromelina, se desarrolla un análisis dimensional para cada una, herramienta que es útil en los procesos de escalamiento¹⁰², cada uno de los análisis se presenta en el **ANEXO D**.

4.3 BALANCES DE MATERIA

A continuación se presentan los balances de materia para cada una de las operaciones unitarias involucradas y para cada una de las variedades, basados en los resultados experimentales obtenidos. Se tomó como base de cálculo el procesamiento de 510 kg/mes correspondientes a corazones de piña de las tres variedades, donde cada una tiene una participación de 170 kg. El balance de materia 1 muestra la operación de extracción de jugo para cada una de las tres variedades; se tiene que de la cantidad de corazones alimentados al extractor, un 90% estará conformado por jugo de corazón de piña crudo, el 10% restante corresponderá a material fibroso.

Balance de materia 1. Extracción de jugo.



Fuente: elaboración propia.

Ecuación 7. Balance de materia extracción de jugo.

$$M1 = M2 + M3$$

Fuente: elaboración propia.

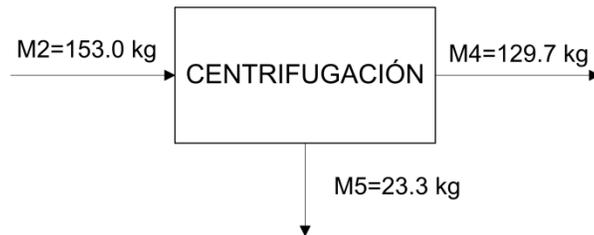
Para el proceso de centrifugación, cada una de las variedades presento diferentes rendimientos hacia jugo libre de material fibroso que quedo del proceso de extracción anteriormente descrito. Se describirán enseguida los balances de

¹⁰¹ ANAYA, Alejandra y PEDROZA, Humberto. Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: Tecnología, Ciencia, Educacion. Enero, 2008, no. 23. p. 31. ISSN 0186-6036.

¹⁰² Ibid. , p. 32.

materia para cada una de las variedades, en el proceso de centrifugación. La densidad promedio del jugo de piña que se obtuvo experimentalmente fue de 1.02 kg/L.

Balance de materia 2. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Amazónica.



Corriente	Descripción
M 2	Jugo de corazon de piña
M 4	Jugo centrifugado
M 5	Material fibroso precipitado

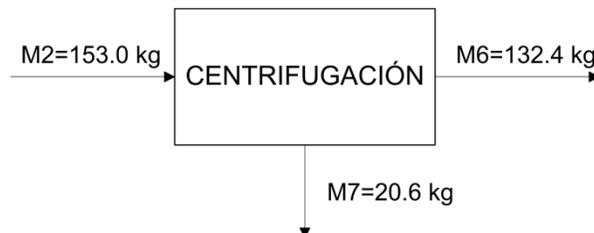
Fuente: elaboración propia.

Ecuación 8. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Amazónica.

$$M2 = M4 + M5$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 3. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Mayanes.



Corriente	Descripción
M 2	Jugo de corazon de piña
M 6	Jugo centrifugado
M 7	Material fibroso precipitado

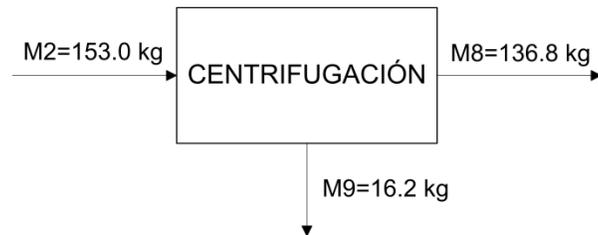
Fuente: elaboración propia.

Ecuación 9. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Mayanes.

$$M2 = M6 + M7$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 4. Acondicionamiento jugo de corazón de Piña para la variedad Golden MD2.



Corriente	Descripción
M 2	Jugo de corazon de piña
M 8	Jugo centrifugado
M 9	Material fibroso precipitado

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 10. Balance de materia acondicionamiento – Variedad Golden MD2.

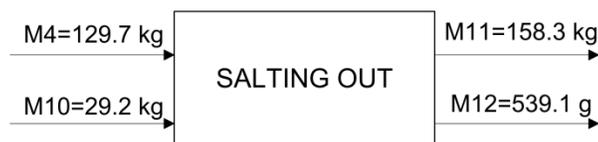
$$M2 = M8 + M9$$

Fuente: elaboración propia.

4.3.1 Balances para métodos de extracción enzimática. Se plantean los balances de materia para cada uno de los dos métodos implementados a las tres variedades de Piña (*Ananas comosus*).

4.3.1.1 Precipitación salina – Salting Out. Los siguientes balances de materia están basados en los resultados obtenidos en el desarrollo experimental, de esta manera cada proceso de precipitación salina presenta diferentes porcentajes de saturación y pH, estos se resumen en la tabla 34.

Balance de materia 5. Precipitación salina para variedad Amazónica.



Corriente	Descripción
M 4	Jugo centrifugado
M 10	Sulfato de amonio
M 11	Sobrenadante
M 12	Bromelina

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 11. Balance de materia precipitación salina – Variedad Amazónica.

$$M4 + M10 = M11 + M12$$

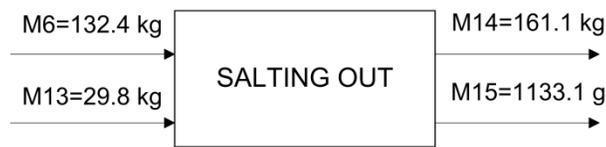
Fuente: elaboración propia.

Ecuación 12. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Amazónica.

$$\text{Rendimiento} = \frac{M12}{M1} \times 100 = \frac{0.5391 \text{ kg}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 0.31\%$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 6. Precipitación salina para variedad Mayanes.



Corriente	Descripción
M 6	Jugo centrifugado
M 13	Sulfato de amonio
M 14	Sobrenadante
M 15	Bromelina

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 13. Balance de materia precipitación salina – Variedad Mayanes.

$$M6 + M13 = M14 + M15$$

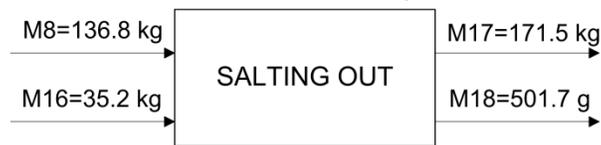
Fuente: elaboración propia.

Ecuación 14. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Mayanes.

$$\text{Rendimiento} = \frac{M15}{M1} \times 100 = \frac{1.1331 \text{ kg}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 0.66\%$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 7. Precipitación salina para variedad Golden MD2.



Corriente	Descripción
M 8	Jugo centrifugado
M 16	Sulfato de amonio
M 17	Sobrenadante
M 18	Bromelina

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 15. Balance de materia precipitación salina – Variedad Golden MD2.

$$M8 + M16 = M17 + M18$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 16. Rendimiento de Bromelina Salting Out – Variedad Golden MD2.

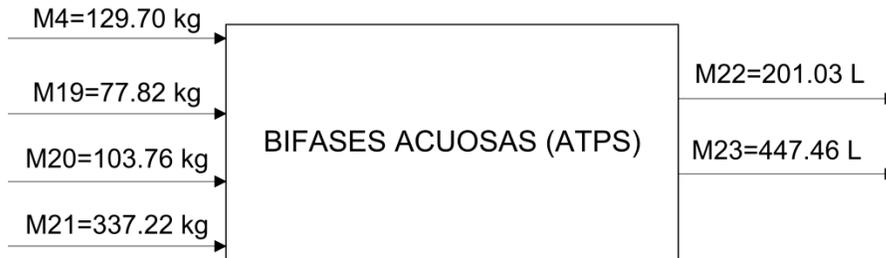
$$\text{Rendimiento} = \frac{M18}{M1} \times 100 = \frac{0.5017 \text{ kg}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 0.29\%$$

Fuente: elaboración propia.

Los anteriores balances de masa permiten dimensionar los equipos necesarios para la extracción, haciendo uso del método: Precipitación salina – Salting Out, el dimensionamiento se presenta en la sección 4.5.

4.3.1.2 Bifases acuosas (ATPS). Enseguida se presentan los balances de masa que describen el método de extracción mediante bifases acuosas para cada una de las tres variedades, las condiciones se resumen en la tabla 30.

Balance de materia 8. Sistema bifásico acuoso para variedad Amazónica.



Corriente	Descripción
M 4	Jugo centrifugado
M 19	Polietilenglicol 6000
M 20	Sulfato de potasio dibasico
M 21	Agua
M 22	Fase TOP
M 23	Fase BOTTOM

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 17. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Amazónica.

$$M4 + M19 + M20 + M21 = M22 + M23$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 18. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Amazónica.

$$\text{Rendimiento} = \frac{M22 \times \text{Concentración de bromelina}}{M1} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{201.03 \text{ L} \times 0.02261 \frac{\text{kg}}{\text{L}}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 2.67\%$$

Fuente: elaboración propia.

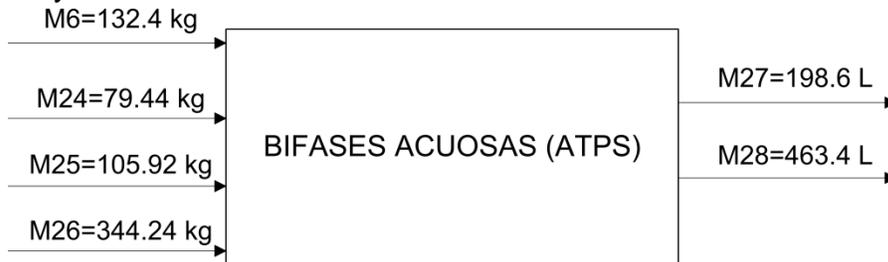
Ecuación 19. Bromelina extraída ATPS – Variedad Amazónica.

$$\text{Bromelina} = M22 * \text{Concentración de bromelina}$$

$$\text{Bromelina} = 4.54 \text{ kg}$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 9. Sistema bifásico acuoso para variedad Mayanes.



Corriente	Descripción
M 6	Jugo centrifugado
M 24	Polietilenglicol 6000
M 25	Sulfato de potasio dibasico
M 26	Agua
M 27	Fase TOP
M 28	Fase BOTTOM

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 20. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Mayanes.

$$M6 + M24 + M25 + M26 = M27 + M28$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 21. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Mayanes.

$$\text{Rendimiento} = \frac{M27 \times \text{Concentración de bromelina}}{M1} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{198.6 \text{ L} \times 0.03977 \frac{\text{kg}}{\text{L}}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 4.64\%$$

Fuente: elaboración propia.

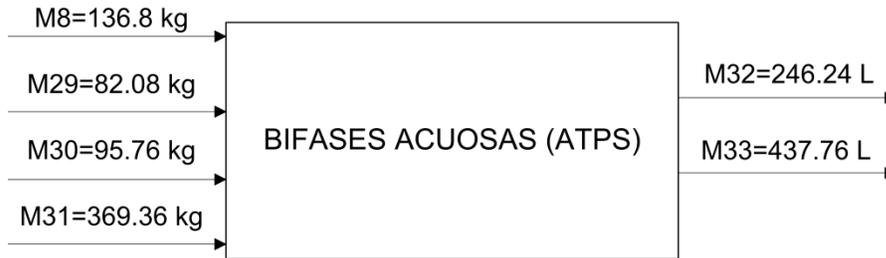
Ecuación 22. Bromelina extraída ATPS – Variedad Mayanes.

$$\text{Bromelina} = M22 * \text{Concentración de bromelina}$$

$$\text{Bromelina} = 7.89 \text{ kg}$$

Fuente: elaboración propia.

Balance de materia 10. Sistema bifásico acuoso para variedad Golden MD2.



Corriente	Descripción
M 8	Jugo centrifugado
M 29	Polietilenglicol 6000
M 30	Sulfato de potasio dibasico
M 31	Agua
M 32	Fase TOP
M 33	Fase BOTTOM

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 23. Balance de materia sistema bifásico acuoso – Variedad Golden MD2.

$$M8 + M29 + M30 + M31 = M32 + M33$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 24. Rendimiento de Bromelina ATPS – Variedad Golden MD2.

$$\text{Rendimiento} = \frac{M32 \times \text{Concentración de bromelina}}{M1} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{246.24 \text{ L} \times 0.02912 \frac{\text{kg}}{\text{L}}}{170 \text{ kg}} \times 100 = 4.21\%$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 25. Bromelina extraída ATPS – Variedad Golden MD2.

$$\text{Bromelina} = M22 * \text{Concentración de bromelina}$$

$$\text{Bromelina} = 7.17 \text{ kg}$$

Fuente: elaboración propia.

Los anteriores balances de masa permiten dimensionar los equipos necesarios para la extracción, haciendo uso del método: Sistema de bifases acuosas (ATPS), el dimensionamiento se presenta en la sección 4.4.

4.4 BALANCES DE ENERGÍA

Para conocer los requerimientos de los refrigeradores que son necesarios durante los procesos de extracción, se determina la cantidad de calor a retirar para cada lote de corazón de piña que involucra las tres variedades de piña ($m=510$ kg), que permiten calcular la potencia mínima requerida de ellos. El cálculo de la potencia requerida y calor a retirar, se desarrolla teniendo como suposición: que los corazones de piña y jugo de corazón de piña, presentan una capacidad calorífica constante igual a: $C_p = 3,852 \frac{J}{kg^{\circ}C}$,¹⁰³ también se establece como suposición que la temperatura inicial de los corazones es de $22.9^{\circ}C$ ¹⁰⁴, que corresponde a la temperatura media anual del departamento del Putumayo, lugar donde se instalará la planta de extracción de Bromelina. A continuación, se presentan los balances de energía:

Ecuación 26. Balance de energía para corazones de piña.

$$Q = m \times C_p \times \Delta T$$

$$Q = 510 \text{ kg} \times 3,852 \frac{J}{kg^{\circ}C} \times (4^{\circ}C - 22.9^{\circ}C)$$

$$Q = -37'129,428 \text{ J}$$

Fuente: elaboración propia.

La ecuación 26 describe la cantidad de energía a retirar para un lote de 510 kg de corazones de piña.

¹⁰³ ASHRAE. Thermal properties of foods, En: ASHRAE Handbook-Refrigeration. USA: ASHRE, 2010. 19.7 p.

¹⁰⁴ IDEAM. Temperatura, brillo solar y evaporación, Mocoa [en línea]. Mocoa, Putumayo. (22 de Diciembre del año 2017). [Consultado: 15 de Febrero de 2019]. Disponible en internet: https://web.archive.org/web/20071222200433/http://www.ideam.gov.co/sectores/aero/climat/tempe_mocoa.htm.

Ecuación 27. Potencia refrigerador de almacenamiento de corazones de piña.

$$P = \frac{37'129,428 J}{12 \text{ horas}} \times \frac{1 \text{ hora}}{3600 \text{ segundos}}$$
$$P = 859.5 W = 0.8595 kW$$

Fuente: elaboración propia.

La ecuación 27, presenta la potencia con la que debe contar el refrigerador de almacenamiento como mínimo, para llevar los corazones de piña a una temperatura de 4°C en 12 horas.

Para el método de extracción: precipitación salina (Salting Out), es necesario el uso de refrigeradores que mantengan una temperatura uniforme de 4°C, a la solución de jugo centrifugado de corazón de piña y sulfato de amonio, con el fin de garantizar la formación del precipitado de Bromelina. A continuación, se presenta el balance de energía para la solución de sulfato de amonio y jugo centrifugado que establece la cantidad de energía, que debe ser retirada por el refrigerador para llevar la solución a una temperatura de 4°C.

Ecuación 28. Balance de energía para solución de jugo centrifugado y sulfato de amonio.

$$Q = 172 \text{ kg} \times 3,852 \frac{J}{\text{kg}^\circ\text{C}} \times (4^\circ\text{C} - 22.9^\circ\text{C})$$
$$Q = -12'522,081 J$$

Fuente: elaboración propia.

Ecuación 29. Potencia refrigerador para almacenamiento de solución de jugo centrifugado y sulfato de amonio.

$$P = \frac{12'522,081 J}{12 \text{ horas}} \times \frac{1 \text{ hora}}{3600 \text{ segundos}}$$
$$P = 289.8 W = 0.2898 kW$$

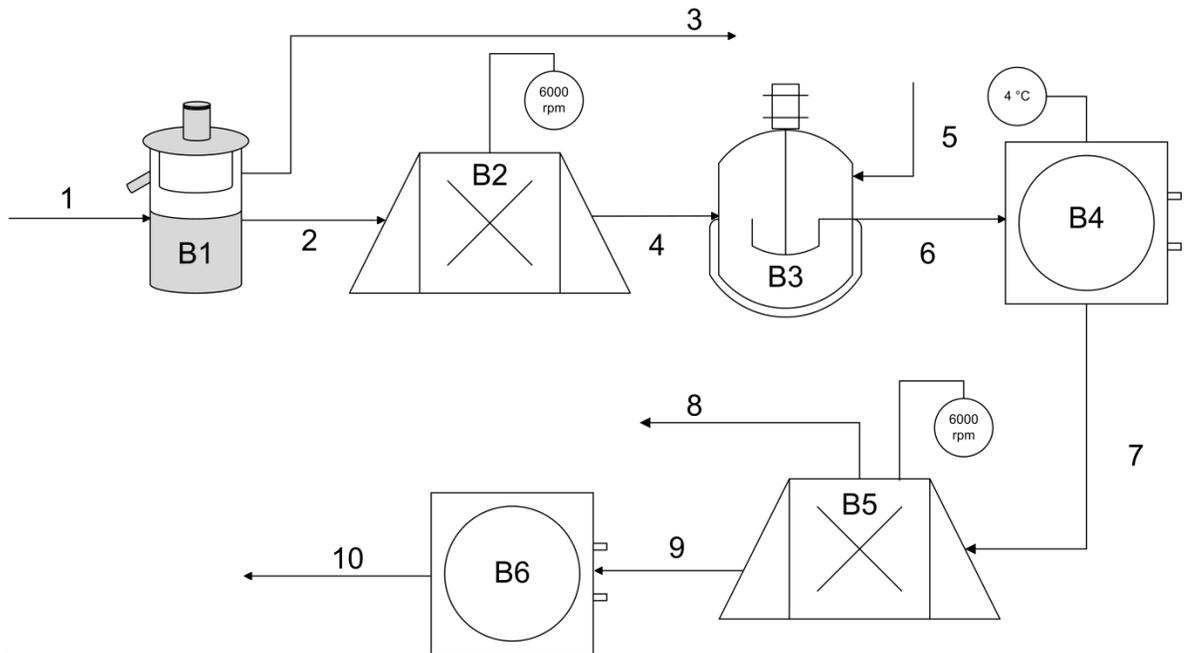
Fuente: elaboración propia.

La ecuación 29, establece la potencia mínima con la que debe contar el refrigerador de almacenamiento de la solución de sulfato de amonio y jugo de corazón de piña centrifugado, para llevarlo a una temperatura de 4°C en 12 horas.

4.5 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE EQUIPOS

Enseguida se presenta los diagramas PFD para cada uno de los métodos de extracción evaluados en el proceso, que serán primordiales en la interpretación de los equipos necesarios para el desarrollo de estos.

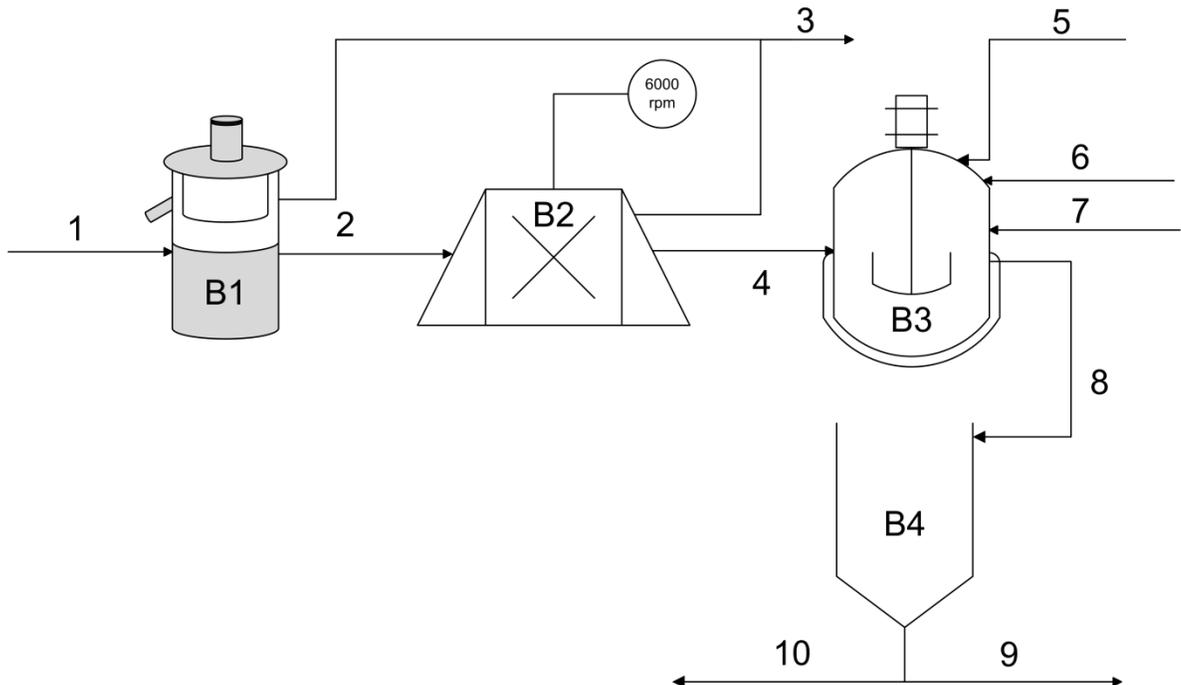
Diagrama 14. Proceso de precipitación salina - Salting Out



Corriente		Equipo	
1	Corazones de piña	B1	Extractor de jugo
2	Jugo de corazón de piña	B2	Centrifugadora
3	Material fibroso	B3	Tanque de agitación
4	Jugo centrifugado	B4	Refrigerador
5	Sulfato de amonio	B5	Centrifugadora
6	Solución sulfato de amonio y jugo de piña	B6	Refrigerador
7	Solución sulfato de amonio y jugo de piña		
8	Sobrenadante		
9	Bromelina		
10	Bromelina		

Fuente: elaboración propia.

Diagrama 15. Proceso de sistema bifásico acuoso – ATPS.



Corriente	
1	Corazones de piña
2	Jugo de corazón de piña
3	Material fibroso
4	Jugo centrifugado
5	Fosfato de potasio dibasico
6	PEG 6000
7	Agua
8	Sistema bifásico acuoso
9	Fase BOTTOM
10	Fase TOP

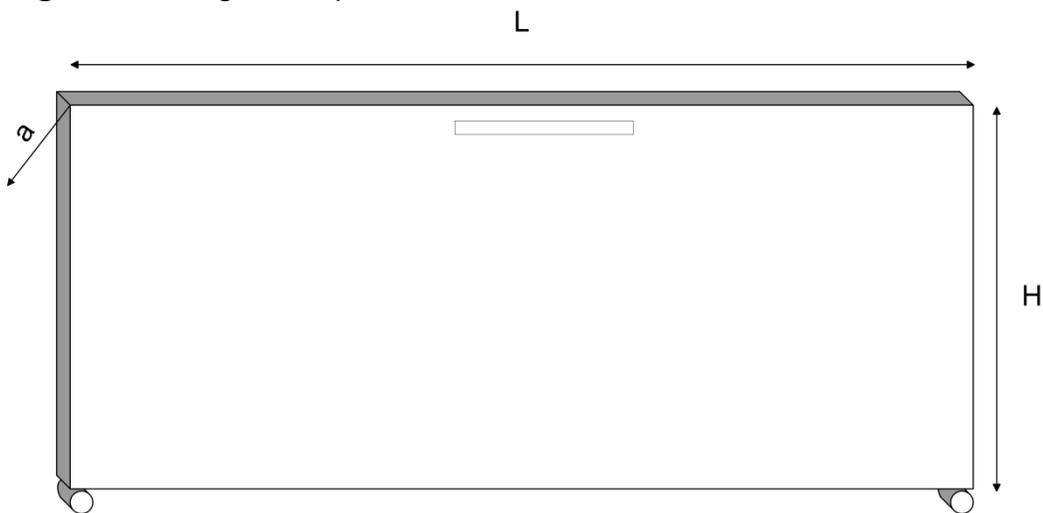
Equipo	
B1	Extractor de jugo
B2	Centrifugadora
B3	Tanque de agitación
B4	Tanque de precipitado

Fuente: elaboración propia.

Los equipos que a continuación se describen, son dimensionados basados en la cantidad de corazón de piña que dejan los procesos de pelado y despulpado por mes, que ascienden a 170 kg por variedad. Este valor corresponde al 17% en peso que tiene el corazón sobre el fruto de piña en cada una de las variedades. Teniendo en cuenta que se procesarán 510 kg de corazones de piña por mes, que agrupa a las tres variedades. Cada uno de los procesos anteriormente expuestos deben cumplir una serie de características que permitirán obtener Bromelina. En primera instancia se tiene la recepción de la materia prima, los corazones deben ser separados por variedad (Amazónica, Mayanes y Golden MD2) en bolsas herméticas; ya clasificados deben llevarse a un refrigerador que cumpla la

condición de mantener una temperatura constante de 4.0 °C, se debe cumplir con este requisito para ralentizar la descomposición de la materia prima. Las dimensiones del refrigerador para un almacenamiento de 634 L que es equivalente a 0.634 m³ correspondientes al volumen ocupado por 510 kg de corazones de piña se presentan en la figura 9.

Figura 9. Refrigerador para almacenamiento de 800 L.



Fuente: elaboración propia.

Tabla 34. Dimensiones refrigerador 800 L.

Dimensiones	cm
L	200
H	85
a	85

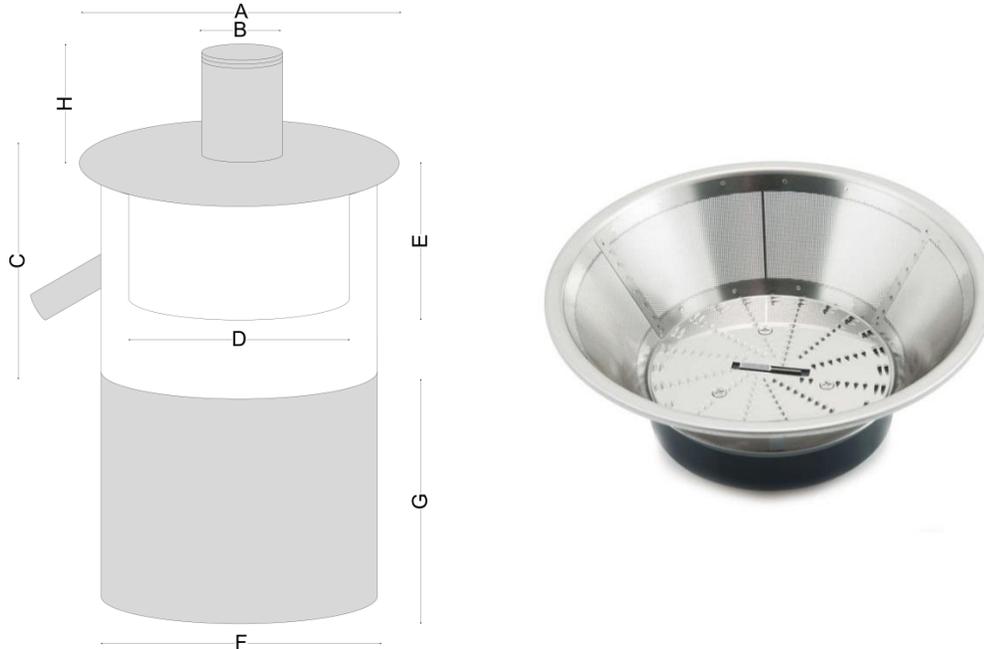
Fuente: elaboración propia.

El anterior equipo cuenta con un sobredimensionamiento del 26% que se hace en base a la cantidad de volumen ocupado por los corazones de las tres variedades de piña a procesar, con esto se propone el uso de un refrigerador de 800 L de marca Middle de tipo Industrial y de referencia D08W2A, que cuenta con una potencia de 859.5 W que permite que la cantidad de materia prima permanezca a 4°C (Ecuación 27).

La obtención del jugo de piña se debe hacer mediante el uso de un extractor industrial de jugo, que opera bajo el cizallamiento que genera a la fruta luego del contacto de la superficie metálica con la fibra frutal. El jugo es separado de la fibra con ayuda del plato rotacional que genera un movimiento de centrifugación, haciendo pasar el jugo por el filtro y rechazando el material fibroso por una salida lateral. Los requerimientos del extractor deben ser: tener una capacidad

aproximada de procesamiento de 120 kg/h y operar a por lo menos 2800 rpm. La siguiente es una representación de un extractor industrial de jugo y el plato rotacional que tiene una potencia de 550 W.

Figura 10. Extractor industrial de jugo y plato rotacional.



Fuente: Mr Whippy. Juice Extractor [en línea]. Longo & Co. Estados Unidos. (2018). [Consultado: 10 de Noviembre de 2018]. Disponible en internet: <<https://www.mrwhippy.biz/product/juice-extractor/juice-extractor/>>.

Tabla 35. Dimensiones Extractor de jugo 120 kg/h

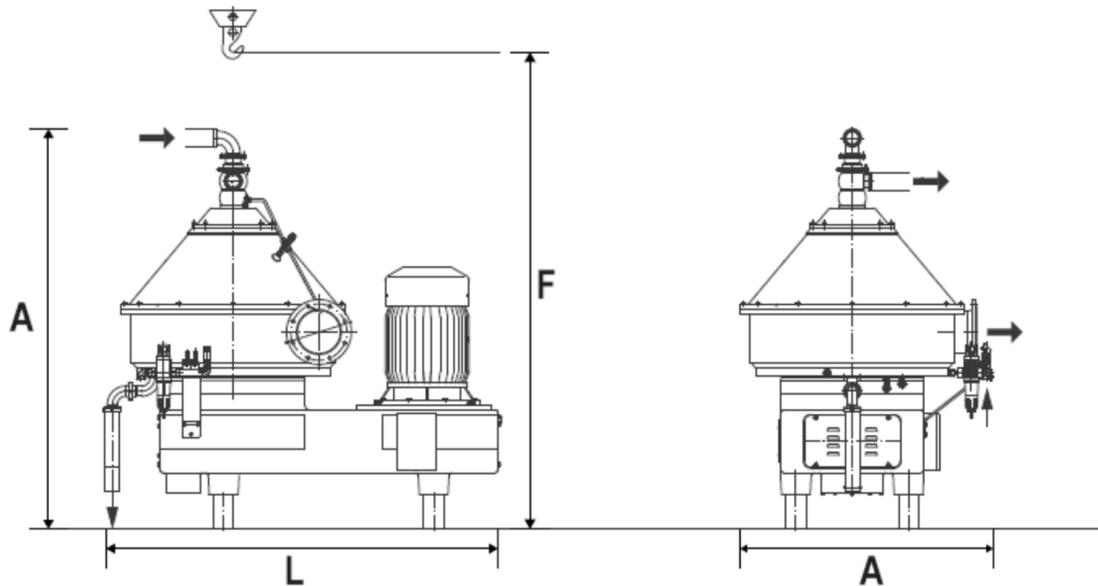
Dimensiones	cm
A	40
B	10
C	35
D	28
E	25
F	35
G	31
H	15

Fuente: elaboración propia.

Para el proceso de acondicionamiento se requiere el uso de una centrifugadora que permita la separación de todos los sólidos suspendidos que permanecen en la corriente proveniente del extractor de jugo. Como condiciones primordiales se

necesita un equipo que garantice la eliminación de cualquier partícula suspendida evitando que interfiera en el posterior proceso de extracción. Para dar cumplimiento a esta operación unitaria se propone el uso de una centrifugadora de discos de alta velocidad, normalmente usada para clarificación de mezclas de sólidos y líquidos. La centrifugadora debe tener una capacidad de 25L/h, debe operar durante una hora como mínimo a 4000 rpm. A continuación se presenta la figura representativa de una centrifugadora de discos marca Flottweg con referencia AC 2000 que cuenta con una potencia de 5500 W.

Figura 11. Centrifugadora de discos.



Fuente: FLOTTWEG. La centrifuga de discos Flottweg. Alemania. (2018), 16 p. [Consultado: 10 de Noviembre de 2018]. Disponible en internet: <https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Separator-ES.pdf>.

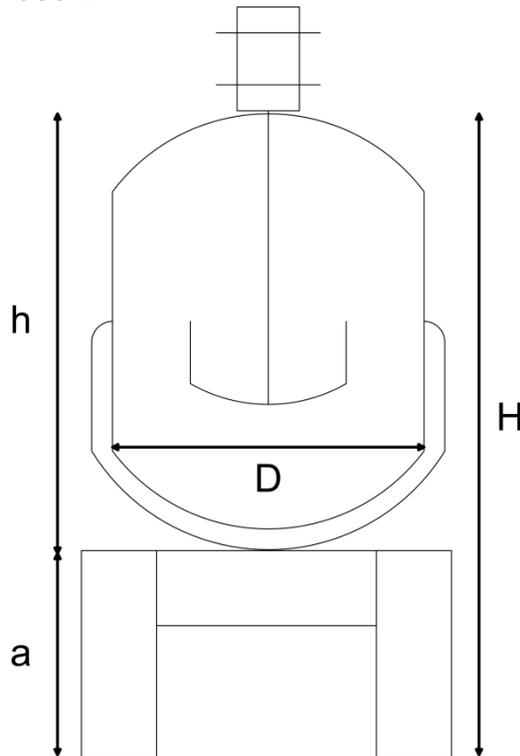
Tabla 36. Dimensiones centrifugadora de discos AC2000.

Dimensiones	cm
L	200
A	110
A	200
F	275

Fuente: FLOTTWEG. La centrifuga de discos Flottweg. Alemania. (2018), 16 p. [Consultado: 10 de Noviembre de 2018]. Disponible en internet: <https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Separator-ES.pdf>

Obtenido el jugo clarificado se debe proceder a desarrollar la mezcla de reactivos dependiendo el método de extracción a desarrollar, para lograr obtener una homogenización completa de cada uno de los componentes, se plantea hacer uso de un tanque homogeneizador. Este debe contar con una capacidad de por lo menos 300 L, adicional a esto debe tener un eje rotatorio con aspás en su extremo inferior que sea accionado por un motor garantizando la total homogeneidad de la mezcla de componentes. En seguida se presenta una figura correspondiente al tanque de agitación de 300 L propuesto que cuenta con una potencia de 360 W.

Figura 12. Tanque de agitación de 300 L.



Fuente: Elaboración propia.

El tanque debe contar con las dimensiones que se resumen a continuación:

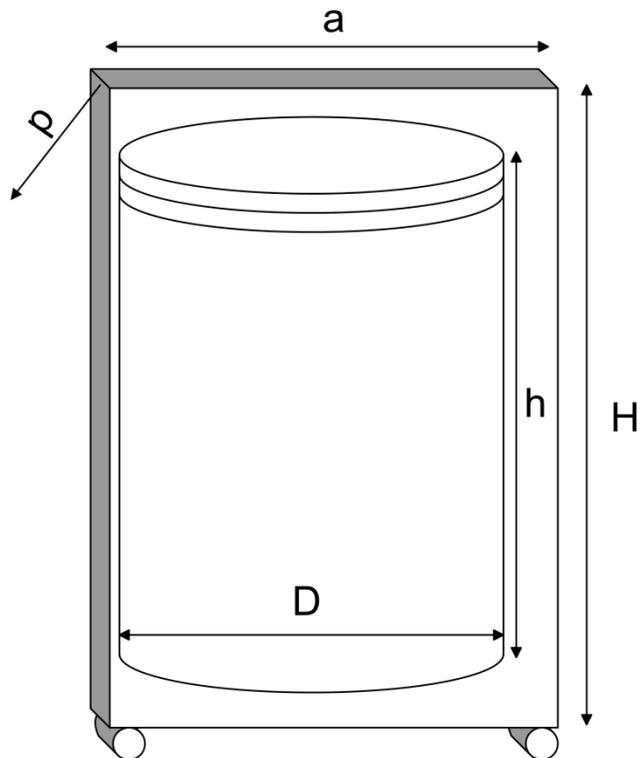
Tabla 37.
Dimensiones tanque
de agitación de 300L

Dimensiones	cm
h	70.0
D	36.9
a	35.0
H	105.0

Fuente: elaboración propia.

Al tratarse del método de precipitación salina, la mezcla ya homogenizada debe ser almacenada por separado, diferenciando cada variedad en refrigeradores de 500 L de capacidad, dentro de estos deberá encontrarse un recipiente con capacidad de 254 L fabricado en acero inoxidable, con el objetivo de establecer las condiciones que favorecen la formación de precipitado. La siguiente figura presenta las dimensiones con las que debe contar cada uno de los refrigeradores, también debe tener una potencia de 289.8 W que garantiza que la solución interior mantenga una temperatura de 4°C, la cual fue calculada en la ecuación 29.

Figura 13. Refrigerador solución precipitación salina 500 L.



Fuente: elaboración propia.

Tabla 38.

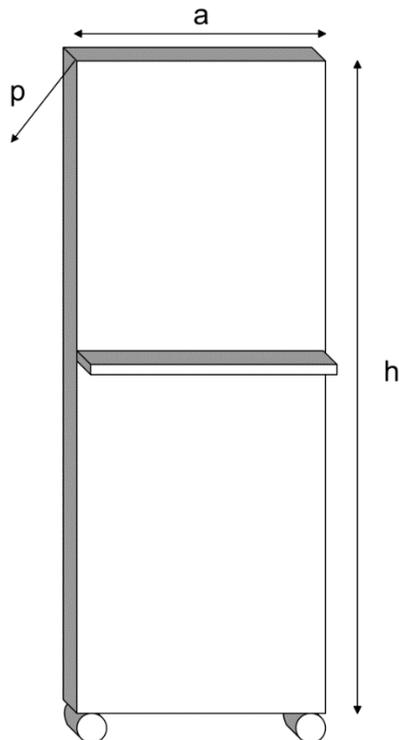
Dimensiones
Refrigerador para
desarrollo de
precipitación salina.

Dimensiones	cm
H	100
a	70
p	70
D	60
h	90

Fuente: elaboración propia.

La corriente generada en el proceso de Salting Out se debe llevar nuevamente a la centrifuga transcurridas veinticuatro (24) horas, buscando la recuperación del componente solido que para este caso corresponde al aglutinamiento de la proteína de interés. Ya recuperada en su mayoría se almacenará en un congelador de 183L en recipientes separados, las dimensiones se presentan enseguida.

Figura 14. Refrigerador Bromelina – 183 L.



Fuente: elaboración propia.

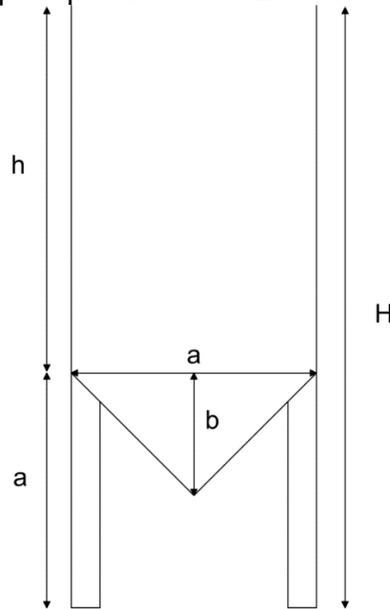
Tabla 39. Dimensiones refrigerador Bromelina.

Dimensiones	cm
h	143.5
a	54.5
p	54.0

Fuente: elaboración propia.

Para el proceso de extracción de bifases acuosas se debe contar posterior al proceso de homogenización con un tanque de precipitado, que permita luego de la estabilización del sistema, que la fase BOTTOM que no es de interés, pueda ser separada por acción de la gravedad de la fase TOP que es de interés para cada una de las variables. Es importante tener en cuenta que cada uno de los equipos anteriormente nombrados deben estar fabricados con acero inoxidable como lo reglamenta la resolución 4142 de 2012, que establece los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales y equipos metálicos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas de consumo humano.¹⁰⁵ En la figura que se presenta a continuación se muestran las dimensiones que debe tener el tanque de precipitado.

Figura 15. Tanque de precipitado – 300 L.



Fuente: elaboración propia.

¹⁰⁵ COLOMBIA. Ministerio de Salud. Resolución 4142 de 2012. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano en el territorio nacional. Bogotá, 12 de Diciembre de 2012. 16 p.

Tabla 40.
Dimensiones tanque
de precipitado ATPS
– 300 L.

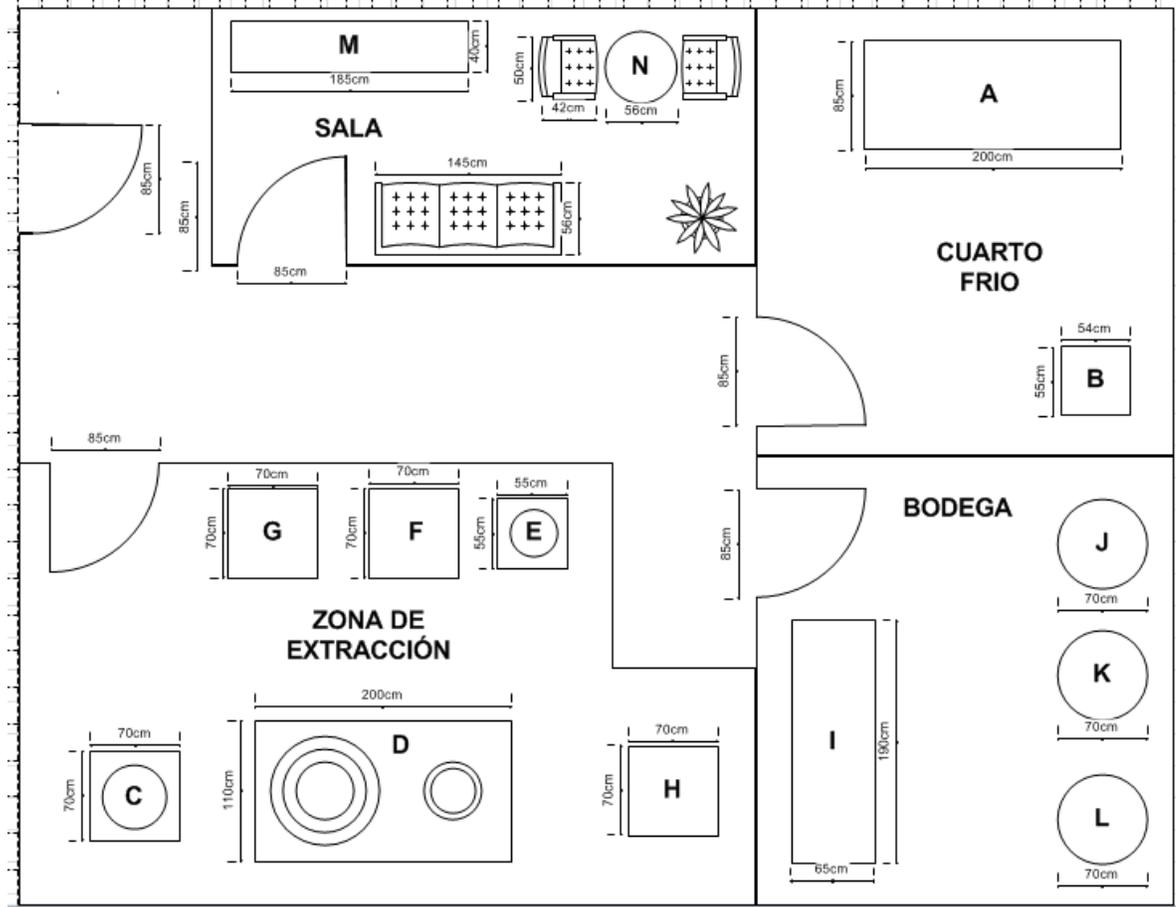
Dimensiones	cm
h	89.4
a	57.5
D	60.0
b	30.0
H	147.0

Fuente: elaboración propia.

4.5.1 Distribución del proceso. En esta sección se propondrá una distribución de planta para los procesos de extracción enzimática y se desarrollará una descripción de los mismos.

4.5.1.1 Precipitación salina – Salting Out. El desarrollo de esta propuesta influirá sobre el análisis de costos para inversión y operación del proceso: Salting Out que se presenta en el capítulo siguiente.

Plano 1. Distribución implementación método Salting Out.



Fuente: elaboración propia.

El plano 1 muestra la distribución de lo que sería una planta dedicada a la extracción de Bromelina a partir de corazones de Piña implementando el método de precipitación salina, se encuentra distribuida en un espacio de 9 m x 7 m, las convenciones del plano se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 41. Convenciones plano 1.

Convención	Equipo
A	Refrigerador 800 L
B	Refrigerador 183 L
C	Extractor de jugo
D	Centrifugadora
E	Tanque de agitación 300 L
F	Refrigerador 500 L
G	Refrigerador 500 L
H	Refrigerador 500 L
I	Vitrina

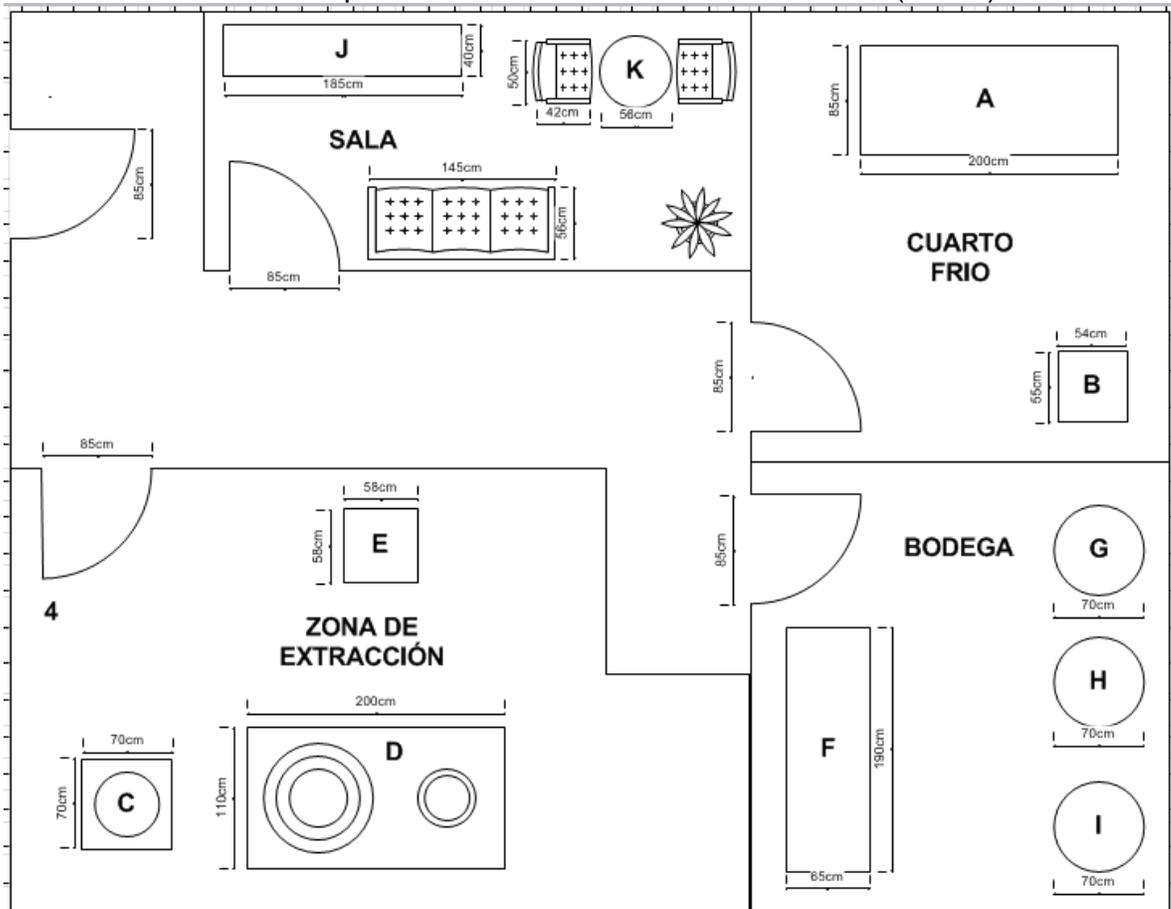
Tabla 43. (Continuación)

Convención	Equipo
J	Caneca de almacenamiento 200 L
K	Caneca de almacenamiento 200 L
L	Caneca de almacenamiento 200 L
M	Casilleros
N	Mesa

Fuente: elaboración propia.

4.5.1.2 Sistema bifásico acuoso – ATPS. El desarrollo de esta propuesta influirá sobre el análisis de costos para inversión y operación del proceso: Sistema bifásico acuoso, que se presenta en el capítulo siguiente. El plano 2 presenta la distribución propuesta para una planta dedicada a la extracción de Bromelina implementando el método de bifases acuosas (ATPS), las convenciones de plano se resumen en la tabla 42.

Plano 2. Distribución implementación método bifases acuosas (ATPS)



Fuente: elaboración propia.

Tabla 42. Convenciones plano 2

Convención	Equipo o lugar
A	Refrigerador 800 L
B	Refrigerador 183 L
C	Extractor de jugo
D	Centrifugadora
E	Tanque de precipitado
F	Vitrina
G	Caneca de almacenamiento 200 L
H	Caneca de almacenamiento 200 L
I	Caneca de almacenamiento 200 L
J	Casilleros
K	Mesa

Fuente: elaboración propia.

5. COSTOS DE INVERSIÓN Y OPERACIÓN

El desarrollo del presente capítulo se enfocará en la determinación de los costos de inversión y operación del proceso para la obtención de extractos enzimáticos a partir de los corazones de las tres variedades de piña procesadas: Amazónica, Mayanes y Golden MD2. Se incluirán costos generados por el uso de servicios públicos, mano de obra, contratación de personal, materias primas y equipos de procesamiento. Al final se obtendrá una estimación de los costos necesarios para la implementación del proyecto.

5.1 COSTOS DE INVERSIÓN

Al tratarse de una propuesta aun sin desarrollarse en la empresa BETTERS International S.A.S., es necesaria la adquisición de una serie de equipos que serán usados para la obtención de Bromelina a partir de los corazones de las tres variedades de piña que la empresa procesa. La estimación de los costos de inversión se presentara por separado para cada uno de los dos métodos estudiados.

5.1.1 Costos de inversión método Salting Out. A continuación, se resumen los costos de los equipos, que son necesarios para desarrollar el método de precipitación salina (Salting Out).

Tabla 43. Costos de equipos – Salting Out

Equipo	Unidades	Precio unitario	Precio total
Refrigerador 800 L	1	5'260,000	5'260,000
Refrigerador 183 L	1	1'452,000	1'452,000
Extractor de jugo industrial	1	2'141,881	2'141,881
Centrifuga Flottweg	1	71'400,000	71'400,000
Tanque de agitación 300 L	1	12'571,581	12'571,581
Refrigerador 500 L	3	1'699,000	5'097,000
Vitrina	1	401,550	401,550
Caneca de almacenamiento 120 L	3	100,000	300,000

Fuente: elaboración propia.

Se establece el costo total de inversión (CAPEX) para el desarrollo del proceso usando el método de precipitación salina (Salting Out), que es de 98'624,012 COP.

5.1.2 Costos de inversión método bifases acuosas (ATPS). A continuación, se resumen los costos de los equipos, que son necesarios para desarrollar el método de bifases acuosas (ATPS).

Tabla 44. Costos de equipos – Bifases acuosas (ATPS)

Equipo	Unidades	Precio unitario	Precio total
Refrigerador 800 L	1	5'260,000	5'260,000
Refrigerador 183 L	1	1'452,000	1'452,000
Extractor de jugo industrial	1	2'141,881	2'141,881
Centrifuga Flottweg	1	71'400,000	71'400,000
Tanque de precipitado 300 L	1	10'939,064	10'939,064
Vitrina	1	401,550	401,550
Caneca de almacenamiento 120 L	3	100,000	300,000

Fuente: elaboración propia.

El costo total de inversión (CAPEX) para el desarrollo del proceso mediante el método de bifases acuosas es de 91'894,495 COP.

5.2 COSTOS DE OPERACIÓN

Los costos de operación abarcan la adquisición de materias primas, consumo de servicios públicos y mano de obra requeridos para la implementación del proceso. En la tabla 47 y 48 se resumen los costos que involucran llevar a cabo el procesamiento de 510 kg de corazón de piña conformado por las tres variedades, para cada uno de los dos métodos. La estimación de la cantidad de horas que deben operar cada uno de los equipos, se estimó para cada uno de los dos métodos, de tal manera que abarcara el procesamiento total de la materia prima, calculado cada uno de estos tiempos de operación, se determinó la cantidad de horas que deben trabajar los operarios.

Tabla 45. Costo materias primas – Precipitación salina (Salting Out)

Insumo	Precio unitario	Cantidad	Precio Total
Corazón de piña 1kg	1,727	510	880,770
Sulfato de amonio 1kg	159,460	95	15'148,700

Fuente: elaboración propia.

Tabla 46. Costo de materias primas - Bifases acuosas (ATPS)

Insumo	Precio unitario	Cantidad	Total (COP)
Corazón de piña 1kg	1,727	510.00	880,770
Agua potable 1 m ³	4,161	1.05	4,373
Sulfato de potasio dibasico 500g	218,960	611.00	133'784,560
Polietilenglicol 6000 - 500g	11,900	479.00	5'700,100

Fuente: elaboración propia.

El costo del kilogramo de corazón de piña fue estimado, teniendo en cuenta la participación que tiene el corazón en el peso total del fruto que corresponde a un 17%; las cotizaciones de los demás reactivos se presentan en el **ANEXO C**.

El costo del consumo energético se calculó para ambos procesos, teniendo en cuenta las especificaciones técnicas del extractor de jugo, centrifuga,

refrigeradores, tanque de precipitación y tanque de agitación, de igual manera su tiempo de operación necesario para el desarrollo de la extracción enzimática; en la tabla 49 y 50 se resumen los consumos estimados y el precio total de la energía eléctrica. Las tarifas de la energía eléctrica actuales que brinda la Comisión de Regulación de Energía y Gas (ENEL – Codensa) para el sector de operación de la empresa BETTERS International S.A.S. es de 568.80 COP/kWh¹⁰⁶.

Tabla 47. Costo para servicio energético – Precipitación salina (Salting Out)

Equipo	Potencia (kW)	Horas de operación	Energía consumida (kWh)	Costo (COP)
Refrigerador 800 L	0.85	14.83	12.60	7,170
Extractor industrial	0.55	4.25	2.34	1,330
Centrifuga Flottweg	5.50	18.72	102.96	58,564
Tanque de agitación 300 L	0.36	3.00	1.08	614
Refrigerador 500 L - A	0.28	84.00	23.52	13,378
Refrigerador 500 L - B	0.28	84.00	23.52	13,378
Refrigerador 500 L - C	0.28	84.00	23.52	13,378
Centrifuga Flottweg	5.5	18.72	102.96	58,564
Refrigerador 183 L	0.04	24.00	0.96	546

Fuente: elaboración propia.

¹⁰⁶ CODENSA. Tarifas de energía para el mes de Octubre del año 2018. [en línea] . CODENSA – Enel. Colombia. (Octubre del año 2018) p. 1. [Consultado el día 20 de Noviembre del año 2018]. Disponible en internet: <<https://www.codensa.com.co/hogar/tarifas>>

Tabla 48. Costo para servicio energético – Sistema bifásico acuoso (ATPS)

Equipo	Potencia (kW)	Horas de operación	Energía consumida (kWh)	Costo (COP)
Refrigerador 800 L	0.85	62.83	53.40	30,374
Extractor industrial	0.55	4.25	2.34	1,330
Centrifuga Flottweg	5.5	18.72	102.96	58,564
Tanque de agitación 300 L	0.36	3.00	1.08	614

Fuente: elaboración propia.

Para el desarrollo del proceso es necesario contar con tres operarios, que tenga conocimiento de los procesos que serán llevados a cabo para la extracción enzimática, de igual forma se deben encargar de la recepción de materias primas, llevar a cabo un correcto almacenamiento de estas e intervenir dentro del proceso cuando sea necesario. Se establece así los costos de mano de obra para un operario, basados en la legislación actual para ámbitos laborales que establece un salario mínimo legal vigente al año 2019 de 828,116 COP. A continuación se resumen los costos para mano de obra de cada método de extracción enzimática.

Tabla 49. Costo mano de obra – Precipitación salina (Salting Out)

Mano de obra	Costo mensual	Costo diario	Días laborales	Personal necesario	Costo total
Salario mínimo	828,116	27,604	7	3	579,682
Prestaciones sociales	555,533	18,518			388,873
TOTAL					968,555

Fuente: elaboración propia.

Tabla 50. Costo mano de obra – Bifases acuosas (ATPS)

Mano de obra	Costo mensual	Costo diario	Días laborales	Personal necesario	Costo total
Salario mínimo	828,116	27,604	5	3	414,058
Prestaciones sociales	555,533	18,518			277,267
TOTAL					691,325

Fuente: elaboración propia.

De acuerdo a los costos evaluados en el presente capítulo, se establece el costo total de inversión (CAPEX) y el costo total de operación (OPEX) para la implementación de los dos métodos que fueron evaluados en este trabajo. A continuación se resumen en la tabla 53.

Tabla 51. Costos de operación e inversión

Método	CAPEX	OPEX
Precipitación salina	98'624,012	17'210,947
Bifases acuosas (ATPS)	91'894,495	141'161,031

Fuente: elaboración propia.

Con la estimación de los costos de operación e inversión que requieren cada uno de los procesos, se recomienda implementar el método de precipitación salina, porque sus costos operativos se pueden solventar con la venta de la Bromelina extraída; es importante aclarar que los rendimientos de Bromelina en el proceso bifásico acuoso son superiores a los presentados por el método de precipitación salina pero sus costos operativos son altos y no podrían ser retribuidos con la venta de la Bromelina extraída, sin embargo un costo menor de la sal usada en el método bifásico acuoso permitiría que sus costos operativos disminuyan.

6. CONCLUSIONES

- ✓ En el proceso de caracterización de los corazones de las tres variedades de piña se pudo determinar la humedad, grados brix, acidez titulable y pH donde para la variedad amazónica su humedad fue del 91.24%, sus grados brix 10 y su pH de 4.54; para la variedad Mayanes su humedad fue del 91.90%, sus grados brix 8 y su pH de 4.36 y por ultimo para la variedad Golden MD2 su humedad del 80.00%, sus grados brix 12 y su pH de 3.22, parámetros que establecieron las condiciones y estado de maduración de la materia prima.
- ✓ El diseño experimental para cada uno de los métodos implementados corrobora la incidencia que tienen las interacciones de los factores, sobre las variables respuesta. De esta manera se lograron obtener para el mejor de los casos usando Salting Out, un precipitado de 0.35 g de Bromelina que tuvo una actividad enzimática de 3.31 TU/mL, perteneciente a la variedad Mayanes a un pH de 7 y % de saturación del 40. Por el lado del sistema bifásico acuoso logro obtenerse un extracto enzimático con una concentración de 29.12 mg/mL y actividad enzimática de 4.11 TU/mL, para el mejor de los experimentos que correspondía a la variedad Golden MD2, que opero a una concentración de sal de 14% p/p.
- ✓ La operación del proceso requiere una serie de condiciones para obtener concentrados de Bromelina y Bromelina precipitada, las cuales son: Temperatura de operación: 4 – 10°C, rpm para el proceso de centrifugado: 6000 y tener siempre un almacenamiento en frio de las materias primas y productos buscando la prolongación de su vida útil.
- ✓ Basados en los costos evaluados, se establecieron los costos totales de inversión (CAPEX) y operación (OPEX) para cada método desarrollado, dando un total para precipitación salina de 98'624,012 para costos de inversión y 17'133,901 para costos de operación. De la misma manera para el sistema bifásico acuoso, sus costos de inversión fueron de 91'894,495 y sus costos de operación de 141'137,827.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ En el proceso de acondicionamiento, el precipitado de la piña que corresponde a material fibroso es considerable, se recomienda investigar que uso de carácter provechoso se le podría dar buscando una utilización total de los subproductos generados.
- ✓ Caracterizar otra variedad de piña que sea de carácter comercial, evaluando las cantidades de Bromelina obtenidas implementando los procesos de extracción: Precipitación salina y sistema bifásico acuoso.
- ✓ Obtener Bromelina empleando otros métodos de extracción de proteínas como lo son precipitación por solvente, métodos enzimáticos, entre otros para así compararlos con los resultados obtenidos en este trabajo.
- ✓ Realizar un estudio técnico-financiero del proceso de obtención de Bromelina a nivel industrial.
- ✓ Es importante conocer la clase de enzima a extraer y la función que va a desempeñar sobre el sustrato en el proceso para así elegir de la manera más apropiada los métodos de extracción, permitiendo una precipitación de proteína deseada.

BIBLIOGRAFÍA

AMOROS, Leslei, et al. Diálisis y Ultrafiltración. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes, 2011. 5 p.

ANAYA, Alejandra y PEDROZA, Humberto. Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: Tecnología, Ciencia, Educación. Enero, 2008, no. 23. 31 - 39 p. ISSN 0186-6036.

AREVALO, Symey. Agua en los alimentos. Trabajo de grado para optar por el título profesional de Ingeniero en industrias Alimentarias. Iquito, Perú. Escuela de formación profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. 2017. 54 p.

ASHRAE. Thermal properties of foods, En: ASHRAE Handbook-Refrigeration. USA: ASHRE, 2010. p. 19.31.

ASOHOFrucOL. Balance del sector Hortifructicultor en 2017. Colombia. Diciembre, 2017. p. 13.

AVELLA, Juan, et al. Aprovechamiento residuos biomasa de producción de piña (Ananas comosus) para municipio de Aguazul Casanare. Aguazul, Casanare. Tecnologías de la información de la Orinoquia (TICSO). 151 p.

BABU, Ravindra. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification: Liquid-Liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. no. 1. United States: Department of Food Engineering, 2007. p. 83-89.

BARRERA, Jaime, et al. Crecimiento del fruto de la piña nativa Var. India (Ananas comosus M.) en el piedemonte caqueteño. Leticia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI, 2005. p. 60-81.

BASANTES, Santiago A. y CHASIPANTA, José U. Determinación del requerimiento nutricional del fósforo sobre la inducción floral en el cultivo de piña. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. Sangolqui, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. 2012. 101 p.

CARRERA, Eliecer. Producción y aplicación de enzimas industriales. En: Facultad de ciencias agropecuarias. Marzo, 2003, no. 1. 50 p.

CHILE. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. Determinación de humedad. PRT-701.02-023. Sub departamento laboratorios del Ambiente. p. 1 – 2.

CODENSA. Tarifas de energía para el mes de Octubre del año 2018. [en línea] . CODENSA – Enel. Colombia. (Octubre del año 2018) p. 1. [Consultado el día 20

de Noviembre del año 2018]. Disponible en internet: <<https://www.codensa.com.co/hogar/tarifas>>

COELHO, Diego, et al. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). En: Bioprocess and biosystems engineering. 12 de Junio 2012. No. 9 p.

COLOMBIA. INCONTEC. 21 de Agosto de 1996. NTC 729-1. Frutas frescas. Piña. Especificaciones. p. 1-12.

COLOMBIA. Ministerio de salud y protección social. Resolución número 3929 de 2013. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas con adición de jugo o pulpa de fruta que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional. Bogotá, 02 de Octubre del año 2013. 29 p.

COMISIÓN REGIONAL DE COMPETITIVIDAD DEL CASANARE. Plan sectorial para la producción de piña en el departamento del Casanare y su comercialización competitiva. Colombia. 2015. 108 p.

CORONEL, Claudia. Cinética de inactivación enzimática y de degradación de sabor en función de la temperatura en jugo de piña. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciada en Ingeniería de Alimentos. Estados Unidos de México, Puebla: Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. 2003. 78 p.

CORTES, María. Predicción del coeficiente de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas a través de la caracterización bioinformática de su superficie. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Ingeniero civil en Biotecnología. 76 p.

CUERVO, Laura y ECHEBERRY, Julio. Evaluación de la síntesis de ácido láctico proveniente del suero de Quesería a nivel laboratorio. Bogotá: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Ingeniería Química. 93 p.

DALGO, Violeta. Obtención de un concentrado con Bromelina a partir de piña (Ananas comosus), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Bioquímico. Ecuador, Ambato: Universidad técnica de Ambato. Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos. Ingeniería Bioquímica. 2012. 131 p.

DANE. Principales características del cultivo de la Piña (Ananas comosus L.). Variedades de Piña más importantes en Colombia. 54 ed. Colombia. 2016. 99 p.

(Boletín mensual. INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA)

DANE. Principales características del cultivo de la Piña (*Ananas comosus* L.). Variedades de Piña más importantes en Colombia. 54 ed. Colombia. 2016. p. 1.

DIAZ, Abanto y REBAZA, Juan. Obtención de la enzima Bromelina de los desechos industriales del procesamiento de *Ananas comosus*, producida en el distrito de Poroto. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de ingeniería Química. Ingeniería Química. 2011. 64 p.

DUONG, Krisna y GABELLI, Sandra. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. En: *Methods in Enzymology*. Volume 541. Baltimore, USA: Elsevier Inc, 2014. 94 p.

ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION. Tyrosine Unit (TU) Analytical Method. 2012. 4 p.

ESTADOS UNIDOS DE MÉXICO. SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL. NMX-F-275-1992. 24 de Enero del año 1992. Determinación de grado brix en muestras de jugo de especies vegetales productoras de azúcar – Método de prueba. p. 1 – 6.

GALARZA, David. Efecto ablandador de extractos de cascara, pulpa y corazón de piña en el lomo (*Longissimus toracis*) y la mano de piedra (*Semitendinosus*) de res. Honduras: Facultad de Ingenierías. Ingeniería agrónoma. 2002. 35 p.

GARCIA, Yelene, et al. Determinación de las propiedades de calidad de la piña (*Ananas comosus*) variedad Cayena lisa almacenada a temperatura ambiente. En: *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2011. vol 20, no. 01, p. 62.

GARCIDUEÑAS, Jose. Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro. México: Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de fitotecnia, 2013. 195 p.

GARZON, Javier. Establecimiento y manejo de un cultivo de piña en la sede de la asociación de ingenieros agrónomos del llano en Villavicencio. Colombia: Universidad de los Llanos. Facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales. Escuela de ingeniería y ciencias agrónomas. Ingeniería Agronómica. 2016. 68 p.

GONZALEZ, Antia. Efecto de ultrasonidos en el proceso de extracción de proteínas de co-productos animales y escalado del proceso. España: Universidad de Oviedo. Master universitario en biotecnología alimentaria. 2017. 98 p.

GUERRA, Jose. Propiedades medicinales de la piña (Ananas comosus). Perú: Universidad Nacional del Altiplano, 2016. 10 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

IDEAM. Temperatura, brillo solar y evaporación, Mocoa [en línea]. Mocoa, Putumayo. (22 de Diciembre del año 2017). [Consultado: 15 de Febrero de 2019]. Disponible en internet: <https://web.archive.org/web/20071222200433/http://www.ideam.gov.co/sectores/agro/climat/tempemocoa.htm>.

MAG. Generalidades de la actividad. En: Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agro cadena de Piña en la región Huetar Norte. Ciudad Quesada, Costa Rica: Septiembre, 2007. p. 25.

MARCA, Carlos. Fertilización mineral y biofertilización en piña (Ananas comosus L. Merr) cv. "GOLDEN" EN RIO NEGRO (SATIPO). Lima: Universidad Nacional agraria la Molina. Ingeniería Agrónoma. 2017. 94 p.

MIHALACHE, Loor. Análisis de la demanda de la piña en el mercado de España. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de ciencias administrativas. Ingeniería en Comercio Exterior. 2015. 136 p.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Colombia Frutas de la amazonia. Bogota, 2008. 36 p.

MOHAN, Resmi, et al. Optimisation of Bromelain enzyme extraction from Pineapple (Ananas comosus) and application in process lindustry. India. American Journal of Bichemistry and Biotechnology. 18 de Agosto del año 2016 188 – 195 p.

MURCIA, Dora; TOVAR, María y TOVAR, María E. Propiedades físicas, químicas y mecánicas de la piña Golden y Mayanes utilizada para la indumentaria en Bogotá. En: Teoría y Praxis investigativa. Bogotá, Colombia. Julio-Diciembre, 2013, no.2. 32 - 43 p.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Biuret method. AOAC 1999. Estados Unidos. 1990. 7 p.

PIÑA [en línea]. Nations Unies CNUCED, 2011- [citado en 14 de Julio 2018]. Disponible en Internet: http://unctad.org/es/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp09_Pineapple_es.pdf p. 3.

POLAINA, Julio. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, Citado por MAGALLANES, Jhon y SALCEDO, Nancy. Extracción, caracterización y secado por aspersion de Bromelina cruda obtenida a partir de residuos de Piña "Perolera" (Ananas Comosus). Tesis de grado Ingeniería de Alimentos. Guayaquil, Ecuador.: Escuela Superior Politécnica del Litoral. 2013. p. 7.

PULIDO, Analleli. Estudio Técnico - Económico para la fabricación de Bromelina. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico Industrial. México D.F. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas. 2007. p. 14.

QUINDE, Carmina y SANCHEZ, Nancy. Extracción, purificación parcial y secado de la enzima Bromelina obtenida a partir del Corazón de la Piña (Ananas comosus). Guayaquil, Ecuador: Escuela superior politécnica del litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la producción. Ingeniería de alimentos. 2013. 133 p.

RAMIREZ, Laura y GUTIERREZ, Johana. Purificación de la enzima Bromelina del Anana comosus para su uso potencial en la industria cosmética. Medellín: Tecnoacademia SENA. 2015. p. 1.

REINA, Carlos. Manejo pos cosecha y evaluación de la calidad para la piña (Ananas comosus). Que se comercializa en la ciudad de Neiva. Trabajo de grado para optar por el título profesional de Ingeniero Agrícola. Neiva, Colombia. Universidad Surcolombiana. 1994. 206 p.

RIVERA, Robert y SALGADO, Didier. Sistematización de las técnicas ancestrales empleadas en la siembra y cultivo de la piña en el municipio de paratebueno. Villavicencio: Corporación Universitaria Minuto de Dios. Tecnólogo en comunicación gráfica. 2017. 83 p.

ROCA, Pilar; OLIVER, Jordi y RODRIGUEZ, Ana. Bioquímica Técnicas y Métodos. no. 01. España: Helice, 2003. 348 p.

RODRIGUEZ, Romelio y et al. Producción de frutos de piña (Ananas comosus L. Merr) MD-2 a partir de Vitroplantas. En: Cultivos Tropicales. 2016, vol. 37, no. especial, p. 40 – 48.

RUA, Edwin; BARRERA, Andrea y PINZON, Benjamin. Caracterización y diagnóstico de la cadena productiva de la piña en el departamento del Casanare. En: Revista Estrategia Organizacional. Marzo – Junio, 2016, no. 5. 29-48 p. ISSN 2339-3866.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Planeación agrícola nacional 2017 – 2030. México, 2017. 16 p.

SOLEDAD, María, et al. Aspectos biológicos y conservación pos cosecha de la piña nativa (*Ananas comosus* L. Merr v.v. India) en la Amazonia Occidental Colombiana. En: Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia. Bogotá D.C.: Dioned Victoria González, 2004. p. 59-84.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. Quilmes: Universidad Nacional de Quilmes, 2010. 5 p.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN. Bioquímica de proteínas [diapositivas]. San Martin. 98 diapositivas, color.

VEGA, Karla. Extracción de bromelina obtenida a partir de residuos del procesamiento de Piña (*Ananas comosus*). Quito: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Ingeniería Agroindustrial. 2017. 138 p.

ANEXOS

ANEXO A

PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE SULFATO DE AMONIO PARA SOLUCIONES ACUOSAS

Tabla 52. Cantidades de sulfato de amonio a agregar para 1 L de solución

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 0 °C)	Percentage saturation at 0 °C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (g) to be added to 1 l of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

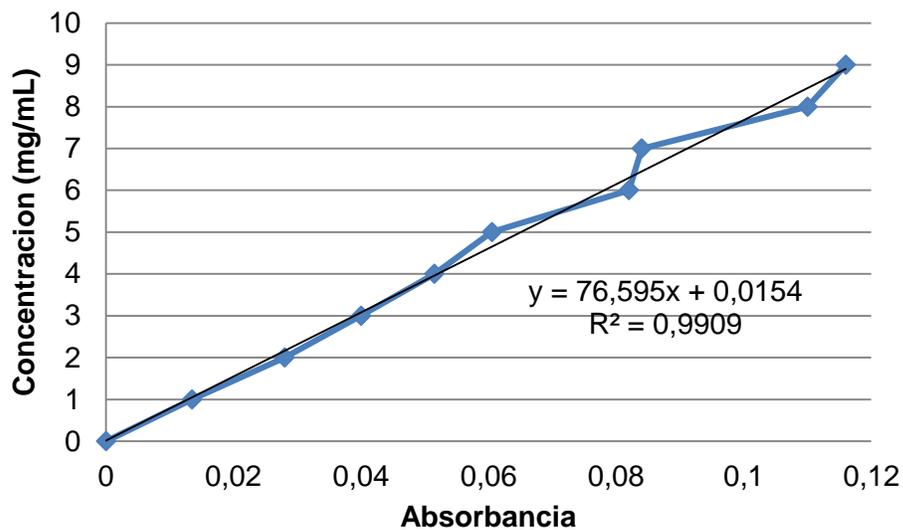
^a Reprinted from England and Seifer (1990), which was adapted from Dawson *et al.* (1969).

Fuente: *PROTEIN PRECIPITATION TECHNIQUES – Richard R. Burgess*

ANEXO B

CURVA DE CALIBRACIÓN – MÉTODO BIURET

Grafica 8. Concentración albumina de suero bovino



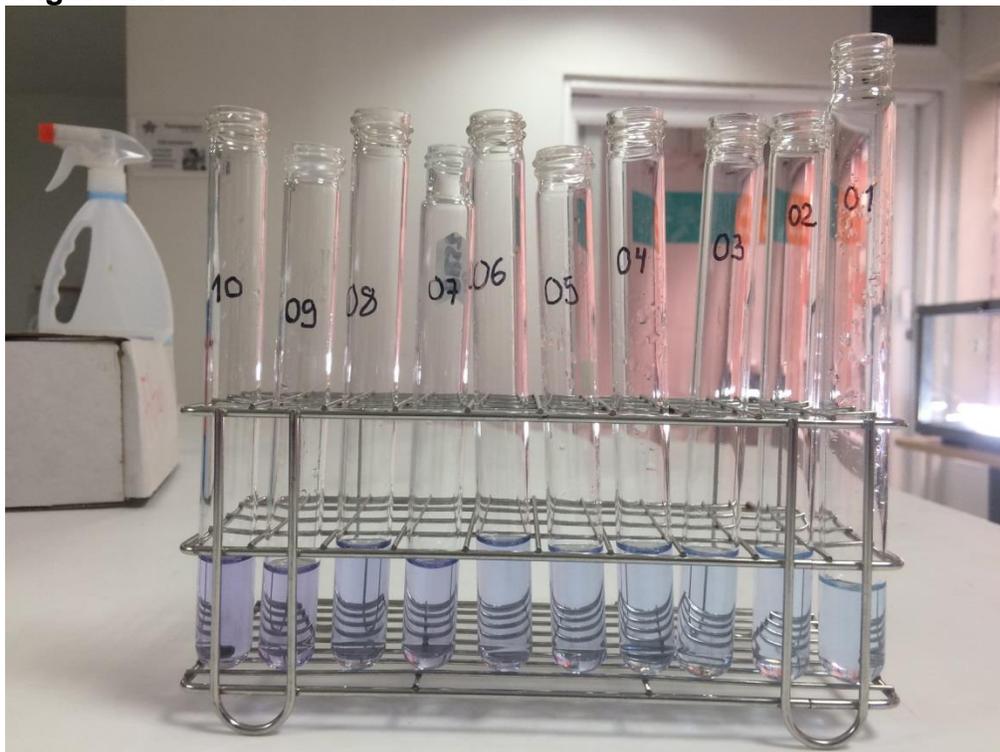
Fuente: elaboración propia.

Tabla 53. Absorbancias para cada concentración preparada

Absorbancia	Concentración (mg/mL)
0	0
0,0135	1
0,027	2
0,0405	3
0,054	4
0,0675	5
0,081	6
0,0945	7
0,108	8
0,1215	9

Fuente: elaboración propia.

Figura 16. Soluciones curva de calibración - Método Biuret



Fuente: elaboración propia.

ANEXO C

COTIZACIÓN REACTIVOS



Bogotá, D.C. 29 de Octubre de 2018

Señor
Atr: Sr. MARTIN DAVID AGUDELO BETANCOURT
Ciudad

CÓDIGO: F02CO
VERSIÓN: 4
VIGENCIA: 15-Jul-14
PAGINA: 1 de 1



REF: COTIZACION No. 764/18

Apreciado señor:
Atendiendo su amable solicitud, nos permitimos cotizarle lo siguiente:

ITEM	DESCRIPCION	CANT.	MARCA	Precio Unit. \$	Valor Total \$	T. ENTREGA
1*	POLIETILENGLICOL 2000 PARA SINTESIS FRASCO X 1 KL	1	MERCK	410.000,00	410.000,00	60-90 DIAS
2	CASEINA HIDROLIZADA (HIDROLIZADA CON ACIDO) PARA MICROBIOLOGIA FRASCO X 500 GR	1	MERCK	1.335.000,00	1.335.000,00	8 DIAS
3	ACIDO TRICLOROACETICO ACS FRASCO X 250 GR	1	PANREAC	180.000,00	180.000,00	3 DIAS
4*	POLIETILENGLICOL 4000 PARA SINTESIS FRASCO X 1 KL	1	MERCK	322.000,00	322.000,00	60-90 DIAS
5	SODIO FOSFATO DIBASICO ANHIDRO ACS FRASCO X 500 GR	1	PANREAC	149.000,00	149.000,00	3 DIAS
6	L-CISTEINA PARA BIOQUIMICA FRASCO X 100 GR	1	PANREAC	450.000,00	450.000,00	3 DIAS
7	MALTODEXTRINA PRSENTACIÓN: 1 KL	1	IMPORTADO	9.000,00	9.000,00	3 DIAS
8	L-TIROSINA FRASCO X 50 GR	1	ALFA (USA)	258.000,00	258.000,00	3 DIAS

CONDICIONES COMERCIALES.

PRECIOS NETOS MAS EL 19% DE IVA
ENTREGA: VER CADA ITEM
FORMA DE PAGO: CONTADO
VALIDEZ DE LA OFERTA: 30 DIAS
EXISTENCIAS SUJETAS A PREVIA VENTA

OBSERVACIONES:

MERCANCIA PUESTA EN BOGOTA
ITEMS Nos: 1* Y 4*: SON PRODUCTOS DE IMPORTACIÓN ESPECIAL, SU ENTREGA SERÁ DE 60-90 DÍAS UNA VEZ RECIBIDA SU ORDEN DE COMPRA.
LOS PRODUCTOS SE ENTREGAN CON SU CERTIFICADO DE ANALISIS.

Cualquier información adicional que ustedes necesiten, con mucho gusto será enviada a la menor brevedad posible.

Cordialmente,

QUIMILIZ LTDA.
NIT: 830.512.516-7

Angelica Herrera G.
Dpto. Comercial

Carrera 23 No. 51-01 - Galerías- Telefonos: 2499857 - 3383494 - e.mail: ventas@quimiliz.com Bogotá D.C., Colombia

**EQUIPOS - REACTIVOS - VIDRIERIA
IMPLEMENTOS PARA LABORATORIO**

FACTURACION No. 012

Bogotá, 04/07/2018

Señores

CLIENTES VARIOS
MARTIN DAVID AGUDELO BETANCOURT
martin.agudelo@estudiantes.uamerica.edu.co



860.403.097-4

COTIZACION : WI-38497

38497

REF.	DESCRIPCION	MARCA	PRES.	CANT.	V.UNITARIO	V. TOTAL	IVA
1	251820.1208 REACTIVO DE BIURET	PANREAC	100.0 ml	1	94,400	94,400	19.
2	A3694.0050 L- CISTEINA PARA BIOQUIMICA	PANREAC	50.00 g	1	190,400	190,400	19.
3	A3694.0100 L- CISTEINA PARA BIOQUIMICA	PANREAC	100.0 g	1	360,000	360,000	19.
4	131067.1608 ACIDO TRICLOROACETICO ACS	PANREAC	100.0 g	1	102,400	102,400	19.
5	A1431.0500 ACIDO TRICLOROACETICO PARA BIOQUIMICA	PANREAC	500.0 g	1	199,200	199,200	19.
6	A1431.1000 ACIDO TRICLOROACETICO PARA BIOQUIMICA.	PANREAC	1.00 kg	1	280,800	280,800	19.
7	131509.1211 POTASIO FOSFATO MONOB. ANHID. (PRIM, DIHIDROGENOFOSFATO) KH2PO4 ACS	PANREAC	1.00 kg	1	136,800	136,800	19.
8	PFM-1000 POTASIO FOSFATO MONOB. ANHID. (PRIM, DIHIDROGENOFOSFATO) KH2PO4	CHEMI	1.00 kg	1	88,000	88,000	19.
9	141512.1210 POTASIO FOSFATO DIBASICO ANHIDRO (SECUNDARIO, HIDROGENOFOSFATO) K2HPO4	PANREAC	500.0 g	1	184,000	184,000	19.
10	A1032.1000 AMONIO SULFATO PARA BIOQUIMICA.	PANREAC	1.00 kg	1	176,800	176,800	0.0
11	141652.1209 SODIO CIANURO	PANREAC	250.0 g	1	88,000	88,000	19.
12	141007.1211 ACETONA 99.5% "SNE" ****	PANREAC	1.00 L	1	44,800	44,800	19.
13	A-1000 ACETONA 99.5% "SNE" ****	CHEMI	1.00 L	1	38,400	38,400	19.
14	141007.1212 ACETONA 99.5% "SNE" ****	PANREAC	2.50 L	1	103,200	103,200	19.
15	141007.1214 ACETONA 99.5% "SNE" ****	PANREAC	5.00 L	1	180,000	180,000	19.
16	131165.1604 AZUL DE BROMOFENOL ACS	PANREAC	5.00 g	1	174,400	174,400	19.
17	141090.1211 ALCOHOL ISOPROPILICO (2- PROPANOL) 99.5% "SNE" ****	PANREAC	1.00 L	1	47,200	47,200	19.
18	141090.1212 ALCOHOL ISOPROPILICO (2- PROPANOL) 99.5% "SNE" ****	PANREAC	2.50 L	1	108,000	108,000	19.
19	AIP-1000 ALCOHOL ISOPROPILICO (2-PROPANOL) 99.5% "SNE" ****	CHEMI	1.00 L	1	28,000	28,000	19.
20	141679.1211 SODIO FOSFATO DIBASICO ANHIDRO (SECUNDARIO, HIDROGENOFOSFATO) Na2HPO4.	PANREAC	1.00 kg	1	183,200	183,200	19.
21	131669.1209 ACIDO ETILEN DIAMINO TETRACETICO DISODICO DIHIDRATO (EDTA DISODICO) ACS	PANREAC	250.0 g	1	172,000	172,000	19.
22	131669.1210 ACIDO ETILEN DIAMINO TETRACETICO DISODICO DIHIDRATO (EDTA DISODICO) ACS	PANREAC	500.0 g	1	304,000	304,000	19.
23	131669.1211 ACIDO ETILEN DIAMINO TETRACETICO DISODICO DIHIDRATO (EDTA DISODICO) ACS	PANREAC	1.00 kg	1	552,000	552,000	19.
24	141726.1609 SODIO YODURO	PANREAC	250.0 g	1	798,400	798,400	19.
25	131726.1609 SODIO YODURO ACS	PANREAC	250.0 g	1	798,400	798,400	19.



Dirección: CRA.68D No. 11-76

PBX: 552 3040 - **FAX:** 552 3040 EXT.134

E-mail: ventas3@elementosquimicos.com.co

Página Web: www.elementosquimicos.com.co BÓGOTA D.C. - COLOMBIA



860.028.662-8

CLIENTE: SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE
 NIT. 899999034-1
 Contacto: MARTIN DAVID AGUDELO BETANCOURT
 Cargo:

Dirección: CALLE 57 NO 8-69
 Teléfono: 311 819 4074
 Ciudad: BOGOTA

Cotización No. P 11046

Fecha: 04-JUL-2018
 Validez de la oferta: 30 DÍAS
 Forma de pago: 30 DÍAS
 Sede: TECNOPARQUE

No.	Referencia	Descripción del producto	Cantidad	Marca	Cantidad	Valor Unitario IVA no Incluido	Desc.	Valor Unitario Con Descuento	Total con Desc. IVA no Incluido
1	3748-01	YODURO DE SODIO CRISTALES RA ACS 500G FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	421,000.00	0.0	421,000.00	421,000.00
2	5632-02	EDTA 0.1M SOL. VOL. RA 1L FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	25,000.00	0.0	25,000.00	25,000.00
3	3828-19	FOSFATO DE SODIO DIB ANH. RA ACS 1KG FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	78,300.00	0.0	78,300.00	78,300.00
4	3828-01	FOSFATO DE SODIO DIB ANH. RA ACS 500G FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	45,700.00	0.0	45,700.00	45,700.00
5	9084-02-C	2-PROPANOL RA ACS (ALCOHOL ISOPROPILICO) 1L FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	48,000.00	0.0	48,000.00	48,000.00
6	9084-03-C	2-PROPANOL RA ACS 4L FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	124,000.00	0.0	124,000.00	124,000.00
7	D293-03	AZUL DE BROMOFENOL 25G FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	359,000.00	0.0	359,000.00	359,000.00
8	9006-02-C	ACETONA RA ACS 1L FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	54,000.00	0.0	54,000.00	54,000.00
9	9006-03-C	ACETONA RA ACS 4L FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	118,000.00	0.0	118,000.00	118,000.00
10	0792-19	SULFATO DE AMONIO GRANULADO RA ACS 1KG FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	134,000.00	0.0	134,000.00	134,000.00
11	3246-05	FOSFATO DE POTASIO MONOB. CRIS RA ACS 2.5KG FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	408,000.00	0.0	408,000.00	408,000.00
12	3252-01	FOSFATO DE POTASIO DIB. POLVO RA ACS 500G FECHA DE ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA	1	J.T. BAKER	1	83,500.00	0.0	83,500.00	83,500.00

ANEXO D

PROCESO DE ESCALAMIENTO – ANÁLISIS DIMENSIONAL

PRECIPITACIÓN SALINA (SALTING OUT)

- **Variedad Amazónica**

$$127.10 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.00918 \text{ kg Sulfato de Amonio}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 29.20 \text{ kg de Sulfato de Amonio}$$

$$127.10 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.0498 \text{ kg de Sobrenadante}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 158.30 \text{ kg de Sobrenadante}$$

$$127.10 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.000169 \text{ kg de Bromelina}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) = 0.5391 \text{ kg} \\ = 539.1 \text{ g de Bromelina}$$

- **Variedad Mayanes**

$$129.80 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.00918 \text{ kg Sulfato de Amonio}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 29.80 \text{ kg de Sulfato de Amonio}$$

$$129.80 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.0496 \text{ kg de Sobrenadante}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 161.1 \text{ kg de Sobrenadante}$$

$$129.80 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.000349 \text{ kg de Bromelina}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) = 1.1331 \text{ kg} \\ = 1,133.1 \text{ g de Bromelina}$$

- **Variedad Golden MD2**

$$134.11 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.01049 \text{ kg Sulfato de Amonio}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 35.2 \text{ kg de Sulfato de Amonio}$$

$$134.11 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.0511 \text{ kg de Sobrenadante}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) \\ = 171.5 \text{ kg de Sobrenadante}$$

$$134.11 \text{ L Jugo centrifugado} \times \left(\frac{0.000149 \text{ kg de Bromelina}}{0.04 \text{ L Jugo centrifugado}} \right) = 0.5017 \text{ kg} \\ = 501.7 \text{ g de Bromelina}$$