

**UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN**  
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA  
Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos



*Una Institución Adventista*

**Determinación de los parámetros de extracción de bromelina a partir de desechos de piña (*Ananas Comosus*) variedad Golden MD-2 del distrito de Satipo**

Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero de Industrias Alimentarias

**Autor:**

Alonso Jesus Cuadros Villar

**Asesor:** Msc Daniel Sumire Qquenta

Lima, Junio de 2022

## DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA DE TESIS

Msc Daniel Sumire Qquenta de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que la presente investigación titulada: **“Determinación de los parámetros de extracción de bromelina a partir de desechos de piña (*Ananas Comosus* (L) Merr) variedad Golden MD-2 del distrito de Satipo”** constituye la memoria que presenta el (la) / los Bachiller(es) Alonso Jesus Cuadros Villar para obtener el título de Profesional de Ingeniero de Industrias Alimentarias, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente declaración en la ciudad de Lima, a los 12 días del mes de Julio del año 2022



---

Daniel Sumire Qquenta

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En Lima, Ñaña, Villa Unión, a **10 días del mes de junio del año 2022** siendo las 10:00 horas, se reunieron en modalidad virtual u online sincrónica, bajo la dirección del (de la) Presidente (a) del jurado: **Dra. Amparo Eccoña Sota**, el (la) secretario(a): **PhD. Silvia Pilco Quesada** y los demás miembros Vocal: **MSc. Carmen Rosa Apaza Humerez** y el (la) asesor (a): **MSc. Daniel Sumire Quenta**, con el propósito de administrar el acto académico de sustentación de la tesis titulada: **Determinación de los parámetros de extracción de bromelina a partir de desechos de 2 piña (Ananas Comosus (L) Merr) variedad Golden MD-2 del distrito de Satipo.**

del(los)/la(las)bachiller/es: a) **ALONSO JESUS CUADROS VILLAR**,

conducente a la obtención del título profesional de: **INGENIERO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

El Presidente inició el acto académico de sustentación invitando al (los)/a(la)(las) candidato(a)/s hacer uso del tiempo determinado para su exposición. Concluida la exposición, el Presidente invitó a los demás miembros del jurado a efectuar las preguntas, y aclaraciones pertinentes, las cuales fueron absueltas por el(los)/la(las) candidato(a)/s. Luego, se produjo un receso para las deliberaciones y la emisión del dictamen del jurado.

Posteriormente, el jurado procedió a dejar constancia escrita sobre la evaluación en la presente acta, con el dictamen siguiente:

Candidato-(a): **ALONSO JESUS CUADROS VILLAR**

CALIFICACIÓN				Mérito
	Vigesimal	Literal	Cualitativa	
Aprobado	17	B+	Muy bueno	Sobresaliente

(\*) *Ver parte posterior*

Finalmente, el Presidente del jurado invitó al(los)/a(la)(las) candidato(a)/s a ponerse de pie, para recibir la evaluación final y concluir el acto académico de sustentación procediéndose a registrar las firmas respectivas.



**Dra. Amparo Eccoña Sota**  
Presidente (a)



**PhD. Silvia Pilco Quesada**  
Secretario(a)



**MSc. Daniel Sumire Quenta**  
Asesor(a)



**Dr. Carmen Rosa**  
Miembro - Vocal

Miembro

**Bach. Alonso Jesus Cuadros Villar**  
Candidato/a

Candidato/a (b)

1 **Determinación de los parámetros de extracción de bromelina a partir de desechos de**  
2 **piña (*Ananas Comosus*) variedad Golden MD-2 del distrito de Satipo**

3 **Determination of bromelain extraction parameters from wastes of pineapple (*Ananas***  
4 ***Comosus* (L) Merr) Golden MD-2 variety from the district of Satipo.**

5 <sup>1</sup>Centro de Investigación de Tecnología de los Alimentos, Escuela Profesional de Ingeniería de  
6 Industrias alimentarias, Universidad Peruana Unión, Lima, Perú.

7 \*Autor para correspondencia: [alonsocuadros@upeu.edu.pe](mailto:alonsocuadros@upeu.edu.pe)

8 Alonso Jesus Cuadros Villar  <https://orcid.org/0000-0003-0617-9868>

9 Ybeth Denisse Rivera Rufino  <https://orcid.org/0000-0002-4127-8362>

10 Daniel Sumire Qqenta  <https://orcid.org/0000-0002-4212-7267>

11 Alex Danny Chambi Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0002-0858-0332>

12

---

### Resumen

13 La bromelina es la enzima que se encuentra en todas las partes de la piña y tiene múltiples  
14 aplicaciones en la industria alimentaria, la cosmética, el cuero, los textiles e incluso la  
15 medicina. El presente trabajo se centró principalmente en determinar los parámetros de  
16 extracción: (X<sub>1</sub>) pH, (X<sub>2</sub>) temperatura, (X<sub>3</sub>) tiempo de licuado, (X<sub>4</sub>) concentración de corona,  
17 (X<sub>5</sub>) relación SE/MR (Solución extractora/ Mezcla de residuos), así como, (X<sub>6</sub>) velocidad y  
18 (X<sub>7</sub>) tiempo de centrifugación que influyen en la obtención del extracto crudo con mayor,  
19 (Y<sub>1</sub>) proteína total, (Y<sub>2</sub>) actividad enzimática y (Y<sub>3</sub>) actividad específica de la bromelina, esta  
20 última se extrajo a partir de los subproductos (corona, corazón y cáscara) de piña (*Ananas*  
21 *Comosus* (L) Merr) variedad Golden MD-2 mediante una extracción química-acuosa con  
22 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los efectos principales fueron evaluados mediante la Suma de Cuadrados  
23 del ANOVA y el Diagrama de Pareto, para medir el grado de influencia de los 7 factores.  
24 Así pues; los resultados demostraron que el CPT (Contenido de proteína total) fue afectado  
25 más por el pH, la temperatura y la concentración de corona. Igualmente; la AS (Actividad  
26 específica) se vió influenciada en su mayoría por los mismos factores del CPT como el pH,  
27 la temperatura y la concentración de corona, la AE (Actividad enzimática) fue influenciada  
28 por el tiempo de licuado, la relación SE/MR y la velocidad de centrifugación.

29 Palabras claves: bromelina; parámetros de extracción; subproductos, *Ananas comosus* L.

---

30

31

32

### Abstract

33 Bromelain is the enzyme found in all parts of pineapple and has multiple applications in the  
34 food industry, cosmetics, leather, textiles and even medicine. The present work was mainly  
35 focused on evaluating the effect of the parameters: (X1) pH, (X2) temperature, (X3)  
36 liquefaction time, (X4) corona concentration, (X5) SE/MR ratio, as well as, (X6) speed and  
37 (X7) centrifugation time that influence in obtaining crude extract with higher, (Y1) total  
38 protein, (Y2) enzymatic activity and (Y3) bromelain specific activity, the latter was extracted  
39 from the by-products (crown, core and peel) of pineapple (*Ananas Comosus* (L) Merr)  
40 Golden MD-2 variety by aqueous-chemical extraction with  $H_2SO_4/Na_2SO_4$ . The main effects  
41 were evaluated by ANOVA Sum of Squares and Pareto Diagram to measure the degree of  
42 influence of the 7 factors. Thus; the results showed that CPT was most affected by pH,  
43 temperature and crown concentration. Likewise; AS was mostly influenced by the same  
44 factors of CPT such as pH, temperature and corona concentration, AE was influenced by  
45 liquefaction time, SE/MR ratio and centrifugation speed.

46 Keywords: bromelain; extraction parameters; by-products.

---

### 47 Introducción

48 La piña (*Ananas Comosus*) es una de las frutas tropicales más populares del mundo. Según  
49 (FAOSTAT, 2018) reveló que la producción mundial de piña en 2015 y 2016 (25,8 millones de  
50 toneladas) aumentó con respecto a 2014 (25,4 millones de toneladas) y 2013 (24,7 millones  
51 de toneladas).

52 La Piña (*Ananas comosus*), una planta perenne monocotiledónea perteneciente a la familia  
53 Bromeliaceae, se cultiva en varios países tropicales y subtropicales como Filipinas,  
54 Tailandia, Indonesia, Malasia, Kenia, India y China (Ramli et al., 2017).

55 El aumento de la demanda de piña se atribuye directamente a más generación de residuos de  
56 piña ya que los humanos solo consumen la pulpa que representa el 30-45% del peso total de  
57 piña y el resto entre 55 y el 70% corresponde a los residuos en forma de corona, corazón,  
58 cáscaras y tallo de la fruta que se eliminan. (Banerjee et al., 2018; Chaurasiya y Hebbar,

59 2013). Se ha mencionado que los desechos de la piña, como la cáscara, el corazón y la corona,  
60 también contienen gran cantidad de bromelina, la extracción de la enzima bromelina está  
61 siendo una alternativa de fuente barata de esta enzima proporcionándole un valor agregado a  
62 estos residuos evitando así problemas ambientales (Nor et al., 2015). Estos desechos aún  
63 tienen un gran potencial tecnológico, ya que pueden ser procesados y transformados en  
64 coproductos alimenticios, cosméticos, farmacéuticos, entre otros productos y biomateriales  
65 de alto valor agregado (Kowalska et al., 2017).

66 La bromelina es un grupo de enzimas que hidrolizan proteínas, que se encuentran en los  
67 tejidos del Bromeliáceas familia de plantas de la cual piña (*Ananas comosus L.*) es la fuente  
68 más conocida. La bromelina constituye una mezcla inusualmente compleja de diferentes tiol-  
69 endopeptidasas y otros componentes aún no completamente caracterizados como fosfatasa,  
70 glucosidasas, peroxidasas, celulasas, glicoproteínas, carbohidratos, varios inhibidores de  
71 proteasas y calcio unido orgánicamente, entre otros. (Rowan et al., 1990). Por lo general, se  
72 distingue como bromelina del tallo (EC. 3.4.22.32) o bromelina de la fruta (EC. 3.4.22.33)  
73 dependiendo de su fuente, tienen un peso molecular de 33 kDa y 28 kDa con un punto  
74 isoelectrico de 9,5 y 4,6, respectivamente. Se ha demostrado que el extracto de bromelina  
75 exhibe su actividad en un rango de pH de 4,5 a 9,8 (Khan y Abourashed, 2009).

76 La bromelina se ha usado comercialmente en la industria alimentaria como para ablandar  
77 carne, elaborar cerveza, así como para la producción de hidrolizados de proteínas, como  
78 agente anti pardeamiento en unidades de procesamiento de frutas (inhibe la oxidación del  
79 fenol en las frutas), en la panificación (mejora la relajación de la masa y permite que la masa  
80 suba uniformemente) (Arshad et al., 2014; Ketnawa et al., 2011; Walsh, 2002). Otras  
81 aplicaciones son el curtido, para las industrias del cuero y textiles se usa ampliamente para  
82 descomponer y solubilizar parcialmente proteínas de la lana y seda, suavizante de piel y  
83 formulaciones de detergentes (Arshad et al., 2014; Sengupta y Dasgupta, 2006; Uhlig, 1998)  
84 y en la medicina como agente antiinflamatorio, como agente potenciador de antibióticos,  
85 agente de desbridamiento de heridas (Maurer, 2001).

86 Los métodos más utilizados para lisar o romper las células y así poder extraer componentes  
87 como la bromelina, se clasifican principalmente como mecánicas y no mecánicas, el primero  
88 hace uso de la fuerza y fricción; el segundo implica la adición de químicos, enzimas o

89  disrupción física, sin embargo, a menudo se combina ambos métodos para facilitar y  
90  aumentar la eficiencia de la extracción. (Shehadul et al., 2017)

91  Al respecto Chaurasiya y Hebbar (2013) realizaron una investigación para optimizar las  
92  condiciones de extracción de bromelina con mayor actividad enzimática a partir del núcleo  
93  de la piña (*Ananas comosus L.*), así mismo se analizó las características fisicoquímicas del  
94  extracto, los resultados mostraron una mayor actividad enzimática (153,42 CDU / ml),  
95  actividad específica (12,18 CDU / mg) y proteína total (13,10 mg / ml) al usar un tampón de  
96  fosfato de sodio a pH 7, la relación de núcleo a tampón se mantuvo en 1: 1 p / v, el efecto de  
97  la temperatura durante la extracción no fue significativo por lo que se realizó a 25°C, además  
98  la trituración se realizó en modo cíclico (20 s ON y 1 min OFF) para minimizar la generación  
99  de calor. Cabe resaltar que CDU es la cantidad de enzima que libera 1 µg de tirosina después  
100  de 1 minuto de digestión a 37 °C en un sustrato estándar de caseína a un pH de 7.0.

101  Para la extracción de la bromelina se requieren condiciones que preserven la integridad  
102  biológica de la misma, por lo que se puede utilizar la mezcla de sales de sulfuro y sulfato  
103  como disolvente para proteger la enzima, es así como Hernández et al. (2005) uso un tampón  
104  conformado por agua acidulada y sulfuro de sodio como protector del grupo sulfhidrilo (-  
105  SH) de la oxidación que pueda sufrir (autólisis) la bromelina; así mismo, mejorar la  
106  solubilidad de las proteínas del extracto; por consiguiente, preservar o mantener la actividad  
107  enzimática.

108  Los objetivos de este estudio son (i) Determinar parámetros que influyen para la obtención  
109  del extracto crudo con mayor, proteína total, actividad enzimática y actividad específica de  
110  la bromelina a partir de los residuos de piña, (ii) Analizar las características fisicoquímicas  
111  de los residuos de piña (pH, índice de acidez, humedad, sólidos solubles totales,  
112  conductividad eléctrica, índice de madurez).

## 113  **Materiales y métodos**

### 114  **Materia prima**

115  Las piñas (*Ananas Comosus (L.) Merrill*) variedad Golden MD-2 (edad de aprox. entre 1 año  
116  (48 semanas) y 1.5 años (72 semanas), peso promedio de  $2.364 \pm 0.314$  Kg y grado 2 a 3 en  
117  la escala de maduración fueron adquiridas de la Cooperativa Agraria de Frunature Perú S.A.

118 Los frutos fueron cultivados en el fundo del Centro Poblado de Santa Rosa de Alto Kiatari  
 119 (Sector 40 a 1144 m.s.n.m.), ubicado en el distrito de Pangoa, provincia de Satipo,  
 120 departamento de Junín - Perú.

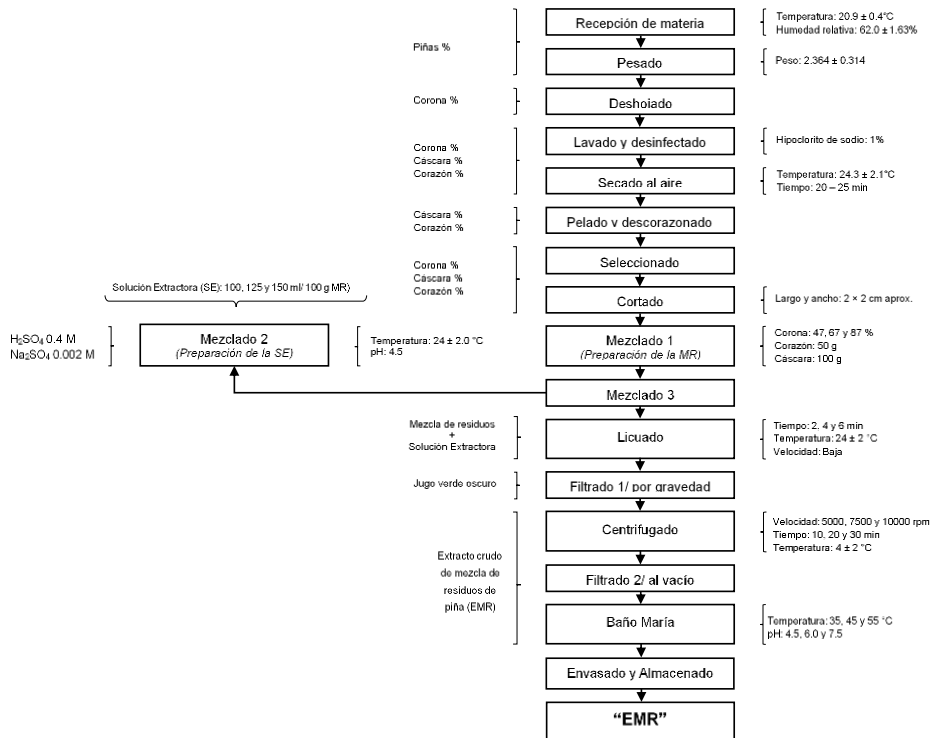
121

122 **Lugar de ejecución**

123 El presente trabajo de investigación se ejecutó durante los meses de junio a diciembre del  
 124 2019 en los Centros de Investigación de Ciencias Químicas, Tecnología de Alimentos  
 125 (CITAL), Ciencia de Alimentos (CICAL) y en el Laboratorio de Procesos, pertenecientes a  
 126 la Facultad de Ingeniería y Arquitectura (FIA) de la Universidad Peruana Unión (UPeU) (Km  
 127 19.5, Carretera Central, Ñaña – Lima).

128 **Elaboración del extracto**

129 La extracción química-acuosa de la bromelina se realizó según la metodología descrita por  
 130 Nor et al. (2015) con modificaciones.



131 Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de extracción química-acuosa de bromelina

132



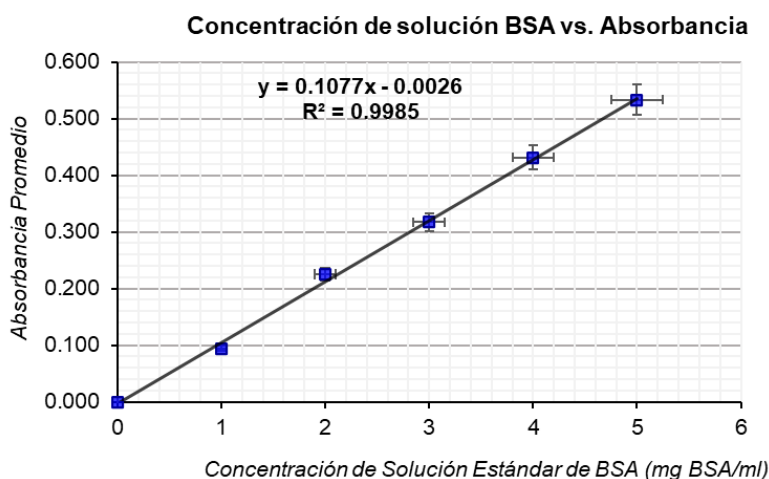
### 133 **Determinación de las propiedades fisicoquímica de los residuos de piña**

134 Se analizó el pH por el método del potenciómetro AOAC 920.43 (2005), el índice de acidez  
135 (%), expresado como ácido cítrico anhidro, por titulación con hidróxido de sodio al 0.1 N  
136 (AOAC, 942.15:2016); los sólidos solubles totales (SST), expresado como °Brix, con el  
137 refractómetro ATAGO a  $25 \pm 0.1$  °C (0 – 32 °Brix) AOAC 932.12 (1980) y la conductividad  
138 eléctrica (CE) utilizando el conductímetro a  $25 \pm 0.1$  °C (AOAC, 957.16:1966) de la corona,  
139 la cáscara y el corazón de la piña, respectivamente.

### 140 **Análisis proximal**

#### 141 **Determinación del contenido de proteína total (CPT)**

142 La proteína total se determinó mediante el método de Biuret descrito por Banerjee *et al.*  
143 (2020) con modificaciones, utilizando el compuesto de Biuret como reactivo y BSA (10  
144 mg/ml) como estándar. Se agregó 200  $\mu$ L de EMR, 1800  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 3000  $\mu$ L de reactivo  
145 Biuret a cada tubo de ensayo contra un blanco (Prueba con la misma mezcla de reacción sin  
146 la muestra). Posteriormente los tubos fueron llevados al mezclador Vórtex (VRW) para ser  
147 agitados a velocidad baja por 2 a 3 s. Los tubos se incubaron en Baño María a 37 °C durante  
148 15 min para formar el “*complejo azul claro a violeta*” con los enlaces de la proteína del EMR.  
149 Después de enfriarlos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2.0$  °C) por 5 min en baño de agua, se  
150 midió la absorbancia a 540 nm para evaluar el cambio del CPT con respecto al tiempo en el  
151 *software Excel 2013*. Adicionalmente; la curva estándar de BSA (0 a 5 mg/ml) fue construida  
152 para obtener los valores de la pendiente A y el intercepto B.



153

154 **Figura 2. Construcción de la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)**

155 El CPT se calculó mediante la siguiente ecuación 1:

156

$$\begin{aligned} CPT \left( \frac{mg}{ml \text{ EMR}} \right) &= \frac{(DO_{540} - B) \times FD_{EMR}}{A \times V_{EMR}} & (1) \\ &= \frac{\{[(Abs(Muestra)_{540} - Abs(Blanco)_{540})] - B\} \times FD_{EMR}}{A \times V_{EMR}} \end{aligned}$$

157

158 Dónde: *CPT* es el contenido o la concentración de proteína total del EMR; EMR es el extracto  
159 crudo de residuos de piña; *mg/ml EMR* son los miligramos de proteína total por ml de EMR;  
160 *DO*<sub>540</sub> es la absorbancia de la prueba a 540 nm; *Abs(Muestra)*<sub>540</sub> es la absorbancia con EMR  
161 a 540 nm; *Abs(Blanco)*<sub>540</sub> es la absorbancia sin EMR a 540 nm; *B* es el intercepto (- 0.0026);  
162 *FD*<sub>EMR</sub> es el factor de dilución del EMR ( $(V_f/V_i) = (2 \text{ ml}/0.2 \text{ ml}) = 10$ ); *V<sub>f</sub>* es el volumen final  
163 (*H<sub>2</sub>O* + EMR); *V<sub>i</sub>* es el volumen inicial (EMR); *A* es la pendiente (0.1077 mg de BSA<sup>-1</sup>) y  
164 *V*<sub>EMR</sub> es el volumen de solución de EMR (*H<sub>2</sub>O* + EMR).

165

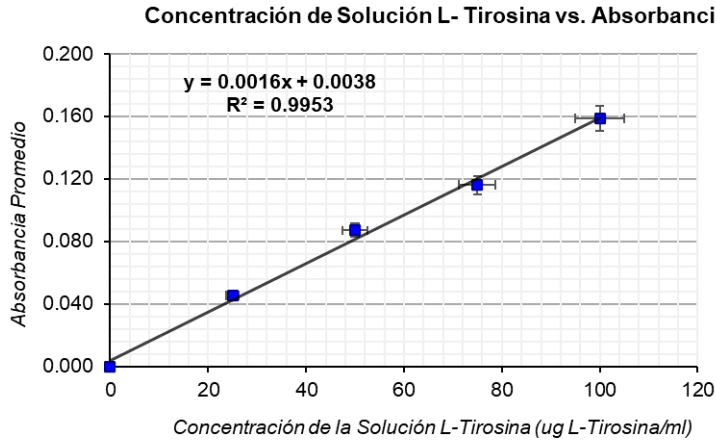
166 Determinación de la actividad enzimática (AE)

167 La actividad enzimática del EMR se determinó mediante el método de la unidad de digestión  
168 de tirosina (TU) propuesto por la Enzyme Development Corporation (2017) y adaptado según  
169 Nor et al. (2015) con modificaciones, utilizando caseína (10 mg/ml) y L-Tirosina (100 µg/ml)  
170 como sustrato y estándar respectivamente. Se agregó 5 ml de solución de caseína (25 de  
171 caseína/250 de solución a pH 6.0) a cada tubo de ensayo (2 para la muestra y 1 para el blanco)  
172 para ser colocados en Baño María a 40 ± 0.1 °C por aproximadamente 10 minutos.

173 Se añadió 0.01 ml de EMR y 1.99 ml de agua destilada a intervalos suficiente (1 min.) a los  
174 tubos designados para la muestra, seguidamente fueron cerrados, invertidos suavemente  
175 varias veces y colocados en baño de agua a 40 ± 0.1 °C por 60 min, posteriormente se  
176 adicionó 3 ml de solución de Ácido tricloroacético (30 g TCA/100 ml de agua destilada) y  
177 se agitó vigorosamente para luego ser regresados al baño de agua a 40 ± 0.1 °C por 30 min.  
178 Para el blanco primero se adicionó 3 ml de TCA al 30% al tubo con caseína, seguido de 0.01  
179 ml de EMR y 1.99 ml de agua destilada, bajo las mismas condiciones y repitiendo el mismo  
180 procedimiento.

181 Después de enfriar y agitar nuevamente los tubos a temperatura ambiente (24 ± 2.0 °C), se  
182 filtró dos veces a través de papel filtro Whatman #1.

183 La absorbancia se determinó a 280 nm para evaluar la variación de la AE con respecto al  
 184 tiempo en el software *Excel 2013*. Adicionalmente; la curva estándar de L – Tirosina (0 a  
 185 100 µg/ml) fue construida para obtener el valor de la pendiente A.



186  
 187 Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción química-acuosa de bromelina

188 El resultado de la AE fue expresado en UT(unidades de Tirosina)/ml, como la cantidad de  
 189 bromelina por ml de EMR que se necesita para liberar 1 µg de tirosina en 1 min cuando la  
 190 caseína se hidrolizó en las condiciones estándar de pH 6.0 y 40 °C, mediante la siguiente  
 191 ecuación 2:

192

$$AE \left( \frac{UT}{ml \text{ EMR}} \right) = \frac{DO_{280} \times V_T \times FD_{EMR}}{V_{EMR} \times A} = \frac{[Abs(Muestra)_{280} - Abs(Blanco)_{280}] \times V_T \times FD_{EMR}}{V_{EMR} \times A} \quad (2)$$

193

194 Dónde: *AE* es la actividad enzimática del EMR; *EMR* es el extracto crudo de residuos de  
 195 piña; *UT/ml EMR* es la cantidad de bromelina por cada ml de EMR; *DO<sub>280</sub>* es la absorbancia  
 196 de la prueba a 280 nm; *Abs(Muestra)<sub>280</sub>* es la absorbancia con EMR a 280 nm; *Abs(Blanco)<sub>280</sub>*  
 197 es la absorbancia sin EMR a 280 nm; *V<sub>T</sub>* es el volumen total de la prueba en el tubo ( $V_T = V_C$   
 198  $+ V_{EMR} + V_{TCA} = 10 \text{ ml}$ ); *V<sub>C</sub>* es el volumen de solución de caseína (5 ml), *V<sub>EMR</sub>* es el volumen  
 199 de solución de EMR ( $H_2O + EMR$ ); *V<sub>TCA</sub>* es el volumen de solución de TCA (3 ml); *FD<sub>EMR</sub>*  
 200 es el factor de dilución del EMR ( $(V_f/V_i) = (2 \text{ ml}/0.2 \text{ ml}) = 200$ ); *V<sub>f</sub>* es el volumen final ( $H_2O$   
 201  $+ EMR$ ); *V<sub>i</sub>* es el volumen inicial (*EMR*) y *A* es la pendiente (0.0016 µg de tirosina).

202 Determinación de la actividad específica (AS)

203

204

205 Se determino mediante la ecuación 3:

206

$$AS \left( \frac{UT}{mg} \right) = \frac{AE(TU/ml)}{PT(mg/ml)} \quad (3)$$

207

208 Dónde: *AS* es la actividad específica del EMR, *AE* es la actividad enzimática del EMR; *PT*  
209 es el contenido de proteína total del EMR, *UT/mg* es la cantidad de bromelina por cada mg  
210 de proteína total del EMR, *UT/ml* es la cantidad de bromelina por cada ml de EMR y *mg/ml*  
211 son los miligramos de proteína total por cada ml de EMR.

212 Diseños experimentales

213 Para evaluar el efecto de los parámetros de extracción de la bromelina en el contenido de  
214 proteína total (CPT), actividad enzimática (AE) y actividad específica (AS) del EMR, se  
215 empleó un diseño factorial fraccionado de resolución III conocido como “Diseño Plackett-  
216 Burman Screening (DPBS)” para siete factores y tres niveles (-1, 0 y +1), basándose en la  
217 matriz del diseño “ $2^{7-4} + 3 pc$ ” (Rodriguez y Lemma, 2012). Se obtuvo un total de 11  
218 tratamientos, para 8 puntos factoriales ( $2^{7-4}$ ) y 3 puntos centrales. Calculado por la ecuación  
219 4:

220

$$N = 2^{k-4} + n_0 \quad (4)$$

221

222 Donde: *N* es el número de tratamientos, *k* es el número máximo de factores y *n*<sub>0</sub> son los  
223 puntos centrales.

224 La tabla 1 muestra la matriz del DPBS para las siete variables independientes y tres  
225 dependientes (*Y*<sub>1</sub>, *Y*<sub>2</sub> y *Y*<sub>3</sub>). Los tratamientos se realizaron por duplicado para estimar el *error*  
226 *puro* y la *falta de ajuste* en el ANOVA, además fueron conducidos en orden aleatorio y los  
227 datos analizados por regresiones lineales múltiples mediante el método de mínimos  
228 cuadrados.

229 La función de las variables respuesta *Y*<sub>1</sub>, *Y*<sub>2</sub> y *Y*<sub>3</sub> (proteína total, actividad enzimática y  
230 actividad específica, respectivamente) fueron generadas en los componentes lineales  
231 asumiendo que no existen interacciones y los datos experimentales fueron ajustados al  
232 modelo polinómico de primer orden como se muestra en la siguiente ecuación 5:

233

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k=7} \beta_i X_i + \varepsilon \quad (5)$$

234

235 Dónde:  $k$  es el número de factores ( $k = 7$ );  $Y$  son las variables de respuesta predichas (proteína  
 236 total, actividad enzimática y actividad específica);  $\beta_0$  es el intercepto;  $\beta_i$  son los coeficientes  
 237 del modelo (lineal);  $X_i$  son los valores codificados de las variables independientes y  $\varepsilon$  es el  
 238 error aleatorio (Abdel-Fattah et al., 2012; Plackett y Burman, 1946).

239

240 Tabla 1 Matriz del DPBS ( $2^{7-4} + 3$  pc) para las respuestas  $Y_1$  (proteína total),  $Y_2$  (actividad  
 241 enzimática) y  $Y_3$  (actividad específica).

Tratamientos	Variables Independientes							Variables Dependientes									
	Valores Codificados				Valores Reales			pH de Extracción	Temperatura de Extracción (°C)	Tiempo de Licuado (min)	Concentración de Corona (%)	Relación SE/MR (ml/ 100g)	Velocidad de Centrifugado (rpm)	Tiempo de Centrifugado (min)	$Y_1$ (mg/ml)	$Y_2$ (UT/ml)	$Y_3$ (UT/mg)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$										
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	4.5	35	2	87	150	10000	10	-	-	-
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	7.5	35	2	47	100	10000	30	-	-	-
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	4.5	55	2	47	150	5000	30	-	-	-
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	7.5	55	2	87	100	5000	10	-	-	-
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	4.5	35	6	87	100	5000	30	-	-	-
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	7.5	35	6	47	150	5000	10	-	-	-
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	4.5	55	6	47	100	10000	10	-	-	-
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	7.5	55	6	87	150	10000	30	-	-	-
9	0	0	0	0	0	0	0	6.0	45	4	67	125	7500	20	-	-	-
10	0	0	0	0	0	0	0	6.0	45	4	67	125	7500	20	-	-	-
11	0	0	0	0	0	0	0	6.0	45	4	67	125	7500	20	-	-	-

242

## 243 **Resultados y discusión**

### 244 **Determinación del rendimiento**

245 La Tabla 2, muestra el peso en gramos y su valor porcentual expresado en base seca de los  
 246 diferentes componentes de la piña. Los residuos conformados por la cáscara, corazón y  
 247 corona representan aproximadamente el 42.5% de la piña, un reporte similar lo obtuvieron  
 248 Ketnawa et al. (2012); Misran et al. (2019); Omotoyinbo y Sanni (2017) además mencionan  
 249 que la proporción de residuos es aproximadamente el 50% (p/p) del peso total de la piña. Así

250 mismo la cáscara fue el el residuo con mayor proporción (18.774%, p/p) seguido del corazón  
251 (13.189%, p/p) y de la corona (10.595%, p/p).

252

253 Tabla 2. Rendimiento de los componentes de piña variedad Golden.

Componente	<i>Golden MD-2</i>	
	Peso (g)	%(p/p)
Cáscara	0.435 ± 0.039 <sup>b</sup>	18.774 ± 0.033 <sup>b</sup>
Corazón	0.306 ± 0.052 <sup>c</sup>	13.129 ± 0.029 <sup>c</sup>
Corona	0.245 ± 0.021 <sup>c</sup>	10.595 ± 0.019 <sup>c</sup>
Pulpa	1.379 ± 0.348 <sup>a</sup>	57.502 ± 0.070 <sup>a</sup>
Total	2.364 ± 0.314	100.000 ± 0.195

Promedio ± SD de determinaciones por triplicado.

<sup>a, b, c</sup> Las diferentes letras en la misma columna indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

254

### 255 **Determinación de las propiedades fisicoquímicas**

256 La Tabla 3, presentó los resultados de los análisis fisicoquímicos de los residuos de piña.

257 Los valores obtenidos de pH (3.2 - 4.4) y acidez (0.16 - 0.43%) se deben a la presencia de  
258 los principales ácidos orgánicos de la piña como lo es el ácido cítrico y el málico Ketnawa et  
259 al. (2012), a su vez estos valores reportados son similares a los obtenidos por Ketnawa et al.  
260 (2012) y Misran et al. (2019). Sin embargo, se aclara que el fruto en su totalidad tiende con  
261 el paso de los días a aumentar su pH, por efecto del estrés provocado en la recolección,  
262 maduración por efectos de temperatura y condiciones de humedad ambiental (García et al.  
263 2011). Los °Brix de los residuos reportados son menores en comparación a la pulpa de la  
264 piña, esto debido a los azúcares (o solutos) que presenta como la sacarosa, la glucosa y la  
265 fructosa (Siti et al., 2013). Respecto a la relación del índice de madurez interna Chaurasiya  
266 y Hebbar (2013) menciona que a medida que avanza la maduración, el contenido de  
267 bromelina y la actividad enzimática disminuyen. Por otra parte (Misran et al. 2019)  
268 caracterizó el extracto de bromelina de la piña variedad Morris, reportando valores casi  
269 similares para la proteína total: cáscara (83.33 mg/ml), corazón (45.00 mg/ml), corona (36.32  
270 mg/ml) y pulpa (92.63 mg/ml). Así mismo Rico et al. (2020) señala que, en diversos estudios  
271 centrados en la extracción y purificación de bromelina, los extractos de la corona tienen un  
272 mayor contenido de proteína total y actividad enzimática, seguido por el extracto de la  
273 cáscara.

274 Esto coincide con los valores obtenidos para proteína total, sin embargo, para los valores de  
275 actividad enzimática, el extracto de cáscara fue el más alto. Cabe mencionar que la diferencia  
276 de los valores obtenidos respecto a los de otras investigaciones puede atribuirse a las  
277 diferencias en las condiciones de variedad, cultivo, la parte de la piña utilizada, otras enzimas  
278 presentes y el buffer usado en la extracción (Abilio et al., 2009; Hale et al., 2005 como se  
279 citó en Misran et al., 2019; Ketnawa et al., 2012). Por otro lado, según Umesh (2007) la  
280 actividad específica de los residuos de piña de su estudio se diferencia parcialmente a los  
281 resultados de la presente investigación a pesar de que Umesh usó el método de CDU en vez  
282 de l-tirosina, obteniendo una actividad específica de 40,32 CDU/mg para el corazón;10,22  
283 CDU/mg para la cáscara; 49,41 CDU/mg para la corona y 14,72 CDU/mg para la pulpa,  
284 valores parcialmente diferentes a los resultados de la tabla 3 en el que se observan 63,219  
285 CDU/mg para el corazón; 36.459 CDU/mg para la cáscara; 25.196 CDU/mg para la corona  
286 y 25.126 CDU/mg para la pulpa. Esto se debe a que las piñas son de diferente lugar de  
287 procedencia.

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305 Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los residuos de piña variedad Golden.

Propiedad Fisicoquímica	Componente Vegetal			
	Corazón (%)	Cáscara (%)	Corona (%)	Pulpa (%)
Humedad (%)	83.992 ± 0.755 <sup>a</sup>	86.795 ± 0.067 <sup>ab</sup>	79.980 ± 0.519 <sup>c</sup>	87.821 ± 1.633 <sup>b</sup>
pH	3.607 ± 0.005 <sup>b</sup>	3.850 ± 0.000 <sup>c</sup>	4.363 ± 0.009 <sup>d</sup>	3.217 ± 0.005 <sup>a</sup>
Acidez (%)	0.158 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.222 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.190 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.427 ± 0.003 <sup>d</sup>
Sólidos Solubles Totales (°Brix)	10.30 ± 0.082 <sup>c</sup>	8.67 ± 0.236 <sup>b</sup>	4.47 ± 0.047 <sup>a</sup>	15.23 ± 0.047 <sup>d</sup>
Índice de Madurez Interna	65.228 ± 1.363 <sup>d</sup>	39.038 ± 0.911 <sup>c</sup>	23.513 ± 0.127 <sup>a</sup>	35.682 ± 0.220 <sup>b</sup>
Conductividad Eléctrica (us/cm)	5.52 ± 0.041 <sup>b</sup>	6.74 ± 0.067 <sup>c</sup>	9.97 ± 0.005 <sup>d</sup>	3.02 ± 0.023 <sup>a</sup>
Proteína Total (mg/ml)	53.358 ± 0.219 <sup>a</sup>	93.593 ± 0.000 <sup>b</sup>	132.436 ± 0.219 <sup>c</sup>	134.602 ± 0.438 <sup>d</sup>
Actividad Enzimática (UT/ml)	3373.264 ± 0.614 <sup>b</sup>	3412.326 ± 0.614 <sup>d</sup>	3336.806 ± 0.614 <sup>a</sup>	3381.944 ± 1.228 <sup>c</sup>
Actividad Específica (UT/mg)	63.219 ± 0.011	36.459 ± 0.013	25.196 ± 0.010	25.126 ± 0.013

Valores expresados como «Promedio ± SD» (n = 3). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según prueba de Tukey al 5% de error. %: g de ácido cítrico anhidro por cada 100 ml.

306

307 Así pues; los resultados de la concentración de proteína total (CPT), actividad enzimática  
308 (AE) y actividad específica (AS) se muestran en la Tabla 4, donde se puede observar que las  
309 respuestas variaron de 1.957 (T1) a 13.855 mg/ml (T6) para el CPT, 2.708 (T6) a 14.821 (T2)  
310 UT/ml para la AE y 0.195 (T6) a 6.279 (T1) UT/mg para la AS, pero los puntos centrales  
311 (T9, T10 y T11) presentaron los valores más altos de CPT, AE y AS en comparación con los  
312 demás ensayos, lo cual indicó la posible existencia de una curvatura.

313



314 Tabla 4. Valores reales de la matriz de Plackett and Burman ( $2^{7-4} + 3$ ) para las respuestas  $Y_1$   
 315 (CPT),  $Y_2$  (AE) y  $Y_3$  (AS)  
 316

Tratamientos	$X_1$	$X_2$ (°C)	$X_3$ (min)	$X_4$ (%)	$X_5$ (ml/100g)	$X_6$ (rpm)	$X_7$ (min)	$Y_1$ (mg/ml)	$Y_2$ (UT/ml)	$Y_3$ (UT/mg)
T1	4.5 (-1)	35 (-1)	2 (-1)	87 (+1)	150 (+1)	10000 (+1)	10 (-1)	1.957 ± 0.001 <sup>d</sup>	12.285 ± 0.163 <sup>a</sup>	6.279 ± 0.079 <sup>g</sup>
T2	7.5 (+1)	35 (-1)	2 (-1)	47 (-1)	100 (-1)	10000 (+1)	30 (+1)	10.659 ± 0.030 <sup>e</sup>	14.821 ± 0.016 <sup>e</sup>	1.391 ± 0.002 <sup>e</sup>
T3	4.5 (-1)	55 (+1)	2 (-1)	47 (-1)	150 (+1)	5000 (-1)	30 (+1)	13.755 ± 0.077 <sup>a</sup>	6.634 ± 0.026 <sup>b</sup>	0.482 ± 0.001 <sup>b</sup>
T4	7.5 (+1)	55 (+1)	2 (-1)	87 (+1)	100 (-1)	5000 (-1)	10 (-1)	13.233 ± 0.306 <sup>bc</sup>	11.546 ± 0.895 <sup>a</sup>	0.871 ± 0.047 <sup>a</sup>
T5	4.5 (-1)	35 (-1)	6 (+1)	87 (+1)	100 (-1)	5000 (-1)	30 (+1)	1.828 ± 0.049 <sup>d</sup>	5.921 ± 0.225 <sup>b</sup>	3.239 ± 0.037 <sup>f</sup>
T6	7.5 (+1)	35 (-1)	6 (+1)	47 (-1)	150 (+1)	5000 (-1)	10 (-1)	13.855 ± 0.051 <sup>a</sup>	2.708 ± 0.065 <sup>c</sup>	0.195 ± 0.004 <sup>d</sup>
T7	4.5 (-1)	55 (+1)	6 (+1)	47 (-1)	100 (-1)	10000 (+1)	10 (-1)	13.484 ± 0.028 <sup>abc</sup>	9.115 ± 0.449 <sup>d</sup>	0.676 ± 0.032 <sup>c</sup>
T8	7.5 (+1)	55 (+1)	6 (+1)	87 (+1)	150 (+1)	10000 (+1)	30 (+1)	13.152 ± 0.002 <sup>b</sup>	5.107 ± 0.167 <sup>b</sup>	0.388 ± 0.013 <sup>b</sup>
T9	6.0 (0)	45 (0)	4 (0)	67 (0)	125 (0)	7500 (0)	20 (0)	13.526 ± 0.074 <sup>abc</sup>	11.410 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.844 ± 0.004 <sup>a</sup>
T10	6.0 (0)	45 (0)	4 (0)	67 (0)	125 (0)	7500 (0)	20 (0)	13.672 ± 0.030 <sup>ac</sup>	11.357 ± 0.212 <sup>a</sup>	0.831 ± 0.014 <sup>ac</sup>
T11	6.0 (0)	45 (0)	4 (0)	67 (0)	125 (0)	7500 (0)	20 (0)	13.806 ± 0.002 <sup>a</sup>	11.914 ± 0.345 <sup>a</sup>	0.863 ± 0.025 <sup>a</sup>

Valores expresados como «Promedio ± SD» (n = 3). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa según prueba de Tukey al 5% de error.  $X_1$ : pH de extracción,  $X_2$ : Temperatura de extracción,  $X_3$ : Tiempo de licuado,  $X_4$ : Concentración de corona,  $X_5$ : Relación SE/MR (solución extractora/mezcla de residuos de piña),  $X_6$ : Velocidad de centrifugación,  $X_7$ : Tiempo de centrifugación,  $Y_1$ : Contenido de proteína total,  $Y_2$ : Actividad enzimática,  $Y_3$ : Actividad específica.

317

318 Las Tablas 5 y 6 presentan el análisis de los efectos principales sin chequear y chequeando  
 319 la curvatura, respectivamente para cada variable respuesta. Los resultados demuestran que el  
 320 CPT fue afectado más por el pH, la temperatura y la concentración de corona, notándose que  
 321 el incremento en la concentración de corona, así como, la velocidad y el tiempo de

322 centrifugación (nivel -1 para +1) conduce a la disminución del CPT, pero el incremento en  
323 el pH, el tiempo de licuado, la temperatura y la relación SE/MR provoca el aumento del CPT.  
324 Igualmente; la AS se vio influenciada en su mayoría por los mismos factores del CPT como  
325 el pH, la temperatura y la concentración de corona, donde se observó que el incremento de  
326 los factores temperatura, el pH, el tiempo de licuado y el tiempo de centrifugación (nivel -1  
327 para +1), llevó a la disminución de la AS; en cambio, el incremento de la concentración de  
328 corona, la relación SE/MR y la velocidad de centrifugación, indujo el aumento de la AS  
329 (enzima). Por ello la temperatura fue la variable que presentó menor efecto negativo porque  
330 hubo una reducción en la AS en promedio de 2.171 UT/mg al pasar de una temperatura baja  
331 (35 °C) a otra más alta (55 °C).

332 Sin embargo; la AE fue influenciada por el tiempo de licuado, la relación SE/MR y la  
333 velocidad de centrifugación. Así pues; un incremento en la temperatura, el tiempo de licuado,  
334 la relación SE/MR y el tiempo de centrifugación (nivel -1 para +1), condujo a una  
335 disminución en la AE; mientras que, un incremento en las variables pH, concentración de  
336 corona y velocidad de centrifugación provocó mayor AE. Así que; el tiempo de licuado tuvo  
337 el menor efecto negativo, porque al pasar de 2 a 6 min la actividad enzimática se reduce en  
338 promedio de 5.609 UT/ml.

339

340 Simultáneamente; se realizó “el chequeo de la curvatura” de los modelos polinomiales de  
341 primer orden a un 5 % de error ( $p < 0.05$ ), observándose significancia en la curvatura de las  
342 variables de respuesta (Y1, Y2 y Y3), incluso considerando un 1 % de error ( $p < 0.01$ ) (ver  
343 Tabla 6), debido a la disminución del error estándar, consecuentemente, el  $t_{cal}$  aumenta y las  
344 variables significativas dejan de quedar enmascaradas por el error estándar que estaba alto  
345 por causa de los puntos centrales (Rodríguez y Lemma, 2012).

346

347

348

349

350

351

352 Tabla 5. Estimación de los efectos principales para las respuestas Y1 (CPT), Y2 (AE) y Y3  
 353 (AS) [sin chequear la curvatura].

Factor	Contenido de Proteína Total (CPT)				Actividad Enzimática (AE)				Actividad Específica (AS)			
	Efecto	Error	t(13)	Valor p	Efecto	Error	t(13)	Valor p	Efecto	Error	t(13)	Valor p
Media/Intercepto	11.175*	0.033	342.393	0.000*	9.347*	0.101	92.317	0.000*	1.460*	0.009	156.454	0.000*
(1) X <sub>1</sub>	4.969*	0.077	64.915	0.000*	0.057	0.237	0.239	0.815	1.957*	0.022	-89.453	0.000*
(2) X <sub>2</sub> (°C)	6.331*	0.077	82.717	0.000*	-0.834*	0.237	-3.510	0.004*	-2.171*	0.022	-99.226	0.000*
(3) X <sub>3</sub> (min)	0.679*	0.077	8.867	0.000*	-5.609*	0.237	23.621	0.000*	-1.131*	0.022	-51.693	0.000*
(4) X <sub>4</sub> (%)	-5.396*	0.077	-70.495	0.000*	0.395	0.237	1.665	0.120	2.008*	0.022	91.772	0.000*
(5) X <sub>5</sub> (ml/100g)	0.879*	0.077	11.482	0.000*	-3.667*	0.237	15.444	0.000*	0.292*	0.022	13.348	0.000*
(6) X <sub>6</sub> (rpm)	-0.855*	0.077	-11.171	0.000*	3.629*	0.237	15.284	0.000*	0.986*	0.022	45.077	0.000*
(7) X <sub>7</sub> (min)	-0.784*	0.077	-10.239	0.000*	-0.793*	0.237	-3.339	0.005*	-0.630*	0.022	-28.811	0.000*

X<sub>1</sub>: pH de extracción, X<sub>2</sub>: Temperatura de extracción, X<sub>3</sub>: Tiempo de licuado, X<sub>4</sub>: Concentración de corona, X<sub>5</sub>: Relación SE/MR (solución extractora/mezcla de residuos de piña), X<sub>6</sub>: Velocidad de centrifugación, X<sub>7</sub>: Tiempo de centrifugación, En rojo: Términos significativos bajo un  $\alpha = 0.05$ .

354

355 Tabla 6. Estimación de los efectos principales para las respuestas Y1 (CPT), Y2 (AE) y Y3  
 356 (AS) [chequeando la curvatura]

Factor	Contenido de Proteína Total (CPT)				Actividad Enzimática (AE)				Actividad Específica (AS)			
	Efecto	Error	t(13)	Valor p	Efecto	Error	t(13)	Valor p	Efecto	Error	t(13)	Valor p
Media/Intercepto	10.240	0.038	267.568	0.000	8.517	0.119	71.737	0.000	1.690	0.011	154.473	0.000
Curvatura	<b>6.855</b>	<b>0.147</b>	<b>46.771</b>	<b>0.000</b>	<b>6.086</b>	<b>0.455</b>	<b>13.386</b>	<b>0.000</b>	<b>-1.689</b>	<b>0.042</b>	<b>-40.304</b>	<b>0.000</b>
(1) X <sub>1</sub>	4.969	0.077	64.915	0.000	0.057	0.237	0.239	0.815	-1.957	0.022	-89.453	0.000
(2) X <sub>2</sub> (°C)	6.331	0.077	82.717	0.000	-0.834	0.237	-3.510	0.004	-2.171	0.022	-99.226	0.000
(3) X <sub>3</sub> (min)	0.679	0.077	8.867	0.000	-5.609	0.237	23.621	0.000	-1.131	0.022	-51.693	0.000
(4) X <sub>4</sub> (%)	-5.396	0.077	-70.495	0.000	0.395	0.237	1.665	0.120	2.008	0.022	91.772	0.000
(5) X <sub>5</sub> (ml/100g)	0.879	0.077	11.482	0.000	-3.667	0.237	15.444	0.000	0.292	0.022	13.348	0.000
(6) X <sub>6</sub> (rpm)	-0.855	0.077	-11.171	0.000	3.629	0.237	15.284	0.000	0.986	0.022	45.077	0.000
(7) X <sub>7</sub> (min)	-0.784	0.077	-10.239	0.000	-0.793	0.237	-3.339	0.005	-0.630	0.022	-28.811	0.000

X<sub>1</sub>: pH de extracción, X<sub>2</sub>: Temperatura de extracción, X<sub>3</sub>: Tiempo de licuado, X<sub>4</sub>: Concentración de corona, X<sub>5</sub>: Relación SE/MR (solución extractora/mezcla de residuos de piña), X<sub>6</sub>: Velocidad de centrifugación, X<sub>7</sub>: Tiempo de centrifugación, En rojo: Términos significativos bajo un  $\alpha = 0.05$ .

357

358 Así mismo; el grado de influencia de los factores sobre las variables (Y<sub>1</sub>) CPT, (Y<sub>2</sub>) AE y  
 359 (Y<sub>3</sub>) AS se midió y evaluó con la ayuda de suma de cuadrados del error (SS) a un nivel de

360 significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Por ejemplo; las variables independientes que generaron  
361 mejor influencia en el contenido de proteína total fueron (1) temperatura de extracción ( $SS =$   
362  $160.347$ ), (2) concentración de corona ( $SS = 116.465$ ) y (3) pH de extracción ( $SS = 98.757$ ).  
363 De igual manera; estos mismos factores causaron efecto significativo a la actividad  
364 específica, pero el orden de mayor a menor impacto fue la siguiente: (1) pH ( $SS = 15.327$ ),  
365 (2) temperatura ( $SS = 18.859$ ) y (3) concentración de corona ( $SS = 16.132$ ). En cambio; la  
366 actividad enzimática mostró más diferencias significativas por parte de las variables (1)  
367 tiempo de licuado ( $SS = 125.840$ ), (2) relación SE/MR ( $SS = 53.793$ ) y (3) velocidad de  
368 centrifugación ( $SS = 52.689$ ), conforme a él orden mencionado. Por lo tanto; las variables  
369 con mayor influencia significativa ( $p < 0.05$ ) fueron aquellas que tuvieron valores de  $SS$  más  
370 grandes y los resultados se compararon con los obtenidos en el diagrama de Pareto, donde se  
371 detectó tres efectos importantes y cuatro despreciables para cada variable de respuesta.  
372 (Misran et al. 2019).

373 Al mismo tiempo; la evaluación de la existencia de curvatura en las respuestas  $Y1$  ( $p =$   
374  $0.0000$ ),  $Y2$  ( $p = 0.0000$ ) y  $Y3$  ( $p = 0.0000$ ) se realizó también durante el análisis de varianza  
375 (ANOVA) a un nivel de significancia del 5 % ( $p < 0.$ ) (ver Tabla 8), porque los resultados en  
376 las condiciones de los puntos centrales presentaron valores superiores a diferencia de los  
377 otros tratamientos, sugiriendo una curvatura. A pesar de ello; no se logró detectar cuál es el  
378 factor que tiene curvatura (Rodriguez y Lemma, 2012).

379 Por otro lado; sabemos que en delineamientos de selección de variables fue posible evaluar  
380 únicamente los efectos principales, pues no tuvimos grados de libertad para interacciones o  
381 términos cuadráticos presentes en la ecuación de regresión, ya que no realizamos suficientes  
382 ensayos para esas determinaciones (Rodriguez y Lemma, 2012).

383

384

385

386

387

388

389 Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) para las respuestas Y<sub>1</sub> (CPT), Y<sub>2</sub> (AE) y Y<sub>3</sub> (AS)  
 390 [sin chequear la curvatura].

Factor	<sup>a</sup> GL	Contenido de Proteína Total (CPT)		Actividad Enzimática (AE)		Actividad Especifica (AS)	
		<sup>b</sup> SS	<i>p</i>	SS	<i>p</i>	SS	<i>p</i>
(1) X <sub>1</sub>	1	98.757	0.0000	0.013	0.8148	15.327	0.0000
(2) X <sub>2</sub> (°C)	1	160.347	0.0000	2.779	0.0038	18.859	0.0000
(3) X <sub>3</sub> (min)	1	1.842	0.0000	125.840	0.0000	5.118	0.0000
(4) X <sub>4</sub> (%)	1	116.465	0.0000	0.625	0.1199	16.132	0.0000
(5) X <sub>5</sub> (ml/100g)	1	3.090	0.0000	53.793	0.0000	0.341	0.0000
(6) X <sub>6</sub> (rpm)	1	2.925	0.0000	52.689	0.0000	3.892	0.0000
(7) X <sub>7</sub> (min)	1	2.457	0.0000	2.514	0.0053	1.590	0.0000
Falta de ajuste ( <i>Lack of fit</i> )	1	51.267	0.0000	40.411	0.0000	3.112	0.0000
Error puro ( <i>Error pure</i> )	13	0.305		2.932		0.025	
Total SS ( <i>SS<sub>Total</sub></i> )	21	437.455		281.597		64.397	
Variabilidad explicada ( <i>R<sup>2</sup></i> )		0.8821		0.8461		0.9513	
R <sup>2</sup> Ajustado ( <i>R<sup>2</sup><sub>Ajust</sub></i> )		0.8232		0.7691		0.9269	

<sup>a</sup>GL: Grados de libertad, <sup>b</sup>SS: Suma de cuadrados, X<sub>1</sub>: pH de extracción, X<sub>2</sub>: Temperatura de extracción, X<sub>3</sub>: Tiempo de licuado, X<sub>4</sub>: Concentración de corona, X<sub>5</sub>: Relación SE/MR (solución extractora/mezcla de residuos de piña), X<sub>6</sub>: Velocidad de centrifugación, X<sub>7</sub>: Tiempo de centrifugación, En rojo: Términos significativos bajo un  $\alpha = 0.05$ .

391 Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para las respuestas Y<sub>1</sub> (CPT), Y<sub>2</sub> (AE) y Y<sub>3</sub> (AS)  
 392 [sin chequear la curvatura].  
 393  
 394

Factor	<sup>a</sup> GL	Contenido de Proteína Total (CPT)		Actividad Enzimática (AE)		Actividad Especifica (AS)	
		<sup>b</sup> SS	<i>p</i>	<sup>b</sup> SS	<i>p</i>	<sup>b</sup> SS	<i>p</i>
Curvatura	1	51.267	0.0000	40.411	0.0000	3.112	0.0000
(1) X <sub>1</sub>	1	98.757	0.0000	0.013	0.8148	15.327	0.0000
(2) X <sub>2</sub> (°C)	1	160.347	0.0000	2.779	0.0038	18.859	0.0000
(3) X <sub>3</sub> (min)	1	1.842	0.0000	125.840	0.0000	5.118	0.0000
(4) X <sub>4</sub> (%)	1	116.465	0.0000	0.625	0.1199	16.132	0.0000
(5) X <sub>5</sub> (ml/100g)	1	3.090	0.0000	53.793	0.0000	0.341	0.0000
(6) X <sub>6</sub> (rpm)	1	2.925	0.0000	52.689	0.0000	3.892	0.0000
(7) X <sub>7</sub> (min)	1	2.457	0.0000	2.514	0.0053	1.590	0.0000
Error puro ( <i>Error pure</i> )	13	0.305		2.932		0.025	
Total SS ( <i>SS<sub>Total</sub></i> )	21	437.455		281.597		64.397	
Variabilidad explicada ( <i>R<sup>2</sup></i> )		0.9993		0.9896		0.9996	
R <sup>2</sup> Ajustado ( <i>R<sup>2</sup><sub>Ajust</sub></i> )		0.9989		0.9832		0.9994	

<sup>a</sup>GL: Grados de libertad, <sup>b</sup>SS: Suma de cuadrados, X<sub>1</sub>: pH de extracción, X<sub>2</sub>: Temperatura de extracción, X<sub>3</sub>: Tiempo de licuado, X<sub>4</sub>: Concentración de corona, X<sub>5</sub>: Relación SE/MR (solución extractora/mezcla de residuos de piña), X<sub>6</sub>: Velocidad de centrifugación, X<sub>7</sub>: Tiempo de centrifugación, En rojo: Términos significativos bajo un  $\alpha = 0.05$ .

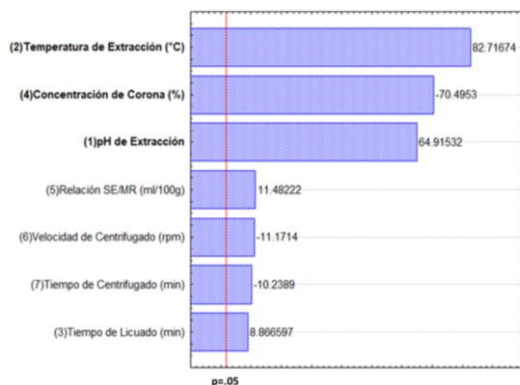
395  
 396  
 397 Las Figura 4, 5 y 6 muestran el “Diagrama de Pareto de Efectos Estandarizados” para las  
 398 respuestas Y<sub>1</sub> (CPT), Y<sub>2</sub> (AE) y Y<sub>3</sub> (AS), observándose que solo aquellas columnas que  
 399 lograron cruzar la línea vertical roja presentaron significancia a un nivel de confiabilidad del

400 95% ( $p < 0.05$ ). Así mismo, el tamaño de las barras fue proporcional al efecto sobre las  
401 respuestas de acuerdo con lo mencionado por Nadzirah (2012).

402 Se observa en la Figura 4 prácticamente; las columnas con mayor longitud representaron los  
403 factores que generaron mayor efecto significativo sobre el CPT (pH, temperatura y  
404 concentración de corona), coincidiendo con lo señalado por Chaurasiya y Hebbar (2013),  
405 hubo un aumento en el contenido de proteína de 11,77 a 13,10 mg / ml con el aumento del  
406 pH de 5,7 a 8.0 durante la extracción de bromelina utilizando un tampón de fosfato de sodio,  
407 sin embargo indicaron que el efecto de la temperatura del tampón durante la extracción sobre  
408 la actividad de la bromelina y el contenido de proteína no era significativo y no hay necesidad  
409 de llevar a cabo la extracción bajo condiciones de frío.

410 En la Figura 5 y 6 se observa los factores con mayor efecto significativo para la AE (tiempo  
411 de licuado, relación SE/MR y velocidad de centrifugación) y la AS (pH, temperatura y  
412 concentración de corona) respectivamente. Chaurasiya y Hebbar (2013) mencionan que la  
413 actividad de la bromelina y la actividad específica aumentaba a medida que el pH del tampón  
414 de extracción llega a 7,0 y posteriormente tiene tendencia decreciente.

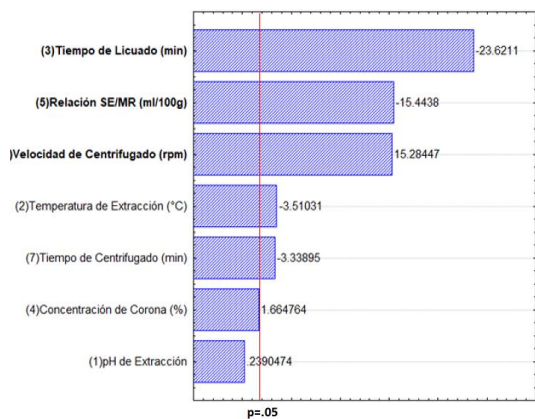
415 Cabe mencionar que la comparación de estas propiedades con otras descritas no siempre es  
416 posible, ya que varios de estos usan otros métodos de extracción o no presentan los mismos  
417 parámetros.



418

419

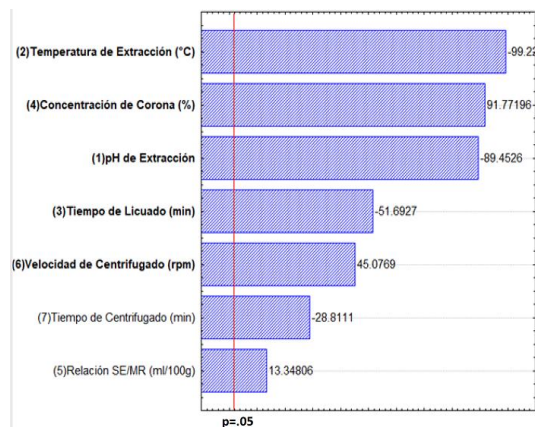
420 Figura 4. Diagrama de Pareto de Efectos para la respuesta  $Y_1$  (CPT)



421

422

423 Figura 5. Diagrama de Pareto de Efectos para la respuesta  $Y_2$  (AE)



424

425 Figura 6. Diagrama de Pareto de Efectos para la respuesta  $Y_3$  (AS)

## 426 Conclusiones

427 Los parámetros de extracción que presentaron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el  
 428 contenido de proteína total (CPT) fueron lo del tratamiento 6 (T6) el pH, temperatura y  
 429 concentración de corona, además hubo una interacción entre estos factores para dar más  
 430 rendimiento de proteína total, así mismo, el pH de extracción influyó en la concentración de  
 431 corona. Por lo tanto; el máximo (CPT) se logró con 47 % de corona, a 35 °C de temperatura  
 432 y pH 7.5 que a su misma vez fueron los parámetros que tuvieron un mayor efecto  
 433 significativo.

434 Para la actividad enzimática (AE) el tratamiento 2 (T2) que tuvo los parámetros significativos  
 435 fueron el tiempo de licuado (2 minutos), relación SE/MR (100 ml) y velocidad de  
 436 centrifugación (10000 rpm), cabe señalar que no hubo una interacción entre los factores de

437 pH y % de corona; por otro lado el máximo (AE) se logró con 100 ml de solución extractora,  
438 2 min de licuado y 10 000 rpm de centrifugado.

439 Para la actividad específica (AS) los parámetros que influyeron significativamente fueron del  
440 tratamiento 1 (T1) cuyos parámetros significativos fueron temperatura de extracción 35 °C,  
441 concentración de corona 87 % , pH de extracción 4.5 , tiempo de licuado 2 min, velocidad de  
442 centrifugado 10000 rpm cabe mencionar que hubo interacción significativa entre todos los  
443 parámetros estudiados.

444 En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, se resalta que el índice de madurez interna  
445 presenta una relación inversa respecto al contenido de bromelina y la actividad enzimática.  
446 Además, la cáscara resultó ser el subproducto con mayor cantidad de proteína total, actividad  
447 enzimática y ser uno de los componentes de mayor rendimiento.

448 Esta investigación sirve como base para una investigación en profundidad sobre la  
449 optimización de los factores de extracción de bromelina a partir de residuos de piña

#### 450 **Referencias bibliográficas**

451 Abdel-Fattah, Y., Soliman, N., Yousef, S., & El-Helow, E. (2012). Application of  
452 experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable  
453 lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1 [Aplicación de diseños  
454 experimentales para optimizar la composición del medio para la producción de  
455 lipasa/esterasa termoestable por *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1]. *Revista de*  
456 *Ingeniería Genética y Biotecnología*, 10(2), 193-200.  
457 <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.08.001>

458 Abilio, G., Holschuh, H., Bora, P., & de Oliveira, E. (2009). Extraction, bromelain activity  
459 and analysis of some chemical parameters in pineapple varieties from Paraíba  
460 [Extracción, actividad de bromelina y análisis de algunos parámetros químicos en  
461 variedades de piña de Paraíba]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(4), 1117-1121.  
462 <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000400027>

463 AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (2005).  
464 Determinación de pH, método del potenciómetro.



465 AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (2016).  
466 Determinación de Acidez.

467 AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (1980).  
468 Determinación de solidos solubles totales mediante el metodo del refractometro.

469 AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (1966).  
470 Determinación de conductividad electrica mediante conductimetro.

471 Arshad, Z. I., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain:  
472 an overview of industrial application and purification strategies [Bromelina: una visión  
473 general de la aplicación industrial y las estrategias de purificación]. *Applied*  
474 *microbiology and biotechnology*, 98(17), 7283–7297. [https://doi.org/10.1007/s00253-](https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y)  
475 014-5889-y

476 Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., & Arora, B. (2018). Valorisation of pineapple wastes  
477 for food and therapeutic applications [Valorización de los residuos de la piña para  
478 aplicaciones alimentarias y terapéuticas]. *Trends in Food Science & Technology*, 82,  
479 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.024>

480 Banerjee, S., Arora, A., Vijayaraghavan, R., & Patti, A. F. (2020). Extraction and  
481 crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from  
482 pineapple processing waste. *International journal of biological macromolecules*, 158,  
483 318-326. Obtenido de  
484 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020330865>

485 Chaurasiya, R., & Hebbar, U. (2013). Extraction of bromelain from pineapple core and  
486 purification by RME and precipitation methods [Extracción de bromelina del núcleo de  
487 la piña y purificación por métodos de RME y precipitación]. *Separation and*  
488 *Purification Technology*, 111, 90-97. Obtenido de  
489 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.029>

490 Enzyme Development Corporation. (2017). EDC. *Protease Assay (PC)* [Ensayo de proteasas  
491 (PC)]. Obtenido de [https://www.enzymedevelopment.com/wp-](https://www.enzymedevelopment.com/wp-content/uploads/2020/07/Protease-Assay-PC.pdf)  
492 [content/uploads/2020/07/Protease-Assay-PC.pdf](https://www.enzymedevelopment.com/wp-content/uploads/2020/07/Protease-Assay-PC.pdf)

- 493 FAO/STAT. (2018). *Statistical Division of the UN Food and Agriculture Organization*  
494 (FAO). Obtenido de <http://faostat.fao.org/The FAO/STAT's homepage>
- 495 García, Y., Pérez, J., García, A., & Hernández, A. (2011). Determinación de las propiedades  
496 de calidad de la piña (*Ananas Comosus*) variedad Cayena Lisa almacenada a  
497 temperatura ambiente. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 20(1), 62-65.  
498 Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93218850011>
- 499 Haaland, P. (1989). *Experimental Design in Biotechnology [Diseño experimental en*  
500 *biotecnología]*. Marcel Dekker.
- 501 Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M., Báez, R., Morris, H., Santos, R., & Chávez, M.  
502 d. (2005). Obtención de Preparados Enzimáticos a Partir de Tallos de Piña (*Ananas*  
503 *Comosus*) con Potencialidades de uso en la Biotecnología y la Medicina. *Revista CENIC*  
504 *Ciencias Biológicas*, 36, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
- 505 Jayasree, D., Narasu, L., & Merugu, R. (2016). Plackett-Burman design for screening media  
506 components for alkaline protease production from *Streptomyces pulveraceus* through  
507 solid state fermentation [Diseño de Plackett-Burman para el cribado de componentes  
508 del medio para la producción de proteasas alca]. *Journal of Chemical and*  
509 *Pharmaceutical Research*, 8(1), 763-769. Obtenido de  
510 [https://www.jocpr.com/articles/plackettburman-design-for-screening-media-](https://www.jocpr.com/articles/plackettburman-design-for-screening-media-components-for-alkaline-protease-production-from-streptomyces-pulveraceus-thro.pdf)  
511 [components-for-alkaline-protease-production-from-streptomyces-pulveraceus-thro.pdf](https://www.jocpr.com/articles/plackettburman-design-for-screening-media-components-for-alkaline-protease-production-from-streptomyces-pulveraceus-thro.pdf)
- 512 Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2011). Extraction of bromelain from pineapple  
513 peels [Extracción de bromelina de las cáscaras de piña]. *Food science and technology*  
514 *international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional*, 17(4), 395-402.  
515 <https://doi.org/10.1177/1082013210387817>
- 516 Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for  
517 bromelain [Residuos de piña: Una fuente potencial para la extracción de bromelina  
518 extracción de bromelina]. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 385-391.  
519 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>
- 520 Khan, I., & Abourashed, E. (2009). *Leung's encyclopedia of common natural ingredients:*  
521 *Used in food, drugs and cosmetics [Enciclopedia de ingredientes naturales comunes de*

522 *Leung: Utilizados en Alimentos, Medicamentos y Cosméticos*. Nueva York: John Wiley  
523 & Sons.

524 Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in  
525 biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry  
526 [Novedades en el biopotencial de los subproductos hortofrutícolas aplicados a la  
527 industria alimentaria]. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 150-159.  
528 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>

529 Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use [Bromelina:  
530 bioquímica, farmacología y uso médico]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58,  
531 1234-1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936H>

532 Misran, E., Idris, A., Mat Sarip, S. H., & Ya'akob, H. (2019). Properties of bromelain extract  
533 from different parts of the pineapple variety [Propiedades del extracto de bromelina de  
534 diferentes partes de la variedad de piña Morris]. *Biocatalysis and Agricultural  
535 Biotechnology*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101095>

536 Mohan, R., Sivakumar, V., & Muralidharan, C. (2016). Optimisation of bromelain enzyme  
537 extraction from pineapple (*Ananas comosus*) and application in process industry  
538 [Optimización de la extracción de la enzima bromelina de la piña (*Ananas comosus*) y  
539 su aplicación en el proceso Industria]. *American Journal of Biochemistry and  
540 Biotechnology*, 12(3), 188-195. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2016.188.195>

541 Nadzirah, K. Z., Zainal, S., Noriham, A., Normah, I., & Roha, A. S. (2012). Physico-chemical  
542 properties of pineapple crown extract variety N36 and bromelain activity in different  
543 forms [Propiedades físico-químicas de la variedad de extracto de corona de piña N36 y  
544 actividad de la bromelina en diferentes formas]. *APCBEE Procedia*, 4, 130-134.  
545 <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.022>

546 Nor, M., Ramchandran, L., & Vasiljevic, T. (2015). Characteristic properties of crude  
547 pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing  
548 [Propiedades características del extracto crudo de residuos de piña para la purificación  
549 de la bromelina por procesamiento de membranas]. *Journal of Food Science and  
550 Technology*, 52, 7103-7112. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1812-5>

- 551 Omotoyinbo, O., & Sanni, D. (2017). Characterization of bromelain from parts of three  
552 different pineapple varieties in Nigeria [Caracterización de la bromelina de partes de  
553 tres variedades de variedades de piña en Nigeria]. *American Journal of BioScience*, 5(3),  
554 35-41. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20170503.11>
- 555 Plackett, R., & Burman, J. (1946). The design of optimum multifactorial experiments [El  
556 diseño de experimentos multifactoriales óptimos]. *Biometrika*, 33(4), 305-325.  
557 <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
- 558 Ramli, A. N., Aznan, T. N., & Illias, R. M. (2017). Bromelain: From production to  
559 commercialisation [Bromelina: De la producción a la comercialización]. *Journal of the*  
560 *science of food and agriculture*, 97(5), 1386–1395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8122>
- 561 Rico, X., Gullón, B., Alonso, J. L., & Yáñez, R. (2020). Recovery of high value-added  
562 compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products:  
563 An overview [Recuperación de compuestos de alto valor añadido a partir de  
564 subproductos del procesado de piña, melón, sandía y calabaza: Una visión general].  
565 *Food Research International*, 132(4).  
566 <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>
- 567 Rodriguez, M., & Lemma, A. (2012). *Diseño experimental y optimización de procesos*. Casa  
568 do Espírito Amigo Fraternidad Fé e Amor.
- 569 Rowan, A. D., Buttle, D. J., & Barrett, A. J. (1990). The cysteine proteinases of the pineapple  
570 plant [Las cisteína proteinasas de la planta de la piña]. *The Biochemical journal*, 266(3),  
571 869–875.
- 572 Sengupta, S., & Dasgupta, M. (2006). ENZYMOLOGY Industrial and clinical applications  
573 excluding diagnostic clinical enzymology [ENZIMOLOGÍA Aplicaciones industriales  
574 y clínicas excluyendo la enzimología clínica de diagnóstico]. *Enzymology*, 1, 1-25.
- 575 Shehadul, M., Aryasomayaj, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale  
576 and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3), 83. Obtenido  
577 <https://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83/htm>
- 578 Siti, A., Zainal, S., Noriham, A., & Nadzirah, K. (2013). Determination of sugar content in

579 pineapple waste variety N36 [Determinación del contenido de azúcar en los residuos de  
580 piña variedad N36]. *International Food Research Journal*, 20(4), 1941-1943. Obtenido  
581 de  
582 [http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20\(04\)%202013/61%20IFRJ%2020%20\(04\)%202013%20Zainal%20UiTM%20\(063\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(04)%202013/61%20IFRJ%2020%20(04)%202013%20Zainal%20UiTM%20(063).pdf)  
583

584 Uhlig, H. (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications [Enzimas industriales y sus*  
585 *aplicaciones]*. New York: John Wiley & Sons.

586 Walsh, G. (2002). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology [Proteínas: Bioquímica y*  
587 *Biología]*. New York: John Wiley and Sons.

588

589 Wu, Y., Cui, S., Tang, J., & Gu, X. (2007). Optimization of extraction process of crude  
590 polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology  
591 [Optimización del proceso de extracción de polisacáridos crudos a partir de semillas de  
592 esterculia de bote mediante la metodolog]. *Food Chemistry*, 105(4), 1599-1605.  
593 <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.066>Get rights and content