



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Por

Oscar Isaí Ramírez Serrano

Ingeniero Biotecnólogo

**Separación de proteínas con actividad proteolítica de *Bromelia karatas*. L  
("chom") por extracción líquido-líquido.**

Dirigida por

Dra. María del Carmen Oliver Salvador

M. en C. Roberto Briones Martínez

México, D.F. diciembre de 2012



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Diciembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

"Separación de proteínas con actividad proteolítica de Bromelia karatas. L ("chom") por extracción líquido-líquido"

Presentada por el alumno:

Ramírez Serrano Oscar Isaí  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

A	1	1	0	3	0	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

Director de tesis  
  
Dra. María del Carmen Oliver Salvador



Director de tesis  
  
M. en C. Roberto Briones Martínez

Dr. Jorge Yáñez Fernández

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 4 del mes de diciembre del año 2012, el que suscribe Oscar Isaí Ramírez Serrano alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A110306, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. María del Carmen Oliver Salvador y M. en C. Roberto Briones Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado "Separación de proteínas con actividad proteolítica de Bromelia karatas. L ("chom") por extracción liquido-liquido", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección : centinela\_raso@hotmail.com, rbrionesmartinez@gmail.com, oliveripn@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



---

Oscar Isaí Ramírez Serrano

## Declaración de originalidad.

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



---

Ramírez Serrano Oscar Isai



Vo. Bo. Dra. María Del Carmen Oliver Salvador



Vo. Bo. M en C. Roberto Briones Martínez

La tesis “Separación de proteínas con actividad proteolítica de *Bromelia karatas*. L (“chom”) por extracción líquido-líquido.” fue realizada en el Laboratorio de Enzimas Vegetales (LENZIVEG) del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) y el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y el M. en C. Roberto Briones Martínez.

La investigación fue financiada por los proyectos: “*Aprovechamiento industrial de especies vegetales de Campeche. Procesos de Bioseparación para la obtención de enzimas y subproductos*”, FOMIX-GOB CAMP-CONACYT No. 126515; “*Agroindustrias no tradicionales basadas en el aprovechamiento de la biodiversidad florística de México.- Plantas multipropósito de Bromelia y Carica*”, SIP 20100285; y “*Proteínas y polisacáridos de especies de Bromelia y Aloe. Estudios de separación mediante ultrafiltración de flujo tangencial*”. SIP 20110005, dirigidos por el M. en C. Roberto Briones Martínez.

Agradezco al CONACyT por haberme otorgado una beca con la cual pude culminar la presente investigación.

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme continuar con mi formación académica.

Diciembre 2012

## **Agradecimientos.**

Agradezco especialmente a Dios que me dio la sabiduría y entendimiento además de la vida para realizar éste proyecto y terminarlo exitosamente.

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y preparación profesional, por sus consejos y ánimos.

A mi director de tesis el M en C Roberto Briones Martínez, por su ayuda, guía, apoyo y por transmitir sus conocimientos tanto teóricos como experimentales en el maravilloso mundo de la enzimología, por su paciencia, enseñanza y apoyo durante mi formación como maestro en ciencias y profesionista además de brindarme su amistad y confianza para poder realizar éste trabajo bajo su dirección.

A mi directora de tesis Dra. Carmen Oliver Salvador, por sus consejos, guía, apoyo y asesorías a lo largo de toda mi formación como maestro en ciencias.

Agradezco a la M en C. Isabel Cortes, por sus consejos y asesorías, su paciencia y apoyo tanto en lo experimental como en lo profesional.

A la Dra. Olivia Franco por su increíble ayuda, préstamo de equipo y asesoría para la realización de las pruebas de índice de refracción.

A mis compañeros de laboratorio Guillermo Garibay, Octavio Gómez Montes, Oscar Montiel por su apoyo, ayuda y consejos.

A mis amigos y compañeros de posgrado en UPIBI, por su apoyo, amistad y ayuda.

## Resumen.

*Bromelia karatas* es una planta silvestre nativa de México que se encuentra principalmente en el sureste de México, donde se le conoce con el nombre maya de "chom". Se estudió la separación por extracción bifásica acuosa (EBA) de las proteínas con actividad proteolítica de *B. karatas* analizando comparativamente el efecto de dos pesos moleculares de polietilenglicol (PEG), 1450 y 6000, en la partición. Se obtuvieron los diagramas de fases del sistema polietilenglicol (PEG)-fosfato de potasio (F-P) y las ecuaciones fueron ajustadas al modelo de Merchuck con un coeficiente de correlación de 0.99. Con base en la información obtenida de los diagramas de fase se ensayó la EBA del extracto de *B.karatas* (134.55 UT/mL de actividad caseinolítica) utilizando un diseño experimental de superficie de respuesta con un modelo central compuesto. Con el fin de conocer las mejores condiciones de extracción enzimática se analizaron cinco respuestas: el factor de purificación (en cada fase), el rendimiento, la constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE), la constante de partición con respecto a la concentración de proteína (KP) y la actividad proteolítica recuperada en cada fase.

En la fase superior, el valor máximo del factor de purificación fue de 2.0 y se obtuvo con un sistema compuesto por 22 % (p/p) de PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P; mientras que el valor mínimo, 0.97, se presentó con la composición de 18 % (p/p) PEG-1450 y 25 % (p/p) F-P. En la fase inferior, el factor de purificación máximo, 4.2, se obtuvo con 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P; en tanto que el mínimo, 1.6, se observó con 18 % PEG-1450 y 25 % (p/p) F-P. El rendimiento de recuperación enzimática global más alto fue 84.9 % y se obtuvo con la composición 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P, y el mínimo, de 52.5 %, con 18 % (p/p) PEG-1450 y 25 % (p/p) F-P. La constante de partición KE tuvo un valor máximo de 1.3 con 22 % (p/p) PEG-1450 y 15 % (p/p) F-P, mientras que el valor mínimo, 0.66, se determinó con 18 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P. La constante de partición KP de 2.81 se obtuvo como máximo utilizando 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P, mientras que el valor mínimo fue de 1.54 con 18 % (p/p) PEG-1450 y 15 % (p/p) F-P. En la fase superior la actividad proteolítica recuperada fue de 80.3 % utilizando 22 % PEG-6000 y 25 % F-P, el valor mínimo de 36.6 %, fue con 18 % PEG-1450 y 25 % F-P, En tanto que en la fase inferior, la máxima recuperación fue de 33.4 % utilizando 18 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P y la mínima, de 20 %, se presentó con 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P.

Finalmente, la optimización indicó que las condiciones con las que se obtiene la mejor recuperación enzimática son PEG-6000 al 22 % (p/p) y 25 % (p/p) de fosfato de potasio, resultando en un rendimiento de recuperación enzimática del 85 %, constante de partición KE y KP de 1.22 y 2.8, respectivamente, y la actividad proteolítica recuperada del 80.3 % en la fase superior y 20 % en la fase inferior.

## Abstract.

*Bromelia karatas* is a wild plant native to Mexico that is found primarily in southeastern Mexico, where he was known Mayan "chom". Separation was studied by aqueous two-phase extraction (EBA) of proteins with proteolytic activity of *B. karatas* comparatively analyzing the effect of two molecular weight polyethylene glycol (PEG), 1450 and 6000, in the partition. We obtained the phase diagrams of the system polyethylene glycol (PEG)-potassium phosphate (P-P) and the equations were adjusted Merchuck model with a correlation coefficient of 0.99. Based on the information obtained from the phase diagrams EBA assayed *B. karatas* extract (134.55 UT / mL of caseinolytic activity) using an experimental design response surface model with a central composite. In order to meet the best conditions for enzymatic extraction five responses analyzed: the purification factor (each phase), the yield, the partition constant with respect to enzyme activity (KE), the partition constant with respect to protein concentration (KP) and the proteolytic activity in each phase recovered.

In the top phase, the maximum value of purification factor was 2.0 was obtained with a system consisting of 22 % (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P, while the minimum value, 0.97, was presented with the composition of 18% (w / w) PEG-1450 and 25% (w / w) P-P. In the bottom phase, the maximum purification factor, 4.2, was obtained with 22% (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P, while the minimum, 1.6, was observed with 18% PEG -1450 and 25% (w / w) P-P. The highest enzymatic recovery global yield was 84.9% and was obtained with the composition 22% (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P, and the minimum of 52.5%, with 18% (w / w) PEG -1450 and 25% (w / w) P-P. The partition constant KE had a maximum value of 1.3 with 22% (w / w) PEG-1450 and 15% (w / w) P-P, while the minimum value, 0.66, was determined with 18% (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P. The partition constant KP of 2.81 was obtained using maximum 22% (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P, while the minimum value was 1.54 with 18% (w / w) PEG-1450 and 15% (w / w) PP. In the top phase recovered activity was 80.3% using 22% PEG-6000 and 25% P-P, the minimum value of 36.6 %, was 18 % PEG-1450 and 25% P-P While in the bottom phase, the maximum recovery was 33.4 % using 18 % (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P and the minimum of 20%, was 22% (w / w) PEG-6000 and 25% (w / w) P-P.

Finally, said optimizing the conditions that yields the best enzymatic recovery are PEG-6000 to 22% (w / w) and 25% (w / w) potassium phosphate, resulting in a enzymatic recovery yield of 85%, and KE partition constant KP of 1.22 and 2.8, respectively, and 80.3% of the recovered activity in the top phase and 20% in the bottom phase.



## Índice general

Acta de revisión de tesis .....	i
Declaración de originalidad .....	iii
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de Figuras .....	x
Índice de Cuadros.....	xi
1. Introducción.....	1
1.1 Las enzimas.....	1
1.2 Procesos industriales en los que se aplican enzimas.....	2
1.3 Mercado actual de las enzimas.....	4
1.4 Enzimas proteolíticas de origen vegetal usados a nivel industrial.....	4
2. Proteasas de Bromeliáceas mexicanas.....	6
2.1 Potencial industrial de proteasas de Bromeliáceas mexicanas.....	6
2.2 <i>Bromelia karatas</i> .....	7
3. Teoría de aislamiento y purificación de enzimas y proteínas por extracción bifásica acuosa.....	9
3.1 Constante de partición.....	9
3.2 Teoría de Debye-Hückel.....	14
4. Métodos tradicionales de extracción y purificación de enzimas.....	16
4.1 Extracción líquido – líquido con disolventes.....	16
4.2 Separación por precipitación por sales.....	18
4.3 Cromatografía.....	18
5 Extracción bifásica acuosa (EBA) como alternativa y procedimiento tecnológico para la extracción y purificación de enzimas de origen vegetal.....	19
5.1 Parámetros que afectan la extracción bifásica.....	20
5.2 Estudios de extracción de proteínas y enzimas de origen vegetal utilizando EBA.....	21
5.3 Diagramas de fase para la extracción bifásica acuosa.....	24
6 Justificación.....	26
7 Objetivos.....	27
7.1 Generales.....	27
7.2 Específicos.....	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
8.1 Materiales.....	28
8.2 Preparación del extracto enzimático.....	28
8.3 Elaboración de diagramas de fase.....	28
8.3.1 Elaboración de curvas binodales.....	28
8.3.2 Trazado de las líneas de equilibrio.....	29
8.3.3 Diseño experimental de las mejores condiciones de extracción y purificación utilizando un diseño de superficie de respuesta con un modelo central compuesto en el programa <i>Design expert</i> .....	30
8.4 Extracción bifásica acuosa.....	32

8.5	Determinación del contenido de proteínas .....	32
8.6	Determinación de actividad proteolítica sobre caseína.....	32
8.7	Análisis de la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	33
9.	Resultados .....	34
9.1	Rendimientos obtenidos de jugo de <i>Bromelia karatas</i> .....	34
9.2	Elaboración de curvas binodales .....	34
9.3	Resultados del diseño de superficie de respuesta con un modelo central compuesto en el programa <i>Design expert</i> .....	39
9.3.1	Factor de purificación .....	39
9.3.2	Rendimiento .....	45
9.3.3	Constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE) .....	49
9.3.4	Constante de partición con respecto al contenido de proteína (KP).....	52
9.3.5	Actividad recuperada.....	56
9.3.6	Selección de las mejores condiciones para llevar a cabo los experimentos.....	62
9.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	63
9.5	Efecto del peso molecular del PEG en la extracción bifásica .....	64
10.	Discusión .....	67
11.	Conclusiones .....	72
12.	Perspectivas del trabajo.....	73
13.	Referencias.....	74
14.	Anexos .....	79

## Índice de Figuras

Figura 1. Etapas de la extracción enzimática con disolventes.	16
Figura 2. Diagrama de fases para la extracción bifásica en sistemas acuosos.	25
Figura 3. Comparación de diagramas de fase.	30
Figura 4. Curva binodal PEG-6000-fosfato de potasio.	35
Figura 5. Curva Binodal PEG 1450-fosfato de potasio.	35
Figura 6. Diagrama de fase PEG 6000- fosfato de potasio ajustado al modelo de Merchuck.	36
Figura 7. Diagrama de fases PEG 1450- fosfato de potasio ajustado al modelo de Merchuck.	37
Figura 8. Diagrama de fases para el sistema PEG 6000 – fosfato de potasio.	37
Figura 9. Diagrama de fases para el sistema PEG 1450 – fosfato de potasio.	38
Figura 10. Superficie de respuesta factor de purificación fase superior PEG 1450 – fosfato de potasio.	40
Figura 11. Superficie de respuesta factor de purificación fase inferior PEG 1450-fosfato de potasio.	41
Figura 12. Superficie de respuesta factor de purificación fase superior PEG 6000- fosfato de potasio.	42
Figura 13. Superficie de respuesta factor de purificación fase inferior PEG 6000 – fosfato de potasio.	43
Figura 14. Superficie de respuesta para el rendimiento utilizando PEG 1450-fosfato de potasio.	46
Figura 15. Superficie de respuesta para el rendimiento utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.	47
Figura 16. Superficie de respuesta para la KE utilizando PEG 1450-fosfato de potasio.	50
Figura 17. Superficie de respuesta para la KE utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.	51
Figura 18. Superficie de respuesta para la KP utilizando PEG 1450–fosfato de potasio.	53
Figura 19. Superficie de respuesta para la KP utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.	54
Figura 20. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase superior utilizando PEG 1450 – fosfato de potasio.	57
Figura 21. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase superior utilizando PEG 6000-fosfato de potasio.	58
Figura 22. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase inferior utilizando PEG 1450–fosfato de potasio	59
Figura 23. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase inferior utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio	60
Figura 24. Gel de poliacrilamida de las diferentes fases obtenidas de la extracción bifasica acuosa.	64
Figura 25. Curvas de conductividad de fosfatos con diferentes concentraciones de PEG-6000.	79
Figura 26. Curvas de conductividad de fosfatos con diferentes concentraciones de PEG-1450.	80
Figura 27. Curva tipo de proteína por el método de Lowry.	81
Figura 28. Curva tipo de tirosina.	83

## Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Clasificación de enzimas.	1
Cuadro 2. Metabolitos extraídos de Bromeliáceas.	7
Cuadro 3. Enzimas y compuestos de origen vegetal extraídas con sistemas bifásicos.	22
Cuadro 4. Parametros considerados en el diseño experimental	31
Cuadro 5. Factores involucrados en el diseño experimental para la búsqueda de las mejores condiciones para la extracción bifasica dada por el programa Design expert.	31
Cuadro 6. Rendimiento de jugo y proteína.	34
Cuadro 7. Constantes del modelo de Merchuck para cada sistema.	36
Cuadro 8. Valores de LE y su pendiente (PLE).	38
Cuadro 9. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo para el factor de purificación fase superior (FS) y fase inferior (FI).	44
Cuadro 10. Prueba de Tukey para el factor de purificación en la fase superior (FS) y para la fase inferior (FI).	45
Cuadro 11. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para el Rendimiento (%).	48
Cuadro12. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para KE.	52
Cuadro 13. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para KP.	55
Cuadro 14. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para la actividad recuperada en la fase superior (FS) y fase inferior (FI).	61
Cuadro 15. Resumen de datos experimentales de extracción bifasica en sistemas acuosos	62
Cuadro 16. Condiciones proporcionadas por el programa Design expert para obtener el mejor resultado en la extracción bifasica de karatasina.	63
Cuadro 17. Efecto del peso molecular del PEG , relación de volúmenes, actividad recuperada y el factor de purificación.	65
Cuadro 18. Resultados obtenidos utilizando un punto central de 20 (% p/p) PEG y 20 (% p/p) Fosfatos.	65
Cuadro 19. Relación de volúmenes y fuerza iónica.	68
Cuadro 20. Ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación para las diferentes curvas de conductividad utilizando PEG 6000.	79
Cuadro 21. Ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación para las diferentes curvas de conductividad utilizando PEG 1450.	80
Cuadro 22. Cantidades para formar curva tipo de proteína.	81
Cuadro 23. Cantidades para elaborar curva patrón de tirosina.	82

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Las enzimas.

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha utilizado enzimas aunque en un inicio no se conocían con el nombre de enzimas, los primeros vestigios que se tienen del uso de enzimas se encontraron en Dinamarca y Japón a finales del siglo XIX, cuando se produjeron las primeras preparaciones de quimosina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico. Todas las enzimas son productos celulares por lo que pueden ser obtenidas de tejidos animales y vegetales o mediante procesos fermentativos empleando microorganismos (Carrera, 2003), la clasificación de las enzimas se muestran en el cuadro 1 (Teijón y Garrido, 2006).

Cuadro 1. Clasificación de enzimas.

Número	Clase	Función	Enzimas representativas
EC 1	Oxido-reductasas	Transferencia de átomos de hidrógeno u oxígeno, o de electrones, desde un sustrato a otro.	✓ Peroxidasa ✓ Catalasa ✓ Glucosa oxidasa ✓ Lacasa
EC 2	Transferasas	Transferencia de grupos de átomos (radicales) desde un sustrato a otro.	✓ Fructosil-transferasa ✓ Glucosil-transferasa
EC 3	Hidrolasas	Catalizan la reacción de rompimiento de las moléculas con la participación del agua.	✓ Amilasas ✓ Celulasas ✓ Lipasas ✓ Pectinasas ✓ <b>Proteasas</b> ✓ Pululnasa
EC 4	Liasas	Catalizan la adición de grupos a dobles enlaces, o la formación de dobles enlaces mediante eliminación de grupos	✓ Pecto-liasa ✓ Alfa-acetolactato-descarboxilasa
EC 5	Isomerasas	Catalizan la transferencia de grupos de una posición a otra dentro de la misma molécula.	✓ Glucosa isomerasa
EC 6	Ligasas	Unen moléculas entre sí mediante enlace covalente	✓ ADN ligasa

Debido a que las enzimas son tan importantes en nuestra vida diaria, no solo por su efecto dentro de nuestro organismo, sino, porque gracias a las enzimas es posible que tengamos productos alimenticios y farmacéuticos que hacen nuestra vida más fácil y amena, es necesaria la investigación de nuevas fuentes de enzimas y que puedan ser aprovechadas industrialmente.

## **1.2 Procesos industriales en los que se aplican enzimas.**

Las enzimas que se utilizan industrialmente son principalmente hidrolasas, la principal industria que utiliza éstas enzimas es la industria alimentaria, algunas aplicaciones se muestran a continuación:

### ✓ **Industria Cervecera.**

Se utilizan una variedad de enzimas en la industria cervecera, principalmente alfa-amilasas, glucanasas y proteasas, estas se utilizan para degradar polisacáridos, las proteasas son utilizadas para la degradación de proteínas presentes en la cebada incrementando la solubilidad del sustrato para que la levadura logre un mejor desarrollo y producción, la acción de estas enzimas durante las primeras etapas consiste en mejorar la licuefacción del almidón, regular el contenido de azúcar y nitrógeno, mejorar la extracción, facilitar la filtración y controlar la turbidez además de mejorar el sabor y viscosidad del producto final (Carrera, 2003).

### ✓ **Elaboración de jarabes.**

Dependiendo de las enzimas utilizadas, a partir del almidón se pueden obtener jarabes de diferente composición y propiedades físicas. Los jarabes se utilizan en una variedad de alimentos tales como bebidas gaseosas (refrescos), dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas, etc. (Carrera, 2003).

### ✓ **Elaboración de quesos.**

Las principales enzimas utilizadas en la elaboración de queso es la quimosina y algunas lipasas presentes en la leche, la quimosina es conocida como "cuajo", debido a que separa la caseína del suero, dándole cuerpo al queso, las lipasas son utilizadas principalmente para dar un sabor característico, esto debido a que hidrolizan el componente graso de la leche. Por otra parte, también se recomienda agregar enzimas exógenas de tipo proteolítico para acelerar el proceso de maduración de algunos quesos (Carrera, 2003).

✓ **Panificación.**

En la panificación se utiliza principalmente la  $\alpha$ -amilasa, la cual rompe el almidón de las harinas, proporcionando un adecuado y mantenido desprendimiento de anhídrido carbónico el cual depende de la cantidad de maltosa y glucosa fermentables que estén presentes en la masa, y cuya formación depende, a su vez, de la acción sincronizada de la alfa-amilasa y la beta-amilasa; en mejor forma que por adición de extracto de malta usado también para éste objeto. Mientras los cereales germinados contienen ambas enzimas, muchas harinas de trigo son deficientes en alfa-amilasa, siendo entonces conveniente su adición (Carrera, 2003).

✓ **Productoras de Jugos de Frutas.**

Las primeras enzimas empleadas en las industrias de jugos de frutas fueron las enzimas pectinas para la clarificación del jugo de manzana. Actualmente las pectinas se usan en el procesamiento de muchas otras frutas, junto con amilasas y celulasas. Durante el procesamiento de los jugos cuando se desintegran los tejidos vegetales, una parte de la pectina, que es un componente estructural de las frutas, pasa a la solución, otra parte se satura con el jugo y la parte restante permanece en las paredes celulares. Las pectinas se usan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación ayudando a la separación del precipitado flocúleno (Carrera, 2003).

✓ **Procesamiento de Carne.**

Durante el proceso de maduración de la carne que sigue al de rigidez cadavérica, las transformaciones autolíticas, causadas por sus enzimas proteolíticas (catepsinas) suministran a la carne una textura blanda, jugosa, masticable, de sabor agradable y de fácil cocción y digestión. Como está maduración natural suele ser prolongada (12 días), se puede acelerar artificialmente mediante la adición de proteasas extrañas para así aumentar la ternura de la carne. Al atacar por proteólisis las fibras musculares y /o los componentes del tejido conectivo (colágeno, elastina, actomiosina) se logra un relajamiento de los enlaces peptídicos de las proteínas y con ello el ablandamiento de la carne. Las principales enzimas utilizadas para éste propósito son proteasas de origen vegetal (papaína, bromelaína y ficina) o de microorganismos (*Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*) siendo mas utilizada la papaína (Gélvez *et al.*, 2006).

### **1.3 Mercado actual de las enzimas.**

Actualmente existen 20 compañías de Europa, Japón y Estados Unidos que realizan la producción de enzimas, el mercado está dominado por Novo Nordisk (Dinamarca) con el 50 % de las ventas a nivel mundial, seguida por Rhom and Haas (Alemania). El mercado de las enzimas ha tenido gran crecimiento desde los años 70<sup>s</sup> y éste ha sido paralelo con el desarrollo de un gran número de aplicaciones en la industria alimentaria. En América latina existen empresas productoras de enzimas en México, Brasil, Argentina y Uruguay, muchas de las cuales son subsidiarias de empresas transnacionales, como es el caso de Pfizer en México y Brasil y Novo en Brasil (Gélvez *et al.*, 2006). En la actualidad, las proteasas de origen vegetal ocupan el 60 % de las enzimas que se comercializan a nivel mundial y el mercado mundial de las enzimas es dominado por empresas como las industrias Novo, Gist-Brocades (USA) y Genencor internacional (Argentina) (Feijoo-Siota y Villa, 2011).

Las enzimas proteolíticas de plantas son pocas, de estas las más abundantes son las proteasas cisteínicas, las más utilizadas son: la Bromelaína, la Papaína y la Ficina (Aehle, 2007). En los últimos años los ojos del mundo han estado puestos en las enzimas proteolíticas de origen vegetal ya que han demostrado ser de gran utilidad en la industria farmacéutica y biotecnológica, por lo que la investigación sobre nuevas enzimas de origen vegetal que tengan buenas propiedades y a bajo costo, abre la posibilidad de participar en los mercados internacionales, los cuales indican una demanda creciente por estas enzimas (Feijoo-Siota y Villa, 2011). La mayoría de estas enzimas proteolíticas cisteínicas tienen un pH óptimo entre 5 a 8, y una masa molecular dentro del intervalo de 25 a 30 kDa. Aunque hay algunas que se encuentran en el intervalo de 50 a 75 kDa. (Dubey *et al.*, 2007).

### **1.4 Enzimas proteolíticas de origen vegetal usados a nivel industrial.**

Estas enzimas, conocidas como proteasas, hidrolizan las cadenas poli-peptídicas de las proteínas, y se caracterizan por tener gran variedad de especificidades, de acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo. Por lo que se clasifican como: proteasas serínicas, proteasas aspárticas, proteasas cisteínicas y metalo-proteasas (Carrera, 2003; Feijoo-Siota y Villa, 2011).

Las aplicaciones industriales más difundidas de las enzimas proteolíticas de origen vegetal incluyen: a) Estabilización coloidal de la cerveza; b) Proteólisis de la fracción proteínica de adjuntos de la malta; c) Solubilización de proteína de pescado para consumo humano; d) Modificación de la estructura miofibrilar de la carne muscular de bovino, para el mejoramiento de la textura de la carne; e) Modificación de las propiedades funcionales de proteínas vegetales para consumo humano (Briones-Martínez *et al.*, 2001). Las principales enzimas proteolíticas utilizadas son las siguientes (Carrera, 2003; Feijoo-Siota y Villa, 2011):



➤ Papaína.

El término papaína se aplica tanto a las preparaciones enzimáticas crudas obtenidas del látex de *Carica papaya* como a las distintas fracciones protéicas del mismo. La papaína y quimo papaína son las principales proteasas del látex (10 y 45 % de la proteína soluble), el cual contiene también lisozima (20 %) (Carrera, 2003; Feijoo-Siota y Villa, 2011).

➤ Bromelaína.

Se obtiene del jugo de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus*). Es una glicoproteína del grupo de las cisteín proteasas. Actúa de preferencia sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo varía con el sustrato, en el intervalo de 5 a 8. Y tiene baja tolerancia térmica. La enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento (Carrera, 2003; Feijoo-Siota y Villa, 2011).

➤ Ficina.

Es una cisteín proteasa como la papaína. Se obtiene del látex de las plantas del género *Ficus*. Presenta hidrólisis preferencial por los aminoácidos aromáticos. El pH óptimo varía con el sustrato y se encuentra en el intervalo 5-8. La temperatura óptima está alrededor de 60 °C, inactivándose completamente a 80 °C (Carrera, 2003; Feijoo-Siota y Villa, 2011).

## 2. PROTEASAS DE BROMELIÁCEAS MEXICANAS.

Las proteasas han encontrado una considerable aceptación en el ámbito farmacológico y alimenticio, en donde se utilizan como agentes antiinflamatorios y coadyuvantes en los procesos alimenticios. El número de especies vegetales que pueda producir una gran cantidad de enzima para ser utilizada a nivel industrial son pocas. Las familias vegetales que son aprovechadas industrialmente son las siguientes: Bromeliácea, Caricácea y Morácea, de éstas los géneros Bromelia y Ficus muestran una tendencia prometedora para la producción de grandes cantidades de enzimas. Bromelia es un género americano integrado por 70 especies, todas ellas nativas de zonas tropicales, la primera de ellas en ser estudiada fue *Bromelia pingin* L. seguida de otras cuatro especies mexicanas: *Bromelia hemisférica*, *Bromelia karatas*, *Bromelia palmeri* y *Bromelia sylvestris*. (Buttazzoni *et al.*, 1984; Gonzáles-Rábade *et al.*, 2011).

### 2.1 Potencial industrial de proteasas de Bromeliáceas mexicanas.

Como se mencionó anteriormente, entre las familias que producen proteasas en cantidades suficientes para ser utilizadas a nivel industrial se destacan las Bromeliáceas siendo la bromelaina una de las enzimas más comercializadas y utilizadas en numerosas aplicaciones industriales y medicinales (Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005). Por tal motivo el estudio de estas especies es muy importante ya que amplía la posibilidad de aprovechar los recursos florísticos del país y ampliar la gama de enzimas proteolíticas de uso industrial. (Abreu *et al.*, 2005; Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005; Valles *et al.*, 2007). La ventaja que ofrece estudiar a la familia de las Bromeliáceas es que producen frutos que son comestibles y no tóxicos, por lo que se amplía la posibilidad de que puedan ser consideradas como seguras ante la FDA (Food and Drug Administration). En la actualidad existe información bibliográfica acerca del aislamiento y purificación de enzimas proteolíticas de la familia Bromeliácea (Cuadro 2).

Cuadro 2. Metabolitos extraídos de Bromeliáceas.

Nombre del metabolito de interés	Nombre de la planta	Referencias
Enzimas proteolíticas	<i>Bromelia antiacantha Bertol.</i>	Valles. <i>et al.</i> , 2007
Cisteín peptidasa	<i>Ananas comosus L.</i>	López <i>et al.</i> , 2000
Actividad de coagulación y proteolítica	Frutos de <i>Bromelia hieronymi</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2010
Antioxidantes	<i>Bromelia karatas.</i>	González-Salvatierra <i>et al.</i> , 2010 Ketnawa <i>et al.</i> , 2011;
Bromelaína	<i>Ananas comosus L</i>	Rabelo <i>et al.</i> , 2004; Ferreri <i>et al.</i> , 2011
Hemisfericina	<i>Bromelia hemisférica</i>	Orozco <i>et al.</i> , 2003
Antibacteriales	<i>Bromelia pinguin L.</i>	Pio-León <i>et al.</i> , 2009
Hieronimaina	<i>Bromelia hieronymi</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2008
Anti alergénicos	<i>Bromeliaceae Nidularium procerum</i>	Vieira-de-Abreu <i>et al.</i> , 2005
Betaínas	<i>Bromelia plumieri</i>	Adrián-Romero y Gerald, 2001

## 2.2 *Bromelia karatas.*

*Bromelia karatas* es una planta silvestre nativa de México y se encuentra principalmente en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, donde se le conoce con el nombre maya de “chom”, comúnmente es conocida como piñuela, aunque también se encuentra en otras partes del país donde se le conoce con diferentes nombres como Bichicol (Oaxaca), Chuqui (Tabasco) (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Dicha planta tiene diversas aplicaciones, sus frutos son comestibles y se caracterizan por tener un sabor agridulce, los cuales son utilizados para la preparación de aguas frescas (Briones-Martínez *et al.*, 2001). En la medicina tradicional, el jugo de los frutos se usa como antiescorbútico, antihelmíntico, diurético y para tratar diversas enfermedades estomacales como la disentería (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). De *B. karatas* se han logrado aislar enzimas proteolíticas como la Karatasina, la cual fue descrita y estudiada por primera vez por el grupo de enzimología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) (Garduño *et al.*, 1974).

La Karatasina es un complejo constituido por ocho formas moleculares múltiples cuyos puntos isoeléctricos se localizan en los intervalos de pH de 3.4 a 10.4 (Garduño *et al.*, 1974). Sus actividades específicas sobre caseína varían notablemente y son más activas aquellas que poseen puntos isoeléctricos más alcalinos, además posee actividad de proteasa y es susceptible a la inhibición con agentes bloqueantes de grupo tiol, como el acetato fenilmercúrico y a la activación (Sánchez, 1989).

La karatasina tiene un peso molecular de 23.84 kDa, es una glicoproteína con el 7 % de carbohidratos, y es similar a la bromelaína. La actividad específica de la karatasina total es de 0.5 U/mg (promedio de la suma de las actividades específicas de sus formas moleculares). Las formas moleculares poseen tres características que las diferencian entre sí: su punto isoeléctrico, tipo de retención en columna de intercambio iónico y su actividad específica. En el caso particular de la separación de proteasas de la *Bromelia karatas* hay escasa información publicada y la que existe, es de nuestro grupo de trabajo (Garduño *et al.*, 1974; Sánchez, 1989; Briones-Martínez *et al.*, 2001;).

### 3. TEORÍA DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS POR EXTRACCIÓN BIFÁSICA ACUSA.

El proceso de separación de enzimas en la extracción líquido-líquido se rige principalmente por dos definiciones importantes una es la constante de partición la cual va a definir la forma en la que se realiza la separación enzimática, la otra es la teoría de Debye-Hückel, la cual describe el comportamiento de una proteína en disolución.

#### 3.1 Constante de partición.

Todos los procesos de extracción están regidos por la constante de partición K, la cual se define como la relación de las concentraciones de soluto en el equilibrio; esta constante está ligada al potencial químico de las fases cuando estas se encuentran en equilibrio (Una fase es aquel sistema o parte de un sistema que se caracteriza por tener una composición química homogénea y presentar las mismas propiedades físicas además de poseer una interfase definida en su contorno) (Tejeda *et al.*, 1995).

La constante de partición está definido como:

$$K = \frac{x}{y} \quad (1)$$

Donde K es la constante de partición, "x" es la concentración de soluto en el extracto, y "y" es la concentración de soluto en la fase del refinado (fase que no tiene el soluto de interés).

La ecuación 1 es conocida como Ley de distribución de Nerst la cual "establece que en el equilibrio existe una relación constante de las actividades del soluto en las dos fases para una temperatura dada". La ecuación 1 se puede escribir como se muestra:

$$\ln K = - \left[ \frac{\mu^0(R) - \mu^0(E)}{RT} \right] \quad (2)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (3)$$

Donde  $\Delta G^0$  es el cambio en la energía libre en el estado de equilibrio. El logaritmo natural de la constante de partición  $K$  es proporcional a la diferencia de los potenciales químicos en los estados estándar de las fases puras.

La constante de partición se encuentra íntimamente relacionada con el equilibrio termodinámico y tiene diferentes propiedades que nos permiten el diseño de un proceso de extracción como lo son:

- a) La constante de partición se define solo en un punto de equilibrio, es decir, éste valor no es el mismo para todas las concentraciones posibles de solvente en un sistema sino únicamente en el equilibrio verdadero, en ese sentido hay una constante general de equilibrio para el sistema.
- b) La constante de partición varía dependiendo la concentración de equilibrio en cada fase.
- c) La constante de partición se considera constante para sistemas diluidos.
- d) La constante de partición a una temperatura dada es independiente de la concentración o presión global del sistema.
- e) Un valor elevado en al constante de partición, nos indica una buena recuperación del soluto de interés.
- f) Los valores de la constante de partición deben de ser determinados experimentalmente.

Es relevante mencionar que no solo haciendo cambios en el tipo de disolvente se puede mejorar la extracción, sino también modificando la carga del soluto es posible mejorar su extracción (Tejeda *et al.*, 1995).

Los principales cambios que se pueden hacer para mejorar la extracción son:

- 1) Cambios en la carga del disolvente.

Es la primera estrategia que se sigue para mejorar un sistema de extracción, para lo cual se elige un solvente cuyo potencial químico en el estado estándar esté más próximo al potencial químico de equilibrio (Tejeda *et al.*, 1995), esto se logra utilizando parámetros de solubilidad en el cálculo de la constante de partición ecuación cuatro.

$$\ln K = \frac{V_R(\delta_A - \delta_R)^2 - V_E(\delta_A - \delta_E)^2}{RTV_A} \quad (4)$$

Donde  $V_R$ ,  $V_E$  y  $V_A$  son los volúmenes molares parciales del refinado, extracto y soluto A respectivamente y  $\delta_R$ ,  $\delta_E$ ,  $\delta_A$  son los parámetros de solubilidad del refinado, extracto y soluto A, respectivamente. En todos los casos el límite de solubilidad es la saturación. En un sistema de un solvente y un soluto la concentración de saturación a una temperatura y presión dadas es constante y no depende de la manera en que se prepara la solución.

Para determinar la solubilidad del soluto de interés se deben realizar dos extracciones con diferente solvente cada una de ellas y cuya solubilidad sean conocidas.

## 2) Cambios en el soluto.

Cuando no es posible cambiar el solvente por cuestiones técnicas o económicas es recomendable realizar cambios en el soluto, estos cambios deben de ser reversibles, el más utilizado es el cambio del pH. Los productos biológicos son sensibles a cambios de pH, debido a las propiedades ácido-básicas de los aminoácidos que conforman las proteínas. La mayoría de estos compuestos biológicos son ácidos y bases débiles que son afectados por el pH, ya que se ioniza parcialmente el compuesto cuando está en agua y puede no ionizarse significativamente en un solvente orgánico.

De manera que si un soluto que es un ácido débil (RCOOH) y está en solución acuosa, se disocia de la siguiente manera:



Así, un mol del ácido débil da como resultado un mol de un carboxilo y un mol de H<sup>+</sup> de modo que la constante de partición se describe:

$$K = \frac{[RCOO^-]_R [H^+]_R}{[RCOOH]_R} \quad (6)$$

En el momento en el que éste compuesto se distribuye en dos fases: una orgánica (E) y una acuosa (R), el compuesto tiene una forma ionizada y otra no ionizada en la fase acuosa, así que la ecuación (6) se reordena de la siguiente manera:

$$K = \frac{[RCOOH]_E}{[RCOOH]_R + [RCOO^-]_R} \quad (7)$$

Si combinamos las ecuaciones (6) y (7) considerando la fase acuosa y que el soluto está en las dos fases nos queda:

$$K = \frac{K_i}{1 + \frac{K_a}{[H^+]_R}} \quad (8)$$

Donde  $k_a$  es la constante de partición del soluto *ácido*;  $K_i$  es el coeficiente de partición intrínseco de las especies no ionizadas definidas por la ecuación (9):

$$K = \frac{[RCOOH]_{Extracto}}{[RCOOH]_{Refinado}} \quad (9)$$

Si colocamos el concepto de  $pK_a$  el cual es:

$$pK_a = -\log K_a \quad (10)$$

Si combinamos las ecuaciones (8) y (9) tenemos:

$$\log_{10} \left[ \left( \frac{K_i}{K_p} \right) - 1 \right] = pH - pK_a \quad (11)$$

Para el caso de que el soluto sea una base débil tenemos la ecuación 12.

$$\log_{10} \left[ \left( \frac{K_i}{K_p} \right) - 1 \right] = pK_b - pH \quad (12)$$

Una vez que conocemos el coeficiente de partición en cada fase dependiendo de las propiedades ácido-base del soluto podemos también determinar el pH al que se debe realizar la extracción. Para los solutos A y B la selectividad de la separación está dada por  $\beta$  la cual se define como:

$$\beta = \frac{K_p(A)}{K_p(B)} \quad (13)$$

$\beta$  puede escribirse también de la siguiente manera:

$$\beta = \left( \frac{K_i(A)}{K_i(B)} \right) \left( \frac{1 + \frac{K_a(B)}{[H^+]}}{1 + \frac{K_a(A)}{[H^+]}} \right) \quad (14)$$

Las ecuaciones (13) y (14) sirven como indicadores del grado de pureza que se puede lograr en un sistema de extracción.



Existen factores que afectan la constante de partición en sistemas bifásicos ya que en éste tipo de extracción se involucran, además, de las fases algunas propiedades del soluto como: hidrofobicidad, tamaño molecular, conformación molecular, bioespecificidad de la proteína, electroquímica, pH, concentración del buffer, fuerza iónica, temperatura y concentración de la proteína (Baskir *et al.*, 1989).

De manera general la constante de partición para una proteína se expresa de la siguiente manera:

$$K = \frac{[P]_1}{[P]_2} \quad (15)$$

Donde  $[P]_1$  y  $[P]_2$  son las concentraciones de proteína en la fase uno y dos, respectivamente.

Existen diferentes propiedades en los sistemas de extracción bifásica acuosa que afectan la constante de partición, afectando con ello la partición del soluto de interés, entre esto se encuentran los siguientes:

**a) Tamaño de las biomoléculas.**

Las moléculas pequeñas como aminoácidos se distribuyen en las fases fácilmente, lo que no ocurre en el caso de las proteínas grandes, ya que estas no se distribuyen de manera homogénea (Baskir *et al.*, 1989).

**b) Peso molecular de los polímeros.**

El peso molecular de los polímeros en los sistemas bifásicos tienen influencia sobre el reparto de los biomateriales debido a que altera la composición de las fases y cambia el número de interacciones proteína-polímero, la extracción puede variar si aumentamos el peso molecular de un polímero con respecto a otro. Las proteínas con peso molecular elevado son más influenciadas por cambios en el peso molecular de los polímeros respecto a las que tienen pesos moleculares bajos (Albertsson *et al.*, 1990).

**c) Carga de la proteína.**

La mayoría de las proteínas tienen cargas debido a las propiedades de los aminoácidos que componen a las proteínas con diferentes valores de pKa, el cual está relacionado con el pH. Cuando el pH cambia de valores ácidos a básicos, la proteína incrementa su carga negativa lo que provoca una reducción en la carga positiva; cuando la proteína está en su punto isoeléctrico (pI). La suma de todas las cargas es cero, y fuera de éste caso las proteínas tienen una carga neta. Si agregamos sales al sistema bifásico se crea una distribución de diferencia de potencial entre las fases, ésta diferencia de potencial resulta de las preferencias que tenga la proteína por

diferentes iones de la sal en las diferentes fases, lo que afecta fuertemente la partición de las biomoléculas cargadas (Baskir *et al.*, 1989).

#### d) **Concentración de proteína.**

Es necesario conocer la concentración de la proteína para llevar a cabo su extracción. Si la concentración es baja (más baja que la concentración del polímero), ésta no afectará significativamente la constante de partición, sin embargo, si tenemos en el sistema una alta concentración de proteína, ésta afecta la constante de partición ya que altera significativamente las propiedades del sistema. Esto debido a que las proteínas forman fases separadas si la concentración es suficientemente alta.

### 3.2 **Teoría de Debye-Hückel.**

La teoría de Debye-Hückel también conocida como ley límite, explica la disolución de una sustancia en un sistema acuoso. Esta teoría establece cómo el campo eléctrico debido a un cierto ión se ve modificado debido a la existencia de otras cargas en disolución. Es una teoría muy relacionada con el potencial químico el cual establece de manera general como se lleva a cabo la disociación; éste grado de disociación está dado por la suma de los potenciales químicos de los iones. Esta teoría tiene cinco postulados los cuales describen la disociación en iones de cualquier sustancia (Ball, 2004):

1. Los electrolitos fuertes se disocian por completo en iones.
2. Cada ion está rodeado por una atmosfera iónica de iones de carga opuesta
3. Las desviaciones observadas respecto del comportamiento ideal de las soluciones se atribuyen a las interacciones eléctricas entre iones.

El trabajo eléctrico está definido como el potencial por la carga ( $\Phi z_i e_c$ ) y es igual a la diferencia de potencial químico ( $RTL \ln \gamma_i$ ), es decir:

$$\Phi z_i e_c = RTL \ln \gamma_i \quad (16)$$

Conociendo éste trabajo eléctrico se llega a la ecuación que describe la ley de Debye-Hückel la cual permite calcular el trabajo eléctrico de introducir una carga eléctrica en el radio de influencia del ion central  $i$  (ecuación 17).

$$\Phi = \frac{z_i e_c}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r} e^{-r/b} \quad (17)$$

Donde  $\Phi$  potencial eléctrico derivado del ión central  $i$ ;  $z_i$  es el número de carga del ion  $i$ ;  $e_c$  es la carga del electrón;  $\epsilon$  es la constante dieléctrica en el vacío ( $\epsilon_0$ ) y del solvente ( $\epsilon_r$ );  $r$  es el radio de influencia de  $i$ ;  $b$  es la distancia (radio) de Debye-Hückel (Ball, 2004).

Debido a la complejidad del cálculo del potencial eléctrico para la muestra en cada uno de los sistemas de EBA, se prefiere la determinación de la fuerza iónica (Johansson y Walter, 2008), a partir de datos experimentales, esta se define como:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (18)$$

Donde  $C_i$  es la concentración molar de la sal y  $Z_i$  es la carga iónica de cada uno de los iones presentes en la dilución, éste cálculo nos permite entender lo que le ocurre a la proteína dentro la mezcla de EBA.

## 4. MÉTODOS TRADICIONALES DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS.

### 4.1 Extracción líquido – líquido con disolventes.

Es un tipo de operación que permite la recuperación de un soluto que se encuentra en una solución, mediante su mezcla con un solvente orgánico el cual es llamado solvente de extracción, el soluto debe de tener afinidad por el solvente orgánico (Figura 1).



Figura 1. Etapas de la extracción enzimática con disolventes.

La extracción con solventes se utiliza principalmente para compuestos biológicos como proteínas y antibióticos. Éste tipo de extracciones se realiza en dos pasos, los cuales son:

1. Mezcla de solvente de extracción con el soluto de interés.
2. Separación de la mezcla extracto (soluto de interés-solvente de extracción) y refinado (disolvente residual).

En el proceso de extracción lo más importante que hay que tener en cuenta es la selección del disolvente de extracción para lo cual es necesario tener en cuenta los siguientes factores principales (Tejeda *et al.*, 1995):

#### **Selectividad.**

Debido a que en la mayoría de los casos se encuentran varios solutos en la mezcla, además del soluto de interés, es necesario que el solvente sea selectivo; la selectividad se determina experimentalmente o bien mediante revisiones de literatura donde se reportan los solventes para el soluto de interés (Tejeda *et al.*, 1995).

**Grado de solubilidad.**

Entre más insoluble sea el solvente en la fase acuosa más fácil se realizará la extracción del soluto de interés debido a que se facilita la formación de fases (Tejeda *et al.*, 1995).

**Facilidad de recuperación.**

Es necesario que el solvente de extracción pueda ser recuperado después de la extracción, ya que en éste se encuentra el soluto de interés, para reducir costos, comúnmente se recicla el solvente para ser utilizado en otras extracciones (Tejeda *et al.*, 1995).

**Densidad.**

La densidad es uno de los factores principales que se debe de tener en cuenta para la elección del solvente de extracción; entre mayor sea la densidad, la separación se efectuará más fácilmente, el comportamiento de éste tipo de fases al fluir es laminar, lo cual es conveniente y hace posible separar solo la fase de extracción (Tejeda *et al.*, 1995).

**Tensión superficial.**

Es recomendable que el solvente de extracción tenga una mayor tensión superficial con respecto a la solución que contiene el soluto de interés, esto facilita la coalescencia de las emulsiones ayudando a la separación de fases (Tejeda *et al.*, 1995).

**Estabilidad del soluto.**

Una de las cualidades más importantes que se deben de tener en cuenta es la selección del solvente de extracción, es que éste no reaccione de manera que altere el producto de interés, pues si esto sucede no sirve de nada la extracción, debido a que se altera el producto perdiendo sus cualidades de interés, además de que se contamina (Tejeda *et al.*, 1995).

**Inocuidad del solvente.**

Es recomendable que el solvente utilizado sea inocuo, es decir, que no sea peligroso para el personal que lo utiliza, además de que debe de ser esterilizable, no inflamable, barato y disponible en cantidades necesarias para el proceso (Tejeda *et al.*, 1995).

## 4.2 Separación por precipitación por sales.

La separación de proteínas por precipitación es un método tradicional comúnmente usado como un paso que antecede a otros métodos más específicos, tales como la cromatografía. La precipitación de las proteínas está directamente relacionada con la solubilidad y punto isoeléctrico. La solubilidad de una proteína está determinada por tres principales factores: a) la densidad de carga y su distribución, b) grado de hidratación y c) la presencia de macromoléculas no protéicas (Whitaker, 1972), por otra parte el punto isoeléctrico está determinado por el pH de la solución y la carga de cada aminoácido dentro de la proteína (Peña *et al.*, 2004).

## 4.3 Cromatografía.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo mientras que la otra se mueve en una dirección definida (Tejeda *et al.*, 1995), existen diferentes tipos de cromatografía entre los cuales destacan los siguientes:

### ➤ Cromatografía por exclusión de tamaño molecular.

La cromatografía por exclusión de tamaño molecular, también llamada de filtración en gel, separa las proteínas en función de su tamaño molecular. La matriz de la columna está formada por un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados.

El principio de éste método se basa en que las proteínas de mayor tamaño migran a lo largo de la columna más rápidamente que las de menor tamaño, ya que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las esferas de polímero y por tanto siguen una ruta más corta y directa a lo largo de la longitud de la columna.

Las proteínas de menor tamaño, entran en los poros y su recorrido a lo largo de la columna se disminuye gradualmente, ya que tienen que atravesar los poros que se encuentran en el interior de las esferas de polímero en su desplazamiento a lo largo de la columna (Bes *et al.*, 2003).

### ➤ Cromatografía por intercambio iónico.

La cromatografía por intercambio iónico sirve para la separación de proteínas con cargas catiónicas como aniónicas. Se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de cada proteína a un valor de pH determinado. La matriz de la columna es un polímero sintético con grupos cargados unidos al soporte de la columna (Bes *et al.*, 2003).

## 5 EXTRACCIÓN BIFÁSICA ACUOSA (EBA) COMO ALTERNATIVA Y PROCEDIMIENTO TECNOLÓGICO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS DE ORIGEN VEGETAL.

En el proceso de recuperación de enzimas de origen vegetal se han utilizado varios métodos de extracción como la cromatografía, precipitación por sales, entre otras, sin embargo algunos de estos métodos son muy caros y requieren de mucho tiempo para alcanzar el resultado esperado debido a la gran cantidad de operaciones unitarias implicadas para alcanzar el producto terminado y de buena calidad. Para resolver dicha situación se han propuesto nuevas alternativas de purificación que vuelvan el proceso más rentable y se obtenga el mismo resultado pero con menos inversión, la principal alternativa que ha tomado fuerza durante los últimos 10 años ha sido la extracción bifásica acuosa (Saravanan *et al.*, 2008). Una de las características principales de la extracción bifásica es la gran cantidad de agua presente en el sistema (cerca del 70 al 90 % del volumen total), lo cual hace que la molécula de interés tenga una mayor compatibilidad por alguna de las fases, lo cual no ocurre si solo se encuentra el polímero o la sal sin agua (Gu, 2000).

Los sistemas de separación bifásica generalmente están formados por dos polímeros y agua, o bien un polímero, una sal y agua. Estos sistemas líquido-líquido, son formados al mezclar dos sustancias solubles en agua, las cuales al superar cierta concentración se vuelven inmiscibles entre sí, dando como resultado la partición del sistema en dos fases (Benavides y Rito-Palomares 2008). Éste método ha sido usado para la separación de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas. Estos sistemas han mostrado tener un gran potencial en lo que corresponde al procesamiento de proteínas como la clarificación, concentración y purificación. Los sistemas polímeros-sal-agua tiene como ventaja el ser un proceso de recuperación de proteínas y enzimas con un bajo costo, corto tiempo para el proceso de purificación, facilidad de escalamiento para uso a nivel industrial, además de su baja viscosidad lo que facilita la purificación enzimática (Nitsawang *et al.*, 2006).

El efecto que tiene el polietilenglicol (PEG) dentro del sistema es el interactuar con la proteína estabilizándola cuando ésta migra hacia la fase superior rica en polímero, lo cual permite su conservación, hay dos teorías que explican el porqué de éste fenómeno, la primera es que al agregar el polietilenglicol, éste restringe los cambios conformacionales formando uniones entre los hidrógenos del polímero y los residuos de aminoácidos en la superficie de las proteínas; la segunda es que debido a las propiedades del PEG estos interactúan con la estructura de la proteína, provocando una mayor estabilidad en el sistema (Singh *et al.*, 2003).

Además de esto, el comportamiento del polímero se ve influenciada por la presencia de las sales presentes en el sistema de manera que cuando se alcanza una alta concentración de sal, ésta provoca la separación de fases en donde se obtiene una fase rica en sal y pobre en polímero que coexiste con una fase superior rica en polímero y

pobre en sal. La función de la sal es estabilizar incrementando la hidratación de las proteínas uniéndose débilmente a ella, o desestabilizándola disminuyendo su hidratación, de ahí surge el efecto “*salting in*” y “*salting out*” de las sales, para solubilizar o precipitar a las proteínas (Bohinski, 1991).

A pesar que la estrategia de extracción bifásica es una técnica fácil de utilizar, su gran desventaja radica en la complejidad de la predicción de la distribución del material biológico en las dos fases y a la comprensión de las fuerzas que gobiernan los efectos de particionamiento (Kaul, 2000). Ésta técnica se ha utilizado para la separación de enzimas de origen vegetal, demostrando tener un buen rendimiento y un porcentaje de recuperación y purificación elevados, por ejemplo, realizados Nitsawang et al., 2006 realizó la recuperación y purificación de papaína del látex de la planta *Carica papaya* por dos métodos, uno de precipitación por sales (sulfato de amonio-cloruro de sodio) y por la técnica de extracción bifásica en sistemas acuosos (EBA) utilizando un sistema polímero-sal (8 % PEG-6000 y 15 % de sulfato de amonio), obteniendo mejores resultados utilizando la técnica EBA donde obtuvo una recuperación de alrededor de 88 % con una pureza del 100 %, mientras que con la precipitación con sales se obtuvo una recuperación del 49 % con una pureza del 89 %. Las principales ventajas que tiene la técnica EBA son su alta eficiencia, factibilidad de escalamiento, bajos costos de inversión y operación, además de que permite la purificación de compuestos biológicos en su forma nativa. Éste método, puede ser utilizado en conjunto con otros procesos de separación sin afectar a las etapas previas o posteriores de recuperación.

Debido a que la tecnología EBA en el caso de la extracción de enzimas no ha pasado la barrera del laboratorio es importante plantear ésta estrategia de purificación a nivel industrial, la razón por la cual esta tecnología es difícil de escalar de forma general es debido a que es necesario formular un sistema EBA para cada una de las enzimas de interés, es decir, cada sistema EBA es único para cada enzima en un cierto intervalo de condiciones, es por esto que no ha sido fácil su escalamiento.

### **5.1 Parámetros que afectan la extracción bifásica.**

#### **a) Relación peso molecular de muestra - Peso molecular del polietilenglicol (PEG).**

Mientras mayor sea el peso molecular del compuesto de interés, mayor debe de ser el peso molecular del PEG utilizado, con el fin de favorecer la recuperación en la fase superior del sistema, esto debido al fenómeno de volumen excluido, el cual se explica ya que a medida que las cadenas poliméricas incrementan su longitud (peso molecular), las fuerzas de interacción entre las mismas aumentan y el volumen libre entre ellas se reduce y por ende los compuestos de alto peso molecular no pueden alojarse en el reducido volumen disponible. De igual forma es importante considerar el peso molecular de los contaminantes presentes. De esta manera es posible



seleccionar una estrategia en que se elija un peso molecular de PEG que permita la separación selectiva de la proteína de interés y los contaminantes (Tejeda *et al.*, 1995).

#### **b) pH.**

Cuando el pH del medio se encuentra por debajo del punto isoelectrico (pI), la molécula (proteína) adquiere una carga electroquímica superficial positiva, ya que algunos residuos de los aminoácidos de la molécula se encuentran protonados. Una vez que el pH se eleva por encima del punto isoelectrico la molécula adquiere una carga superficial negativa, debido a la desprotonación de los residuos. El PEG cuenta con dos grupos hidroxilo en los extremos de la cadena polimérica, lo cual genera una distorsión en la nube electrónica, creando un momento dipolar positivo. De esta manera, los compuestos cargados negativamente (pH por encima del punto isoelectrico) tienen cierta afinidad por la fase superior de los sistemas de fases acuosas PEG–solución salina debido a la atracción electroquímica. Por lo tanto es importante tratar de trabajar a valores de pH del sistema que estén por arriba del punto isoelectrico de la proteína de interés. Sin embargo, es necesario considerar que el incrementar excesivamente el pH promovería la migración de proteínas contaminantes hacia la fase superior del sistema (Peña *et al.*, 2004).

#### **c) Características de la muestra.**

**Hidrofobicidad:** Mientras más hidrofóbico es el compuesto que se intenta recuperar, el peso del PEG debe ser mayor, para de esa manera lograr que una mayor cantidad de agua sea excluida de la fase superior (Tejeda *et al.*, 1995).

**Anfoterismo:** En caso de que la molécula presente anfoterismo (cambio de carga electroquímica superficial en función del pH) es recomendable trabajar a valores de pH por arriba del punto isoelectrico, de tal manera que la carga del compuesto sea negativa y tenga mayor afinidad por el PEG (el cual está ligeramente cargado positivamente) (Tejeda *et al.*, 1995).

## **5.2 Estudios de extracción de proteínas y enzimas de origen vegetal utilizando EBA.**

La separación bifásica es hoy en día la herramienta más socorrida en los procesos biotecnológicos debido a su bajo costo, proceso más simple, y a su facilidad de escalamiento, además de que ofrece varias ventajas como: alto rendimiento, pureza del compuesto de interés, y gran seguridad tanto para el usuario como para el ambiente ya que los compuestos no son tóxicos. En la actualidad se está utilizando la separación bifásica para la

purificación de enzimas y proteínas, en lugar de utilizar la separación por cromatografía, y EBA se prefiere porque ofrece la ventaja de que es barata y no consume mucho tiempo como la cromatografía. En la separación bifásica de enzimas vegetales es indispensable manipular las condiciones del sistema principalmente el tipo de polímero, la concentración del polímero, masa molecular del polímero, la concentración de la fase que contiene la sal y el pH (Nitsawang *et al.*, 2006).

La modificación de las propiedades ambientales depende de las características de la molécula de interés, tales como: peso molecular, forma, carga, sitio activo y principalmente las propiedades de superficie las cuales son factores claves en el proceso de separación. Para el caso de proteínas y enzimas extraídas de plantas se utiliza comúnmente los sistemas PEG con sales como: sulfato de amonio o fosfato de potasio; muchas de estas enzimas tienen aplicaciones en la industria alimenticia, tal es el caso de la invertasa, papaína y bromelaína por mencionar algunas. En éste caso se utilizan principalmente las sales de sulfato ya que son promotores de las interacciones hidrofóbicas de las proteínas. El peso molecular del polímero influye en la partición de proteínas ya que cambia el número de interacciones polímero-proteína, la cual es atribuida a interacciones entre las cadenas del PEG y la superficie hidrofóbica de las proteínas (Yücekan y Önal, 2011). En la Cuadro 3 se presentan las enzimas y compuestos de origen vegetal que han sido extraídos por EBA.

Cuadro 3. Enzimas y compuestos de origen vegetal extraídas con sistemas bifásicos.

Enzimas y compuestos	Especie vegetal	Sistema utilizado	Buffer y pH	Referencia
Invertasa	<i>Lycopersicon esculentum</i>	PEG – Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> COONa pH 5	Yücekan y Önal, 2011
β-glucuronidasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	PEG – K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	Ross y Zhang., 2010
Polifenol oxidasa	<i>Solanum tuberosum L</i>	PEG – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	Vaidya <i>et al.</i> , 2006
Papaína	<i>Carica papaya</i>	PEG – (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> COONa pH 5	Nitsawang <i>et al.</i> , 2006
Bromelaína	<i>Ananas comosus</i>	PEG – K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	Babu <i>et al.</i> , 2008
Polifenol oxidasa	<i>Ananas comosus</i>	PEG – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	Babu <i>et al.</i> , 2008
Proteasa Cisteínica	<i>Calotropis procera</i>	PEG – C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	HCl tris pH 6.8	Rawdkuen <i>et al.</i> , 2011
Lectina	<i>Canavalia brasiliensis</i>	PEG – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	Nascimento <i>et al.</i> , 2010
Antocianinas	<i>Fragaria vesca L</i>	PEG – Dextran	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.4	Edahiro <i>et al.</i> , 2005

Yücekan y Önal en el 2011 reportaron para el caso de la invertasa, la cual se extrae del jugo del fruto de *Lycopersicon esculentum*, en un sistema bifásico compuesto de PEG- $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Primero se preparó el sistema bifásico (PEG, Sales y Agua destilada) para posteriormente agregar la preparación enzimática, de manera que el peso total del sistema era de 10 g. Una vez que estaba completo el sistema, se homogenizó el sistema por 15 min a 25°C, se centrifugó el sistema para separar las fases a 4000x g por 10 min, las fases resultantes se separaron con una pipeta Pasteur, una vez separada las fases se observó, que la fase rica en PEG contenía la mayor actividad enzimática, así que se procedió a tratar ésta fase por ultrafiltración para eliminar el PEG del sistema y recuperar la enzima, los mejores resultados se obtuvieron utilizando PEG 3000 con una concentración de 15 % (p/p) y una concentración de sulfato de sodio de 12 % (p/p), con un pH de 4.5, dando como resultado un rendimiento máximo de 88%.

Por otro lado Ferrari *et al.*, 2011, reportó que para realizar la extracción de la bromelaína se deben de seguir los siguientes pasos: primeramente se tomó el fruto y se trituró, el jugo obtenido se filtró con una tela de nylon y se conservó a -5 °C para evitar la desnaturalización de la enzima. Posteriormente para llevar a cabo la extracción bifásica, se prepararon soluciones madre de PEG (50 % p/p) y un regulador de fosfato de potasio (22.5 % p/p) se probó en un intervalo de pH de 6 a 11, con una temperatura de 25° C de la siguiente manera; primero se preparó el sistema bifásico (PEG, Sales y Agua destilada) y se comenzó a agregar el regulador de fosfato de potasio hasta que el sistema se volvió turbio (esta turbidez es un indicador de la partición del sistema bifásico), posteriormente se agregó la preparación enzimática al sistema bifásico, se homogenizó el sistema y se dejó en reposo hasta que se formaran las fases, posteriormente se separaron las fases y se analizaron para determinar el contenido de proteína mediante el método de Bradford, los mejores resultados se obtuvieron con PEG-4000 a una concentración de PEG de 14 % (p/p) y una concentración de fosfato de 13 % (p/p), con un pH de 11 con un rendimiento del 62 %.

Por otra parte Babu *et al.*, 2008 reportó la extracción de bromelaína y polifenol oxidasa (PPO) por la técnica EBA, recomendando considerar un volumen de 10 mL como sistema de extracción dándole un valor del 100 % (p/p), del cual el 20 % (p/p) está compuesto por el extracto enzimático y lo restante de los demás componentes. Los sistemas bifásicos se realizan disolviendo los componentes en el extracto enzimático y luego aforando con agua hasta alcanzar el volumen de 10 mL, para su separación los sistemas se dejan en reposo por 24 horas, obteniendo sus mejores resultados con PEG-1500 con una concentración de PEG de 18 % (p/p) y 14 % (p/p) de fosfato de potasio.

### 5.3 Diagramas de fase para la extracción bifásica acuosa.

El comportamiento de los sistemas en equilibrio, se estudia por medio de gráficos que se conocen como: diagramas de fases, los cuales se obtienen trazando variables como presión y temperatura contra composición de polímero y compuestos salinos, determinando la concentración del soluto de interés en los puntos de equilibrio de éste sistema. A partir de los diagramas de fases se puede obtener información como:

1. Conocer en qué fase está presente el soluto de interés a diferentes composiciones del sistema después de lograr el equilibrio del sistema.
2. Investigar la solubilidad de los elementos o compuestos de interés.
3. Determinar las condiciones en las cuales se realiza la mejor extracción
4. Conocer las concentraciones del sistema en la cual se forman las fases

Los diagramas de fases representan esencialmente una expresión gráfica de la “Regla de fases de Gibbs”. Lo cual permite calcular el número de fases que pueden coexistir en equilibrio en cualquier sistema (Castillo, 2006), está dada por:

$$P+F=C+2 \quad (19)$$

Donde:

C= Número de componentes del sistema.

P= Número de fases presentes en el equilibrio.

F= Número de grados de libertad del sistema (variables: presión, temperatura y composición).

La regla de fases se aplica solo a estados de equilibrio de un sistema y requiere:

- a) Equilibrio homogéneo en cada fase.
- b) Equilibrio heterogéneo entre las fases coexistentes.

Muchos de los diagramas de fases que se utilizan en la extracción bifásica de proteínas y enzimas son los compuestos de polietilenglicol y sales como fosfatos y sulfatos, estas sales llegan a concentraciones en las cuales se hacen inmiscibles, cuando esto ocurre se forman dos fases, estas concentraciones en las que se forman las fases se representan por un diagrama de fases (figura 2) en éste diagrama está compuesto por una curva binodal y unas líneas llamadas de equilibrio (o Tie-lines), la curva binodal marca el límite sobre el cual se forman las dos fases en los sistemas. De esta forma, sobre la curva existen dos fases y bajo de ella sólo una. La recta AC es la línea de equilibrio, la cual permite conocer la composición de las fases en el equilibrio. Todos los sistemas que tengan una composición global dentro de esta línea de equilibrio (tal como el punto B) se separan

en dos fases descritas por los puntos A y C, estos puntos corresponden a las composiciones de la fase inferior y superior respectivamente (Cortés, 2008).

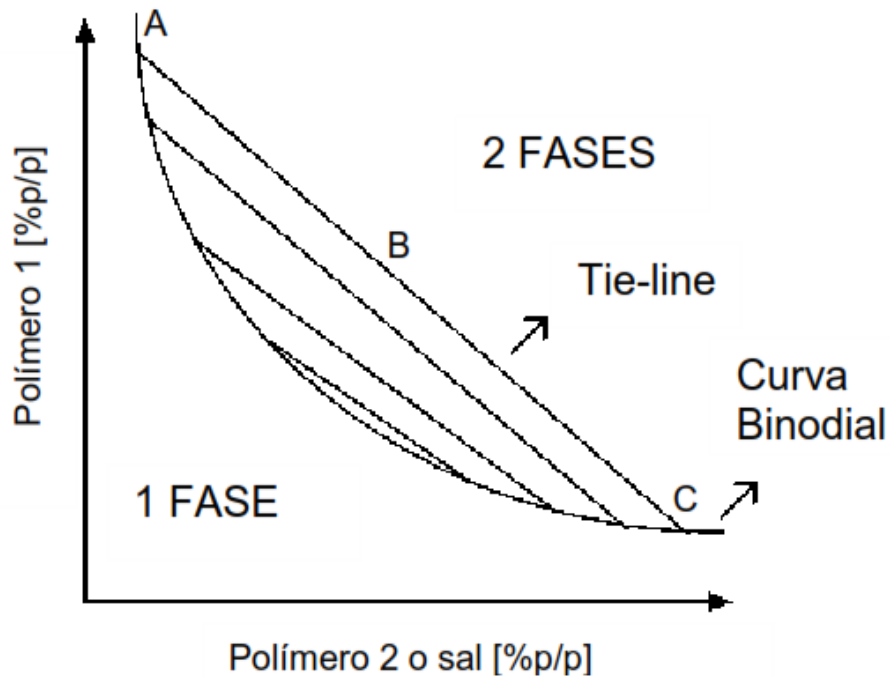


Figura 2. Diagrama de fases para la extracción bifásica en sistemas acuosos.

Al incorporar una proteína o enzima a estos sistemas, esta se distribuirá entre las dos fases. Esta partición se describe mediante la constante de partición ( $K$ ) la partición, la partición en estos sistemas son dependientes de distintos factores, lo cual dificulta el modelamiento de éste fenómeno, estos factores se dividen en dos: factores asociados al sistema y a los correspondientes a la naturaleza de la proteína (Cortés, 2008).

## 6 JUSTIFICACIÓN.

La proteasa polimórfica karatasina extraída del jugo de los frutos de la planta mexicana *Bromelia karatas* es de interés científico y tecnológico debido a que en diversas investigaciones se ha concluido que por sus propiedades y modo de acción puede ser de utilidad en las industrias alimentaria y farmacéutica. En la medicina tradicional los frutos de *B. karatas* se han utilizado como antiescorbútico, antihelmíntico y para tratar enfermedades como la disentería. En estudios previos en el Laboratorio de Enzimas Vegetales del CEPROBI se han establecido plantaciones experimentales de *B. karatas*, desarrollado preparaciones de karatasina refinada que han demostrado su utilidad en el mejoramiento de la textura de la carne, en la estabilización coloidal de la cerveza; todo lo cual permite inferir su factibilidad práctica.

El desarrollo de nuevas preparaciones enzimáticas para usos industriales requiere de procesos más económicos y eficientes en la conservación de la actividad y estabilidad de las enzimas. Así, en el presente trabajo se propone el uso de la extracción bifásica acuosa (EBA) para la separación de la actividad proteolítica del extracto de *B. karatas*, por las ventajas que ofrece en comparación con métodos como la cromatografía, al permitir el procesamiento de extractos crudos y en un solo paso obtener altos niveles de recuperación sin afectar la integridad y estabilidad enzimática. Por lo tanto, se estudiarán las condiciones que permita obtener el mayor rendimiento, recuperación y nivel de purificación, determinando los diagramas de fase y la composición de los sistemas de extracción, y de esta forma obtener conocimientos que proporcionen un mejor entendimiento del sistema y sirvan como base para un consecuente proceso de escalamiento.

## 7 OBJETIVOS.

### 7.1 Generales.

Determinar la composición del sistema PEG-fosfato de potasio que permita obtener un alto rendimiento en la extracción de la fracción proteolítica del jugo de *B. karatas* y una actividad proteolítica residual elevada.

### 7.2. Específicos.

- Estudiar comparativamente el efecto de dos pesos moleculares (1450 y 6000) del PEG en la partición de las proteínas con actividad proteolítica del extracto enzimático de *B. karatas*.
- Determinar los diagramas de fase del PEG de peso molecular de 1450 y 6000 para la extracción bifásica de las proteínas con actividad proteolítica de *B. karatas*.
- Determinar la composición del sistema que permita la máxima recuperación de la fracción proteolítica contenida en el jugo de los frutos de *B. karatas*.
- Caracterización electroforética de las fases obtenidas de la extracción bifásica del jugo de los frutos de *B. karatas*.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **8.1 Materiales.**

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron preparaciones de frutos de *Bromelia karatas* (chom) obtenidas de la plantación experimental del Laboratorio de Enzimas Vegetales (LENZIVEG) del CEPROBI en Campeche. En todos los experimentos se utilizó fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) marca Baker y fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) marca Fermont y polietilenglicol (PEG) de peso molecular de 6000 y 1450 marca Baker. Se utilizó un conductímetro marca OAKTON (modelo DO110), una liofilizadora marca Labconco (modelo freeze dryer 18), una centrifuga eppendorf 5415-C, y una centrifuga eppendorf 5810-R

### **8.2 Preparación del extracto enzimático.**

El extracto enzimático se obtuvo de acuerdo a la metodología reportada por Briones-Martínez *et al.*, 2011. Los frutos se lavaron con agua corriente y jabón, se enjuagaron con agua destilada y se cortaron a lo largo, posteriormente se extrajo el jugo de los frutos de *B. karatas*, por estrujamiento de los mismos a presión controlada, luego se llevó a cabo una filtración en tela, y una clarificación por filtración al vacío; el extracto se guardó en recipientes de plástico y se conservó en congelación a  $-4^\circ\text{C}$ , hasta su uso.

### **8.3 Elaboración de diagramas de fase.**

#### **8.3.1 Elaboración de curvas binodales.**

La determinación de las curvas binodales se llevó a cabo a temperatura ambiente, por el método volumétrico mencionado por Babu *et al.*, 2008 y Bensch *et al.*, 2007, basado en la transición de una solución clara a una turbia. Esta determinación se realizó de una solución madre de PEG al 30 % (p/p) por cada peso molecular de PEG, el procedimiento para la elaboración de los diagramas de fase consiste en agregar 5 mL la solución madre de PEG a un recipiente de vidrio transparente al cual se le agregan pequeñas alícuotas de una solución de fosfato de potasio al 30 % (p/p); la adición del regulador de fosfato de potasio se realiza gota a gota y en agitación constante hasta observar el enturbiamiento de la solución. Para generar los puntos del diagrama de fases solo se mide el volumen del regulador de fosfato de potasio agregado y el volumen total del sistema.



Este método fue modificado de la siguiente manera: en una probeta de 50 mL con 5 mL de una solución de PEG al 30 % (p/p), se adicionó 5 mL de solución de PEG y posteriormente se le agregó pequeñas alícuotas del regulador de fosfato de potasio compuesta por  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  en relación 1.8: 1.0, respectivamente, y se mantuvo en agitación constante hasta observar turbiedad. Una vez que la solución estuvo turbia se dejó en reposo por 3 minutos para que se estabilizara el sistema. En caso de desaparecer la turbiedad, es necesario agregar algunas gotas más del regulador de fosfato de potasio al 30 %, al cabo de los cuales se observa si se mantiene la turbiedad, en caso de no mantenerse se agregan más alícuotas del regulador de fosfato de potasio al 30 % hasta que la turbiedad se mantenga en el sistema. Una vez cumplida la condición de turbiedad se agregaron pequeñas alícuotas de agua destilada en agitación constante hasta que el sistema se volvió transparente. Finalmente se procedió a medir el volumen total y el volumen del regulador de fosfato de potasio al 30 % agregado al sistema, y se volvieron a repetir todos los pasos. Una vez elaborados las curvas binodales, se ajustaron al modelo expuesto en la ecuación 26 propuesto por Merchuck *et al.*, 1998, mediante una regresión no lineal usando el programa Wolfram Mathematica 8, con un intervalo de error de 0.001%.

### 8.3.2 Trazado de las líneas de equilibrio.

Para la determinación de las líneas de equilibrio se siguió la metodología propuesta por Silvério *et al.*, 2012., de los diagramas de fases se tomaron de 3 a 5 puntos arbitrarios los cuales se reprodujeron de manera separada y por triplicado sin presencia del extracto enzimático, estos sistemas se elaboraron colocando las cantidades de PEG y del regulador de fosfato de potasio de cada uno de los puntos y, se dejaron en reposo por 24 h, hasta que se separaron las fases. Una vez pasado éste tiempo, se separaron las fases empleando una pipeta, y para cada una de las fases determinó el contenido de fosfatos utilizando curvas de conductividad (ver anexo 1). El contenido de PEG en la fase inferior se realizó mediante la solución de la ecuación de Merchuck *et al.*, 1998 (ecuación 20).

$$Y = a * e^{(b*X^{0.5} - c*X^3)} \quad (20)$$

Donde “X” es la concentración de fosfato en la fase inferior, “a, b y c” son constantes determinadas por el ajuste no lineal de la curva binodal a la ecuación de Merchuck *et al.*, 1998, y “Y” es la concentración de PEG en la fase inferior. La ecuación 26 tiene la forma  $Y = a e^{mx}$  donde a es la pendiente, y los demás variables (b y c) forman parte de la pendiente. La concentración de PEG en la fase superior se determinó por el método gravimétrico. Después de determinar la conductividad en la fase superior, se procedió a interpolar en una curva de calibración para determinar la concentración de fosfatos en la fase, después se congeló y liofilizó y posteriormente se pesó.

Del peso registrado se restó la concentración de fosfatos en la fase. Una vez que se tuvieron los datos de concentraciones, se procedió a realizar el cálculo de las líneas de equilibrio (Tie-line) (TLL) mediante la ecuación 21 propuesta por Merchuck *et al.*, 1998.

$$TLL = [(X_{FS} - X_{FI})^2 + (Y_{FS} - Y_{FI})^2]^{\frac{1}{2}} \quad (21)$$

### 8.3.3 Diseño experimental de las mejores condiciones de extracción y purificación utilizando un diseño de superficie de respuesta con un modelo central compuesto en el programa *Design expert*.

Para determinar el efecto del peso molecular del PEG (1450 y 6000) en la extracción bifásica en sistemas acuosos de las proteasas del jugo de *Bromelia karatas* se procedió a realizar un diseño experimental de superficie de respuesta, y para determinar los límites de la zona en la que se asegura la formación de fases se compararon las curvas binodales de ambos pesos moleculares (figura 8).

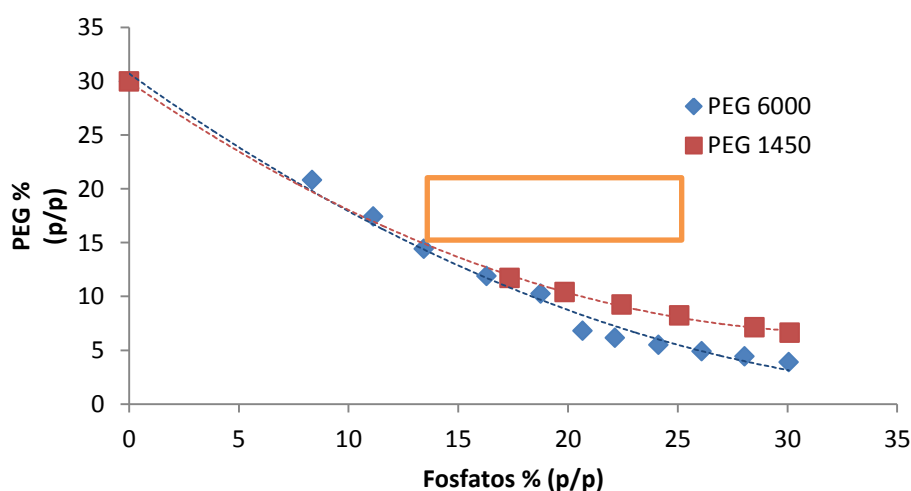


Figura 3. Comparación de diagramas de fase.

Una vez que se conocía el área en la que se tenían condiciones iguales se procedió a realizar el diseño experimental (cuadro 4), para tal propósito se utilizó el programa *Design expert* versión 8.0.7.1, considerando para este fin los parámetros del cuadro 4, se realizó un diseño de superficie de respuesta del tipo central compuesto con dos repeticiones, del cual salieron 36 corridas usando un modelo cuadrático para el diseño, de éste salieron 10 experimentos los cuales se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 4. Parametros considerados en el diseño experimental

Factor	Valor	Valor	Valor	Código
	máximo	medio	mínimo	
	+1	0	-1	
Peso Molecular Polietilén glicol (PEG)	6000	---	1450	A
Concentración de PEG	22	20	18	B
Concentración de Fosfatos	25	20	15	C

Cuadro 5. Factores involucrados en el diseño experimental para la búsqueda de las mejores condiciones para la extracción bifásica dada por el programa Design expert.

Experimento	Valores			Valores codificados		
	Peso molecular	[PEG] % (p/p)	[Fosfato de potasio] % (p/p)	A (PM)	B [PEG]	C [Fosfato de potasio]
1	1450	18	25	-1	-1	1
2	1450	18	15	-1	-1	-1
3	6000	18	15	1	-1	-1
4	6000	22	25	1	1	1
5	6000	20	20	1	0	0
6	1450	22	15	-1	1	-1
7	1450	22	25	-1	1	1
8	6000	18	25	1	-1	1
9	1450	20	20	-1	0	0
10	6000	22	15	1	1	-1

Una vez obtenidos los resultados se procedió a realizar el análisis del efecto de los factores sobre la extracción bifásica de la karatasina, todos los experimentos se realizaron con un volumen de 10 mL por triplicado, utilizando una relación del regulador de fosfato de potasio de 1.8:1, es decir, por cada 1.8 partes de fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ), hay una parte de fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), se tomó a estos 10 mL como el 100 % del sistema, se agregó el 20 % de extracto enzimático de *B. karatas*, y los porcentajes peso / peso de cada concentración del polímero y de fosfato de potasio. Se analizó el efecto de las concentraciones tanto de polímero como de la sal y el peso molecular del polímero en cada una de las respuestas las cuales se muestran a continuación.

#### **8.4 Extracción bifásica acuosa.**

Una vez realizados los diagramas de fases se procedió a realizar la extracción bifásica acuosa por el método de Bensch *et al.*, 2007, tomando en cuenta las relaciones entre concentración de PEG y concentración de fosfatos del diagrama de fase en cada uno de los puntos de equilibrio del diagrama. Los sistemas se realizaron con un volumen total de 10 mL, de los cuales el 20 % (p/p) corresponde al extracto enzimático. Los porcentajes de PEG y de fosfatos dependen del punto de equilibrio en el que desee trabajar. El procedimiento de la extracción bifásica fue el siguiente: en una probeta de 10 mL se agregaron 2 mL de extracto enzimático la cantidad en peso de PEG y la mezcla en peso de fosfatos y se completó el volumen a 10 mL con agua destilada, posteriormente se homogenizó el sistema y se dejó en reposo por 24 h al cabo de las cuales se separaron las fases con una pipeta y se procedió a analizar su contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y su actividad proteolítica sobre caseína (Ortega y Del Castillo, 1966).

#### **8.5 Determinación del contenido de proteínas.**

La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Lowry *et al.*, 1951, el cual se realizó de la siguiente manera: Se tomaron 50  $\mu$ L de cada una de las fases provenientes de la extracción bifásica y se adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo A, 2.5 mL de reactivo C, y se dejó reposar por 10 min; posteriormente agregaron 250  $\mu$ L de reactivo D y después de 30 minutos se leyó la absorbancia a 600 nm. La determinación se realizó por triplicado, ajustando contra un blanco de reactivos (250  $\mu$ L de reactivo A, 2.5mL de reactivo C y 250  $\mu$ L de reactivo D). Con dichas lecturas se calculó el contenido de proteína mediante la ecuación de la recta obtenida de una curva tipo de proteína (Anexo 2). Para calcular el contenido de proteína se usó una curva tipo de albúmina de suero de bovino (1 mg/mL en reactivo A).

#### **8.6 Determinación de actividad proteolítica sobre caseína.**

La actividad proteolítica sobre caseína se determinó mediante el método de Ortega y Del Castillo (1966), empleando como sustrato, caseína al 1 %, la cual se preparó disolviendo 2 g de caseína en 100 mL de regulador de fosfato de potasio 0.05 M pH 7.6 y sometiéndola a ebullición en baño maría durante 20 minutos para lograr su desnaturalización; se dejó enfriar y se llevó a un volumen de 190 mL con regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6. La finalidad de tener esta concentración en éste volumen fue que al agregarle la enzima la dilución la mezcla enzima-sustrato tuviera la concentración final de caseína de 1 %. Para realizar la medición de la actividad proteolítica se procedió de la siguiente manera; en un baño maría a temperatura de 37 °C, se colocaron los tubos de ensayo con 0.95 mL de caseína para su incubación durante 10 minutos, se agregaron 0.05 mL de la preparación enzimática y se dejaron actuar durante 10 minutos. La reacción se detuvo adicionando 1.5 mL de

ácido tricloroacético (ATC) al 5 %. Simultáneamente se corrió un testigo al que se le adicionó primero el ATC y al final la preparación enzimática. Al terminar la reacción las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 8000 rpm. Finalmente, los productos de la hidrólisis enzimática que se encontraron en el sobrenadante, aminoácidos libres y péptidos pequeños, se leyeron a 280 nm, contra un blanco de 2 mL de regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6 y 3 mL de ATC al 5 %. La actividad caseinolítica se determinó en presencia y ausencia del activador (agente reductor del grupo SH del sitio activo) cisteína, los datos se interpolaron en la curva tipo de Tirosina. La unidad Internacional de Tirosina (UT) es  $\mu\text{g}$  de Tirosina por mL de extracto enzimático o de mg muestra por minuto (Anexo 3).

### **8.7 Análisis de la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realizó de acuerdo al protocolo de Schägger y Von (Schägger y Von 1987). Modificada de la siguiente manera por García-Carreño (1993). Para la preparación del gel separador el cual se encuentra al 11 % se utilizan 2.75 mL de acrilamida-bisacrilamida (48 % poliacrilamida y 1.5 % bis-acrilamida) (ver anexo 4), 2.6 mL de regulador de gel, 1.3 g de glicerol, 3.3 mL de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio (10 %) y 8  $\mu\text{L}$  de TEMED (N, N, N, N' -tetrametilendiamina). Se vació la acrilamida en el molde para el gel y dejar polimerizar 15 minutos. Preparar el gel concentrador de acrilamida al 5 %, utilizando 0.7 mL de acrilamida-bisacrilamida, 1.5 mL de regulador del gel, 4 mL de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio y 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. La acrilamida se vació en la cámara de electroforesis Hoefer™ Dual Gel Caster (Amersham Biosciences U.S.A.). Se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 20 minutos. Después, se retiró el peine, se limpiaron los pozos con papel filtro y se colocaron en cada pozo 15  $\mu\text{L}$  de muestra (de cada fase) + 7  $\mu\text{L}$  de regulador de muestra, se pone a hervir por 5 minutos y se coloca en cada pozo 20  $\mu\text{L}$  de muestra. Para el marcador se agregó 6  $\mu\text{L}$  del marcador molecular y se colocaron en la cámara de electroforesis, por cada gel se colocó una corriente de 20 mA hasta que las muestras hayan recorrido todo el gel, utilizando un regulador del ánodo (Tris 0.2 M, pH 8.9) y un regulador del cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 N y SDS 0.1 %) como amortiguadores de corrida. Para visualizar la muestra en el gel, éste se sumergió en una solución teñidora (ácido acético 10 %, azul de bromofenol G-250, metanol o isopropanol al 40 % y agua destilada) por 12 horas, después se enjuaga el gel con agua destilada y se sumergió en una solución desteñidora (ácido acético 10 %, metanol o isopropanol al 40 % y agua destilada). Posteriormente se digitalizó la imagen del gel.

## 9. Resultados.

### 9.1 Rendimientos obtenidos de jugo de *Bromelia karatas*.

Los rendimientos obtenidos de un lote de frutos de *Bromelia karatas* obtenidos el 12-oct-2011 del cual se extrajo el del jugo se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Rendimiento de jugo y proteína.

<b>Kg de fruto</b>	<b>Litro de jugo</b>
1 Kg	0.254 ± 0.05 L
<b>Litros de jugo</b>	<b>Gramos de proteína</b>
1 L	1.7 ± 0.2 g

### 9.2 Elaboración de curvas binodales.

Las curvas binodales (figuras 3 y 4) se realizaron basándose en la metodología descrita por Babu (Babu *et al.*, 2008) y Bensch (Bensch *et al.*, 2007), la cual se mencionó en el punto 8.3 de la metodología, las curvas presentadas son el promedio de tres repeticiones, todas estas curvas se realizaron sin muestra a temperatura ambiente.

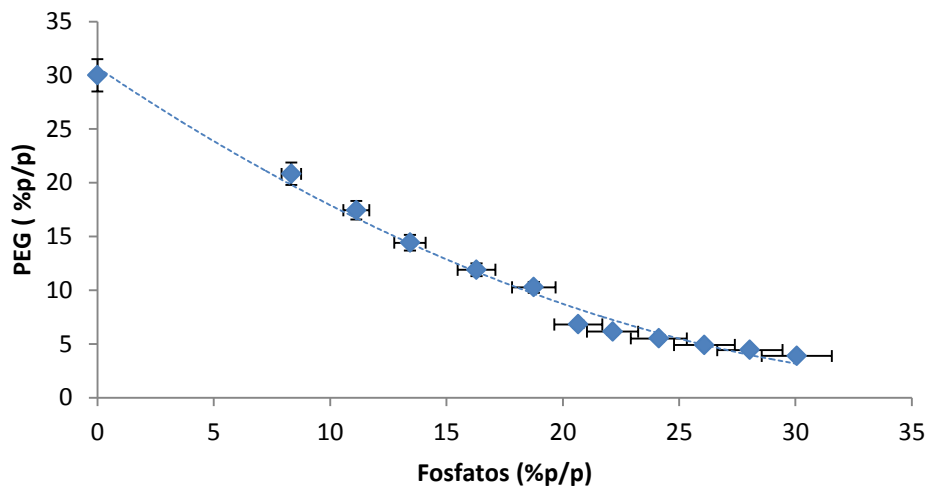


Figura 4. Curva binodal PEG-6000-fosfato de potasio.

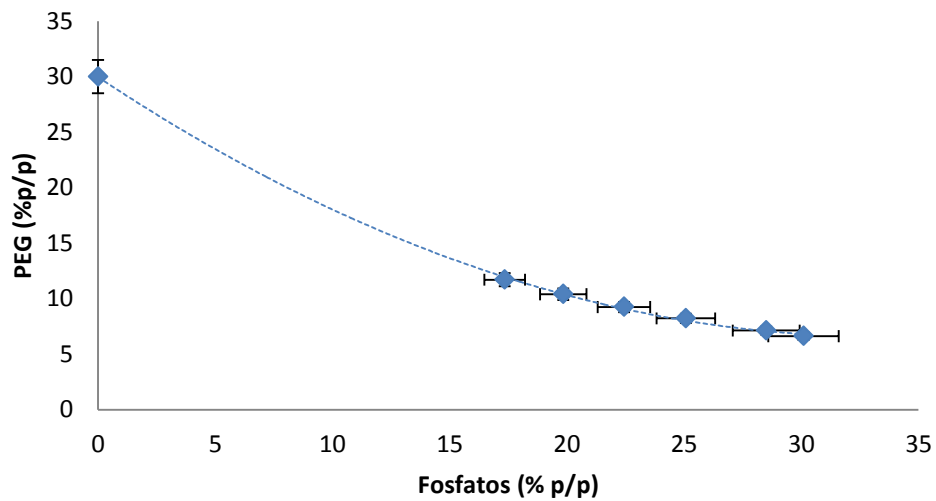


Figura 5. Curva Binodal PEG 1450-fosfato de potasio.

Una vez realizados las curvas binodales se ajustaron al modelo propuesto por Merchuck (Merchuck *et al.*, 1998) (ver ecuación 22) mediante una regresión no lineal, en las figuras 5 y 6 se muestran las curvas ajustadas. Los valores de las constantes y del coeficiente de correlación se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Constantes del modelo de Merchuck para cada sistema.

Constantes del modelo de Merchuck 1992 de la curva binodal compuesta por del regulador de fosfato de potasio al 30 % (p/p) y PEG 6000 al 30 % (p/p).		Constantes del modelo de Merchuck 1992 de la curva binodal compuesta por del regulador de fosfato de potasio al 30 % (p/p) y PEG 1450 al 30 % (p/p).	
A	33.3691	A	30.0529
B	-0.220564	B	-0.21611
C	0.0000412437	C	0.0000123017
R <sup>2</sup>	0.9996	R <sup>2</sup>	0.9985

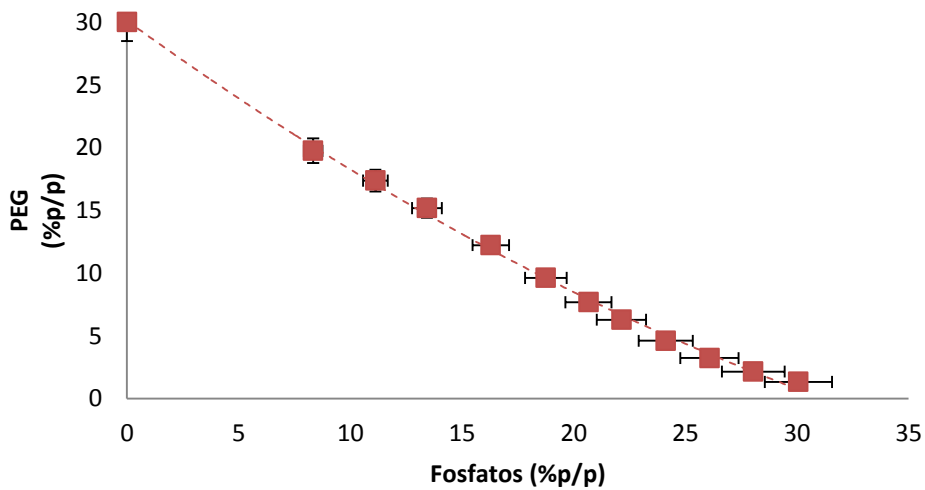


Figura 6. Diagrama de fase PEG 6000- fosfato de potasio ajustado al modelo de Merchuck.



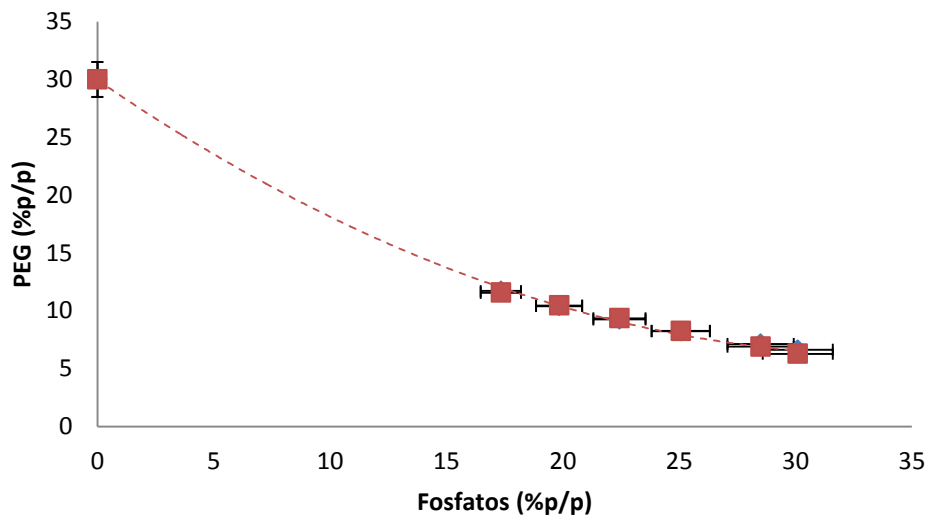


Figura 7. Diagrama de fases PEG 1450- fosfato de potasio ajustado al modelo de Merchuck.

Se ajustaron las curvas binodales al modelo de Merchuck (Merchuck *et al.*, 1998), debido a que solo se tienen datos y éste modelo presenta un ajuste por regresión no lineal por mínimos cuadrados, lo que brinda la ventaja de conocer los datos de un diagrama de fases solo teniendo la ecuación. Ya con las curvas binodales se procedió a determinar las líneas de equilibrio para cada peso molecular del polímero, esto se realizó tomando tres puntos distribuidos en la curva binodal de cada peso molecular, los cuales se elaboraron con agua desionizada y las concentraciones de fosfatos y PEG pertinentes a cada punto elegido, obteniéndose los diagramas de fases completos (ver figura 7 y 8).

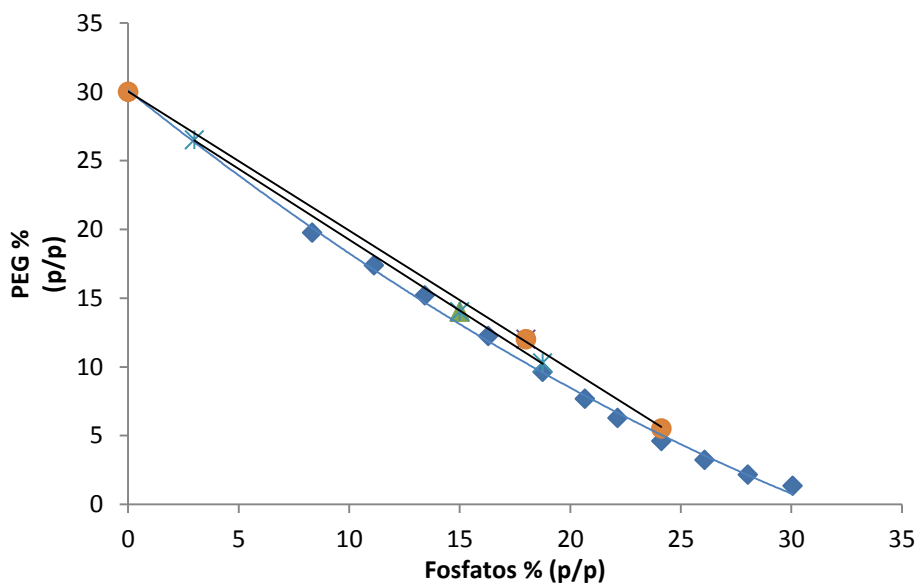


Figura 8. Diagrama de fases para el sistema PEG 6000 – fosfato de potasio.

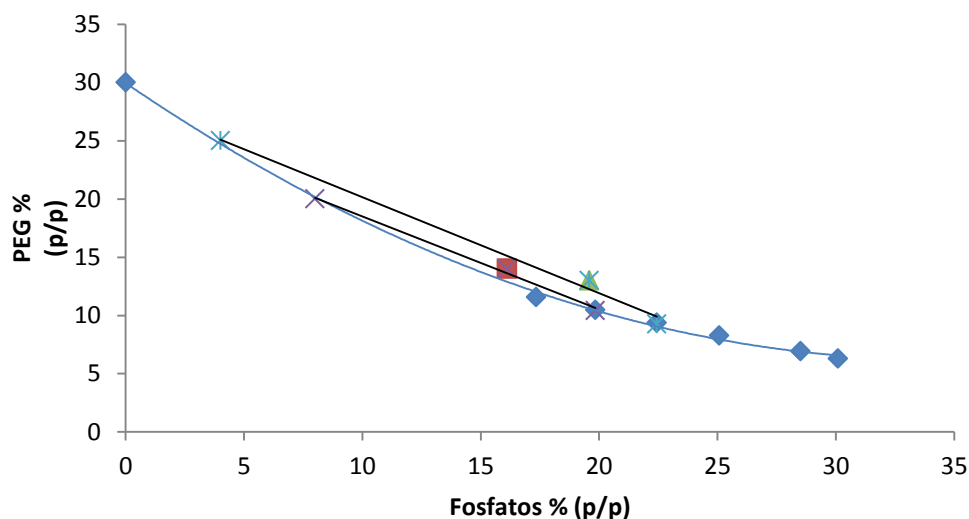


Figura 9. Diagrama de fases para el sistema PEG 1450 – fosfato de potasio.

Los valores de las líneas de equilibrio (LE) se calcularon con la ecuación 23 y la pendiente de las líneas de equilibrio (PLE) se determinó por regresión lineal, los datos se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Valores de LE y su pendiente (PLE).

Peso molecular del polietilenglicol	Concentración de PEG	Concentración de sal	LE	PLE
6000	10.3	18.75	20.32	-1.03
	5.5	24.12	26.17	-1.01
1450	10.4	19.84	23.12	-0.79
	9.2	22.43	25.03	-0.82

A medida que se incrementa el peso molecular del polímero usado en la extracción bifásica en sistemas acuosos (EBA), se incrementa la pendiente y la formación de las dos fases ocurre a bajas concentraciones de los componentes del sistema, esto debido a que la hidrofobicidad del PEG se incrementa y su solubilidad disminuye mientras mayor sea el peso molecular del polímero (Silvério *et al.*, 2012; Albertsson *et al.*, 1986), en nuestro caso se observó el mismo comportamiento.

### 9.3 Resultados del diseño de superficie de respuesta con un modelo central compuesto en el programa *Design expert*

#### 9.3.1 Factor de purificación

La primer respuesta que se evaluó fue el factor de purificación (FP), el cual se define según Babu *et al.*, 2008, como la actividad específica de la fase (actividad de la fase / concentración de proteína de la misma fase) entre la actividad específica del extracto enzimático, y se calcula a partir de la siguiente ecuación (ecuación 22).

$$FP = \frac{\frac{\text{Actividad en la fase}}{\text{Concentración proteína en la fase}}}{\frac{\text{Actividad inicial}}{\text{Concentración proteína inicial}}} \quad (22)$$

Donde la actividad está dada en UT/mL de extracto y el contenido de proteína en mg/mL, la actividad inicial es la del extracto enzimático antes de la extracción, de igual manera la concentración inicial de proteína.

La superficie de respuesta se representa mediante la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_{x_1} + \beta_{x_2} + \beta_{x_1x_2} \quad (23)$$

Donde  $\hat{y}$  es la respuesta promedio las  $\beta$  son los parámetros que deben determinarse,  $x_1$  es una variable que representa al primer factor,  $x_2$  es la variable que representa al segundo factor. Las variables  $x_1$  y  $x_2$  se definen en una escala codificada de -1 y +1, es decir, los niveles bajos y altos de los factores, las variables  $x_1x_2$  representan la interacción del primer y segundo factor.

En la figura 10 se muestra la gráfica de superficie de respuesta del experimento realizado con PEG-1450; se observó que tanto la concentración de fosfatos y la concentración del polímero tienen interacción y un efecto significativo en la extracción enzimática ya que la extracción alcanza su máximo cuando se tiene la concentración máxima de fosfatos (25 % p/p) y la concentración máxima del polímero (22 % p/p), al analizar la ecuación 24 la cual modela la superficie de respuesta para el factor de purificación utilizando PEG 1450 se puede apreciar que hay un mayor efecto por parte de la interacción de la concentración PEG y de fosfatos que por cada una de las concentraciones por separado, por otra parte, al aumentar la concentración de fosfatos y disminuir la concentración de PEG se observa un decremento en el valor del factor de purificación, y al disminuir la concentración de fosfatos y aumentar la concentración de PEG el valor del factor de purificación se incrementa.

$$\hat{y} = 3.75933 - 0.10347C_{PEG} - 0.24001C_{Fosfatos} + 0.010938C_{PEG*CFosfatos} \quad (24)$$

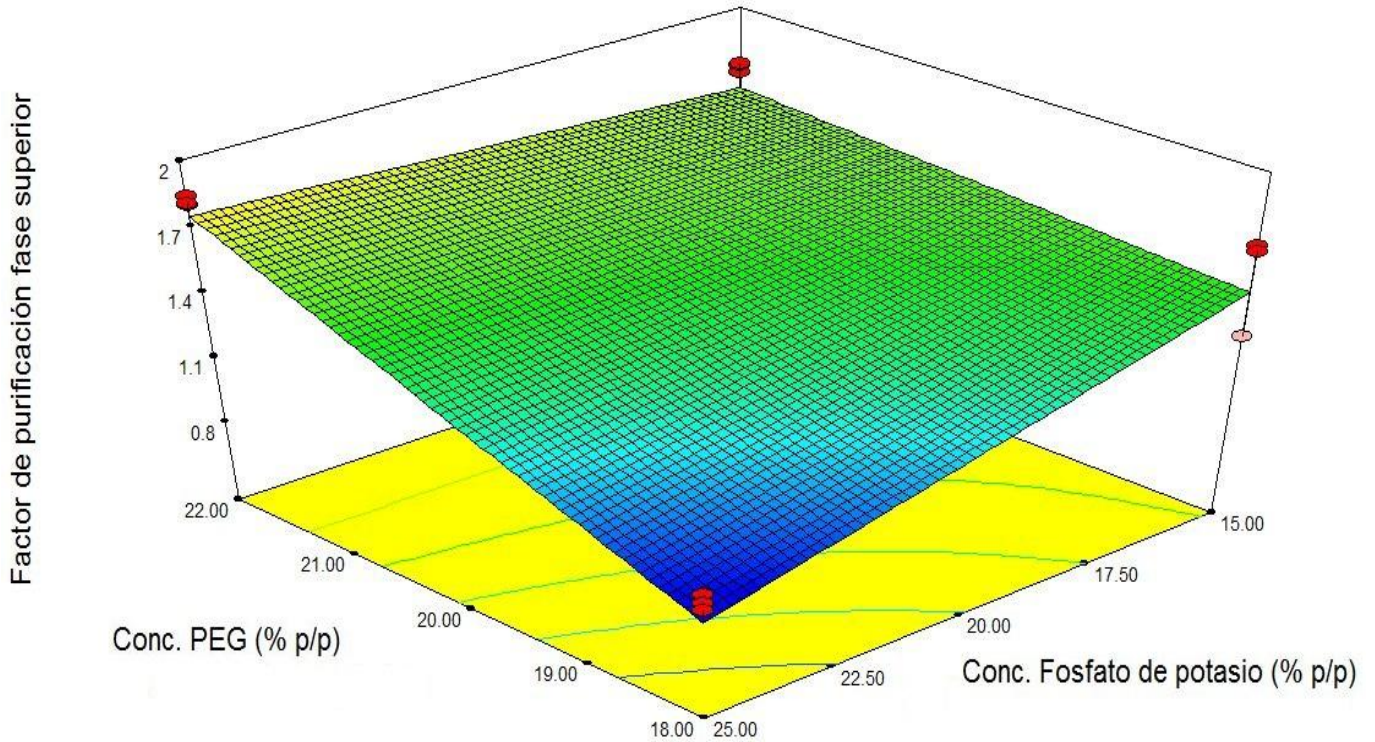


Figura 10. Superficie de respuesta factor de purificación fase superior PEG 1450 – fosfato de potasio.

Para el caso de la fase inferior utilizando el mismo peso molecular 1450 (Figura 11), se observó un comportamiento diferente al de la fase superior, la interacción entre la concentración de polímero y de sales no es muy fuerte lo que produce que la gráfica de superficie de respuesta sea un plano, en un inicio el efecto de la concentración de fosfatos es más importante a bajas concentraciones de PEG, sin embargo, la ecuación 25 que modela la superficie de respuesta nos da una idea más clara del comportamiento de los factores principales (concentración de PEG y de fosfato de potasio). El punto máximo de recuperación para la fase inferior se encuentra en las concentraciones de 15 % para fosfatos y 22 % para PEG (figura 12), alcanzando un valor de factor de purificación de más del doble del de la fase superior, siendo éste de 3.7 unidades en comparación con las 1.86 unidades de la fase superior.

$$\hat{y} = -8.00672 + 0.58980C_{PEG} + 0.22700C_{Fosfatos} - 0.015051C_{PEG*CFosfatos} \quad (25)$$

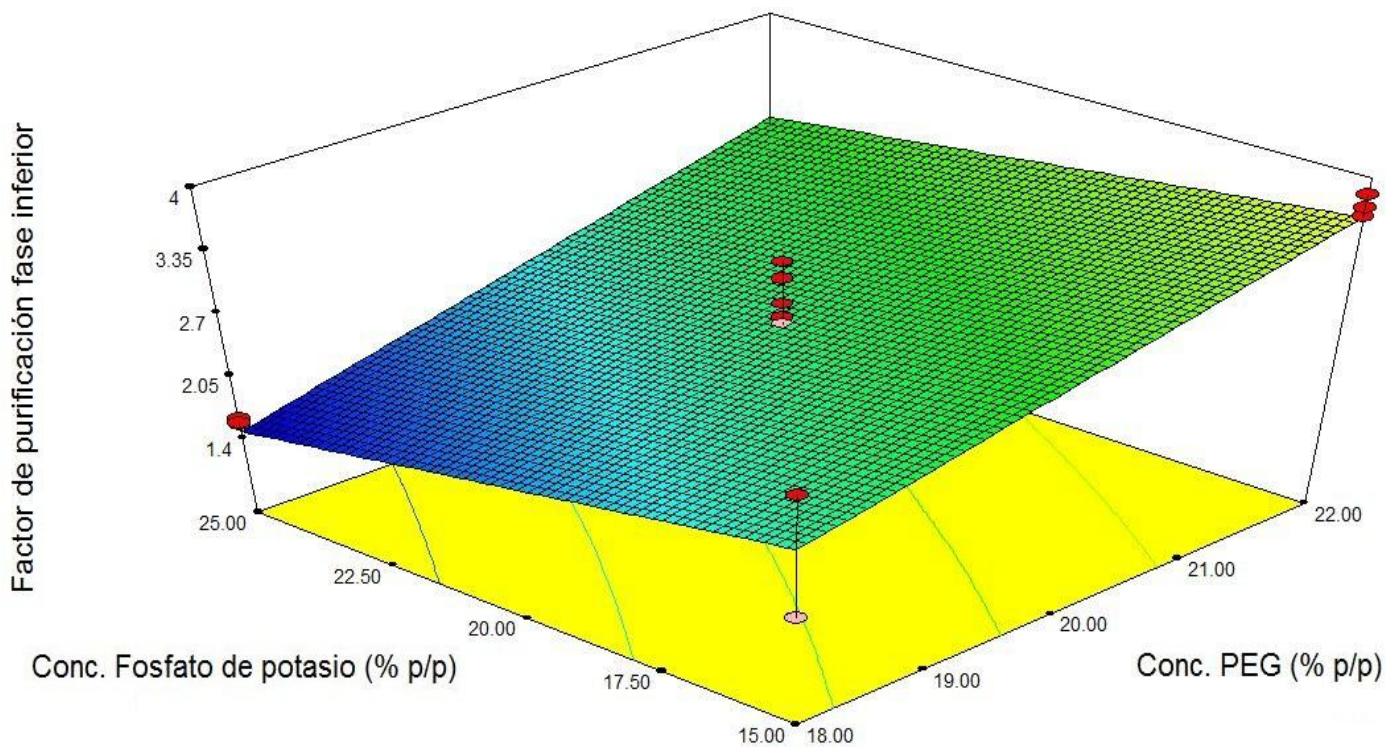


Figura 11. Superficie de respuesta factor de purificación fase inferior PEG 1450-fosfato de potasio.

Al analizar el sistema compuesto por PEG 6000–fosfatos (figura 12 y 13) que de igual manera que en la fase superior de PEG 1450, el mejor efecto se tienen en la mayor concentración de fosfatos y de PEG (22 % PEG y 25 % Fosfatos), alcanzando un valor máximo del factor de purificación cercano a dos unidades, analizando la ecuación 26 (ecuación de la superficie de respuesta de la fase superior), observamos que el valor de la interacción de la concentración de PEG y fosfatos es mayor que los valores de concentración por separado (figura 13).

$$\hat{y} = 4.43709 - 0.16378C_{PEG} - 0.22172C_{Fosfatos} + 0.010938C_{PEG*CFosfatos} \quad (26)$$

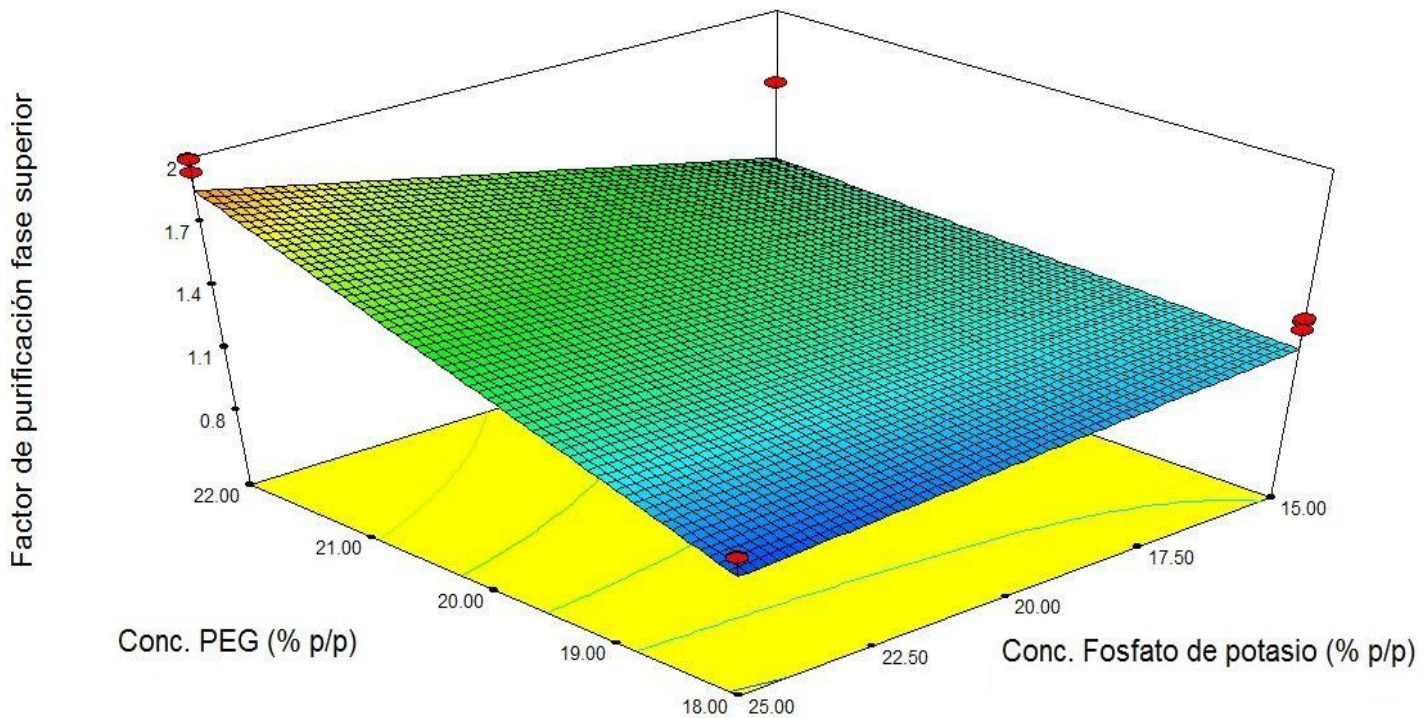


Figura 12. Superficie de respuesta factor de purificación fase superior PEG 6000- fosfato de potasio.

Para el caso de la fase inferior para el mismo peso molecular (figuras 13) se observó el mismo comportamiento que en la fase superior, a las concentraciones de 22 % (p/p) PEG y 25 % (p/p) de fosfatos, obteniéndose un factor de purificación de 3.8 unidades, éste valor es aproximadamente dos veces mayor que el obtenido en la fase superior, el cual fue de dos unidades, en la ecuación 27, se observó que el valor de la concentración de fosfatos es mayor que la concentración de PEG y que la interacción entre ambas concentraciones, lo que nos indica que ésta tiene un mayor efecto sobre la extracción.

$$\hat{y} = -0.95840 + 0.16554C_{PEG} + 0.29747C_{Fosfatos} + 0.010938C_{PEG*CFosfatos} \quad (27)$$

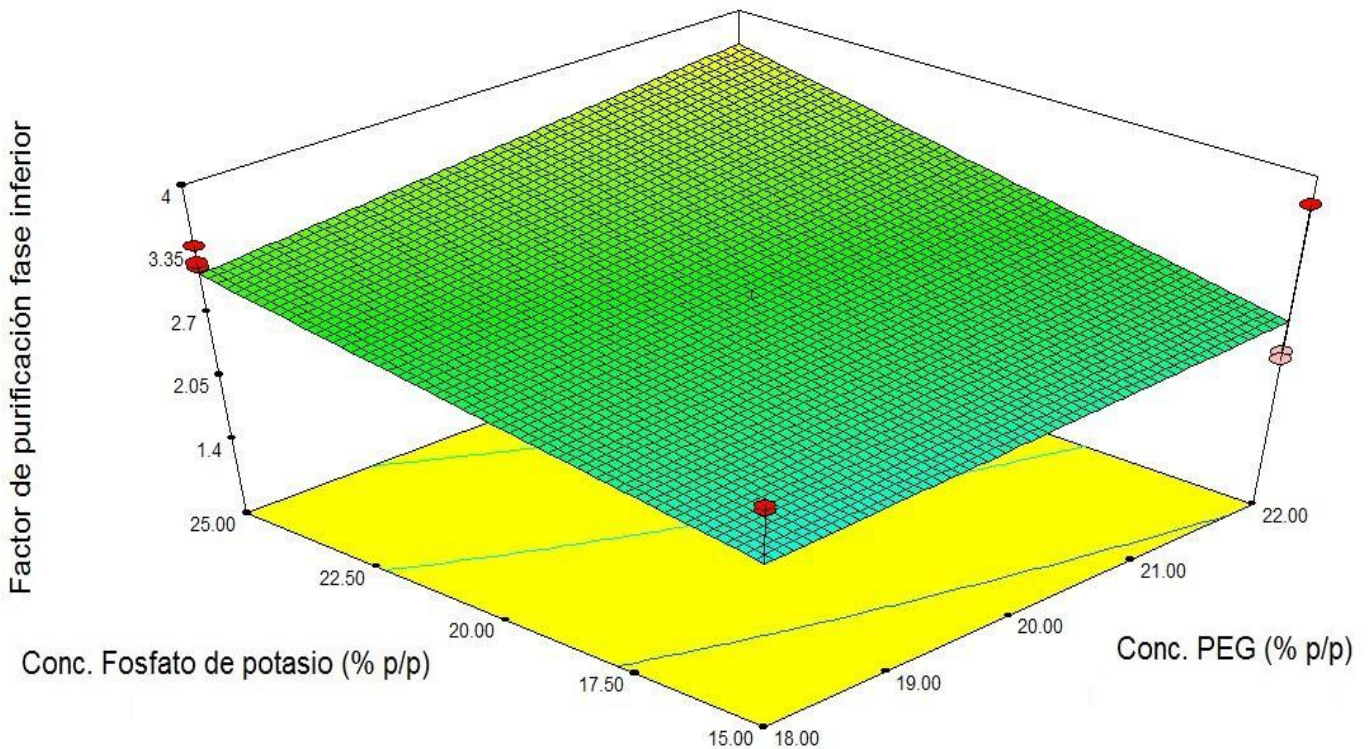


Figura 13. Superficie de respuesta factor de purificación fase inferior PEG 6000 – fosfato de potasio.

Una vez que se conoce la ecuación que modela la superficie de respuesta (ecuaciones 24-27) se realizó la comprobación para conocer qué tan acertadas son para la predicción de datos en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el cuadro 9 se muestran los resultados para el factor de purificación en la fase superior (FS) y la fase inferior (FI), el valor más alto del factor de purificación en la fase superior se registró en la corrida 4 (22 %(p/p) PEG 6000 y 25 %(p/p) fosfato de potasio) siendo ésta de 1.99 unidades, por otra parte el valor mínimo para la fase superior es en la corrida 1 (18 % (p/p) de PEG 1450 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 0.97 unidades, para el caso de la fase inferior se obtuvieron resultados similares a la fase superior encontrándose el valor máximo en la corrida 4 (22 %(p/p) PEG 6000 y 25 %(p/p) fosfato de potasio) siendo ésta de 4.23 unidades y el valor mínimo se obtuvo en la corrida 1 (18 % (p/p) de PEG 1450 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo ésta de 1.57 unidades, tanto en la fase superior como en la fase inferior las ecuaciones tienen un alto grado de predicción en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el anexo 5 se muestra el análisis de varianza para el factor de purificación, se observan valores de Prob > F menores a 0.05 indicando que los términos del modelo y sus ecuaciones para los dos pesos moleculares son significativos (no difiere de manera mucho de un modelo perfecto), el valor de F es significativo, esto debido a que solo hay 0.01 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo, la regresión de la ecuación obtenida después del ANOVA indica que el valor de  $R^2$  ordinaria es 0.9267 para la fase superior y de 0.7210 para la fase inferior, ésta mide la proporción de la variabilidad total explicada por el modelo un problema potencial con éste estadístico es que siempre se incrementa cuando se agregan factores al modelo

para lo cual se acude a el valor de  $R^2$  ajustada, el valor de  $R^2$  ajustada de 0.9083, esta es un estadístico que esta ajustado al tamaño del modelo, es decir, para el número de factores, la  $R^2$  ajustada puede decrecer en realidad si se agregan términos no significativos al modelo, sin embargo, para conocer el poder predictivo del modelo es necesario conocer el valor de PRESS (suma de cuadrados del error de predicción éste valor se calcula de los errores de predicción obtenidos al predecir el punto *i-ésimo* de los datos con un modelo que incluye todas las observaciones excepto la *i-ésima*), para conocer el poder de predicción del modelo se recurre al  $R^2$  de predicción el cual debe de ser menor a 1 para considerarse un buen predictor, en el caso de la fase superior el valor de  $R^2$  de predicción es 0.8633 y en la fase inferior es de 0.7642 (anexo 5) indicando que se tiene un 86.33 % y un 76.42 %, respectivamente, de poder predictivo, por otra parte el coeficiente de variación debe de ser menor a 10 % para que sea considerado aceptable, los valores del coeficiente de variación son: 7.01 % para la fase superior y 8.96 % para la fase inferior, lo que indica que los experimentos pueden ser precisos y reproducibles (Montgomery, 2011).

Cuadro 9. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo para el factor de purificación fase superior (FS) y fase inferior (FI).

Experimentos	Factor de purificación FS		Factor de purificación FI	
	Experimental	Modelo	Experimental	Modelo
1	0.97±0.0234	0.93	1.57±0.1004	1.72
2	1.54±0.2285	1.42	2.17±0.7336	2.22
3	1.29±0.0389	1.27	2.89±0.0316	2.75
4	1.99±0.0236	1.94	4.23±0.0996	4.09
5	1.12±0.0119	1.15	2.21±0.1028	2.19
6	1.73±0.0286	1.70	3.73±0.0283	3.87
7	1.82±0.2433	1.80	2.64±0.8836	2.69
8	1.10±0.0187	0.99	3.29±0.0996	3.25
9	1.28±0.0503	1.24	2.81±0.2711	2.62
10	1.38±0.0042	1.37	2.71±0.1101	2.48

Como se puede observar en los datos experimentales reportados en el cuadro 9, todos los experimentos tienen resultados diferentes, en algunos casos tienen resultados cercanos, así que se requiere probar todas las comparaciones de las medias ya que los experimentos tienen el mismo tamaño para los dos pesos moleculares del polietilenglicol probados, para esto se propuso la prueba de Tukey, la cual consiste en comparar todas las medias de los experimentos y probar si dos experimentos son estadísticamente diferentes haciendo un análisis



estadístico de la T de student, el cual mide dos medias muestrales, de un grupo de medias experimentales, estas diferencias se representan por letras, de manera que los experimentos cuyas medias comparten la misma letra son estadísticamente diferentes (Montgomery, 2011), los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el cuadro 10, se observó que de todos los experimentos solo ocho son estadísticamente distintos.

Cuadro 10. Prueba de Tukey para el factor de purificación en la fase superior (FS) y para la fase inferior (FI).

Experimentos	Factor de purificación(FS)		Factor de purificación (FI)	
	Factor de purificación Media	Prueba de Tukey	Factor de purificación Media	Prueba de Tukey
1	1.8237	A	3.727	A
2	1.7312	AB	3.287	AB
3	1.5413	BC	2.888	ABC
4	1.9882	BCD	2.812	B
5	1.3787	CD	2.712	BC
6	1.2919	CDE	2.641	BC
7	1.2792	DE	4.232	C
8	1.1196	EF	2.214	CD
9	1.0953	EF	2.170	CD
10	1.5359	E	1.574	D

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

### 9.3.2 Rendimiento

El factor de purificación mostró que en la fase inferior es donde se encuentran los mejores resultados. También se analizó el rendimiento de recuperación enzimática de los experimentos y la forma en la que este es afectado por el peso molecular del polímero y su concentración así como la concentración de fosfato de potasio. El rendimiento (Yücekan y Önal, 2011; Shahbaz *et al.*, 2008) se define de la siguiente manera:

$$R (\%) = \frac{100V_{FS} * KE}{V_{FS} * KE + V_{Fi}} \quad (28)$$

Donde  $V_{FS}$  es el volumen de la fase superior, KE es la constante de partición con respecto a la actividad enzimática y  $V_{Fi}$  es el volumen de la fase inferior.

Comenzaremos con el análisis del rendimiento utilizando PEG 1450 (figura 14), al tener una concentración de 22 % (p/p) de PEG y 15 % (p/p) de fosfato de potasio se alcanza un rendimiento máximo de 65 %, lo cual nos muestra que nuestra recuperación fue buena, al analizar la ecuación de la superficie de respuesta (ecuación 29) se observa que el valor de la interacción entre la concentración de PEG y de fosfatos es nula por lo que desaparece de la ecuación, por otra parte la ecuación muestra un mayor efecto por parte de la concentración de PEG que por parte de la concentración de fosfatos.

$$\hat{y} = 54.01712 + 1.26595C_{PEG} - 0.91866C_{Fosfatos} \quad (29)$$

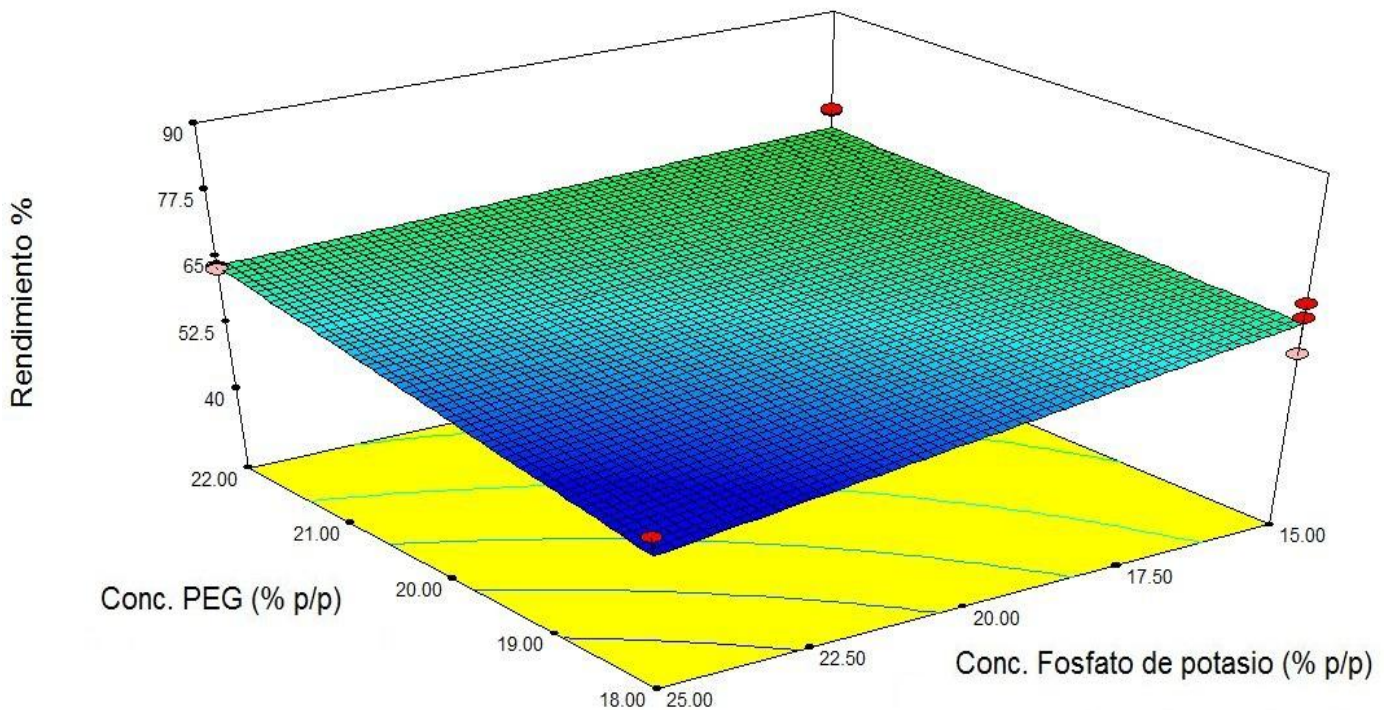


Figura 14. Superficie de respuesta para el rendimiento utilizando PEG 1450-fosfato de potasio.

Al analizar el valor del rendimiento en el sistema que tiene el peso molecular de 6000 (figura 15), se observó un comportamiento diferente al del PEG 1450, el valor máximo se encuentra en la concentración de 22 % (p/p) PEG y 25 % (p/p) fosfatos, el valor máximo para el rendimiento fue de 86 % (figura 15), éste valor es más elevado de los dos sistemas analizados, por otra parte al analizar la ecuación (ecuación 30) se observó el mismo comportamiento que con el PEG 1450, ya que el valor de interacción entre la concentración de PEG y de fosfato de potasio es nula y el efecto de la concentración de PEG es mayor que el de la concentración de fosfato de

potasio, las ecuaciones 29 y 30 son muy similares. Los valores de rendimiento muestran que el mejor efecto en el rendimiento se encuentra utilizando el PEG 6000.

$$\hat{y} = 60.59547 + 1.26595C_{PEG} - 0.91866C_{Fosfatos} \quad (30)$$

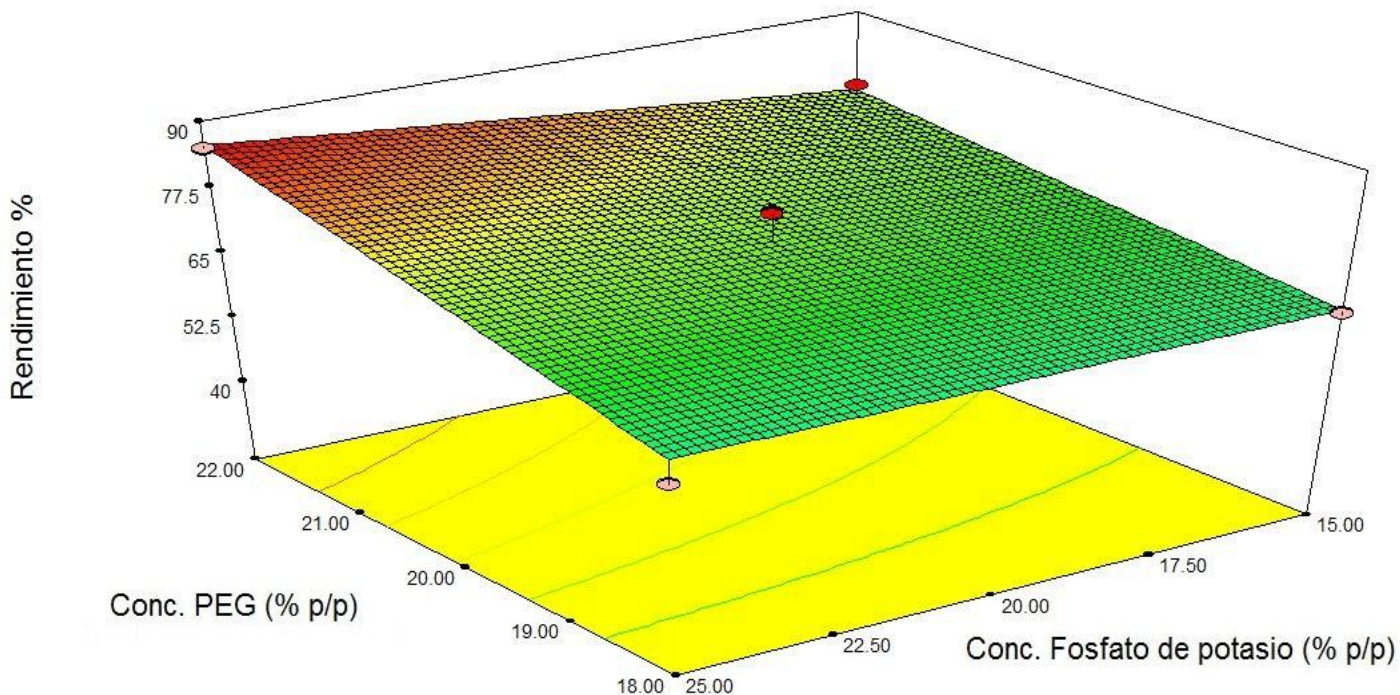


Figura 15. Superficie de respuesta para el rendimiento utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.

Conociendo las ecuaciones que modelan el rendimiento (ecuaciones 29 y 30) se realizó la comprobación para conocer qué tan acertadas son para la predicción de datos en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el cuadro 11 se muestran dichos resultados para el rendimiento para el PEG 1450 y 6000, el valor más alto para la KE se registró en la corrida 4 (22 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio) siendo esta de 84.97 %, por otra parte el valor mínimo se registro en la corrida 1 (18 % (p/p) de PEG 1450 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 52.54 %, tanto en el PEG 1450 como para el PEG 6000 las ecuaciones tienen un alto grado de predicción en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el anexo 5 se muestra el análisis de varianza para el rendimiento, se observan valores de Prob > F menores a 0.05 indicando que los términos del modelo y sus ecuaciones para los dos pesos moleculares son significativos (no difiere de manera mucho de un modelo perfecto), el valor de F es significativo, esto debido a que solo hay 0.01 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo.

La regresión de la ecuación obtenida después del ANOVA indica que el valor de  $R^2$  ordinaria es 0.8603, el valor de  $R^2$  ajustada de 0.8403, en el caso del rendimiento, el valor de  $R^2$  de predicción es 0.8051 (anexo 5) indicando que se tiene un 80.51 de poder predictivo, por otra parte el coeficiente de variación debe de ser menor a 10 % para que sea considerado aceptable, el valor del coeficiente de variación es 6.45 %, lo que indica que los experimentos pueden ser precisos y reproducibles (Montgomery, 2011).

Por otro lado, todos los experimentos tienen resultados diferentes, en algunos casos tienen resultados cercanos, así que se requiere probar todas las comparaciones de las medias ya que los experimentos tienen el mismo tamaño para los dos pesos moleculares del polietilenglicol probados, para esto se propuso la prueba de Tukey, la cual consiste en comparar todas las medias de los experimentos y probar si dos experimentos son estadísticamente diferentes, estas diferencias se representan por letras, de manera que los experimentos cuyas medias comparten la misma letra son estadísticamente diferentes (Montgomery, 2011), los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el cuadro 11, se observó que de todos los experimentos son estadísticamente distintos.

Cuadro 11. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para el Rendimiento (%).

Experimentos	Rendimiento %			
	Experimental	Modelo	Rendimiento (Media)	Prueba de Tukey
1	52.54±0.092	53.84	77.724	A
2	62.73±4.867	63.02	71.130	B
3	64.00±0.043	69.60	70.374	BC
4	84.97±0.136	75.48	63.996	BCD
5	77.72±0.161	67.54	63.515	CD
6	71.13±0.136	68.09	62.731	D
7	63.51±5.976	58.90	60.462	DE
8	60.46±0.250	60.42	57.931	DEF
9	57.93±0.683	60.96	84.967	EF
10	70.37±0.209	74.67	52.541	F

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Comparando resultados obtenidos por métodos tradicionales de enzimas similares (bromelaína y hemisfericina) se encontró que Orozco en el 2003 realizó varios experimentos de purificación y extracción de bromelaína y hemisfericina, utilizando microfiltración, ultrafiltración con membrana de 100 kDa, una ultrafiltración con membranas de 30 kDa y una ultrafiltración utilizando membranas de 10 kDa. Obteniendo rendimientos de 64 %, 63 %, 61 % y 54 % respectivamente para el caso de la hemisfericina y rendimientos de 91.5 %, 63.8 %, 55.2 % y 30 % respectivamente para el caso de la bromelaína, es importante aclarar que en el trabajo de Orozco se utilizó una muestra tratada previamente, al comparar con los resultados del rendimiento obtenidos en éste trabajo utilizando la técnica EBA y trabajando con una preparación cruda, se observa que en un solo paso se obtienen rendimientos en todas las condiciones probadas por encima del 60 %, obteniéndose en las mejores condiciones resultados arriba del 70 % siendo estos mejores que los obtenidos el caso de la purificación de hemisfericina y que la bromelaína purificada por ultrafiltración utilizando diferentes diámetros de poro.

### 9.3.3 Constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE)

La constante de partición con respecto a la actividad enzimática muestra cómo se encuentran en equilibrio la actividad enzimática en las fases de la extracción, para el sistema con peso molecular 1450 se alcanza un máximo de 1.16 unidades a 22 % (p/p) PEG y 25 % de fosfato de potasio, éste comportamiento se puede apreciar en la figura 16, al analizar la ecuación de la superficie de respuesta (ecuación 31) se puede observar que el efecto que tiene a interacción de las concentraciones de PEG y de fosfato de potasio es mayor que el efecto de las concentraciones de PEG y fosfato de potasio por separado, por otra parte, hay un efecto negativo por parte de las concentraciones de PEG y fosfato de potasio en la constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE)

$$\hat{y} = 3.17557 - 0.10932C_{PEG} - 0.10121C_{Fosfatos} + 0.00521647C_{PEG*CFosfatos} \quad (31)$$

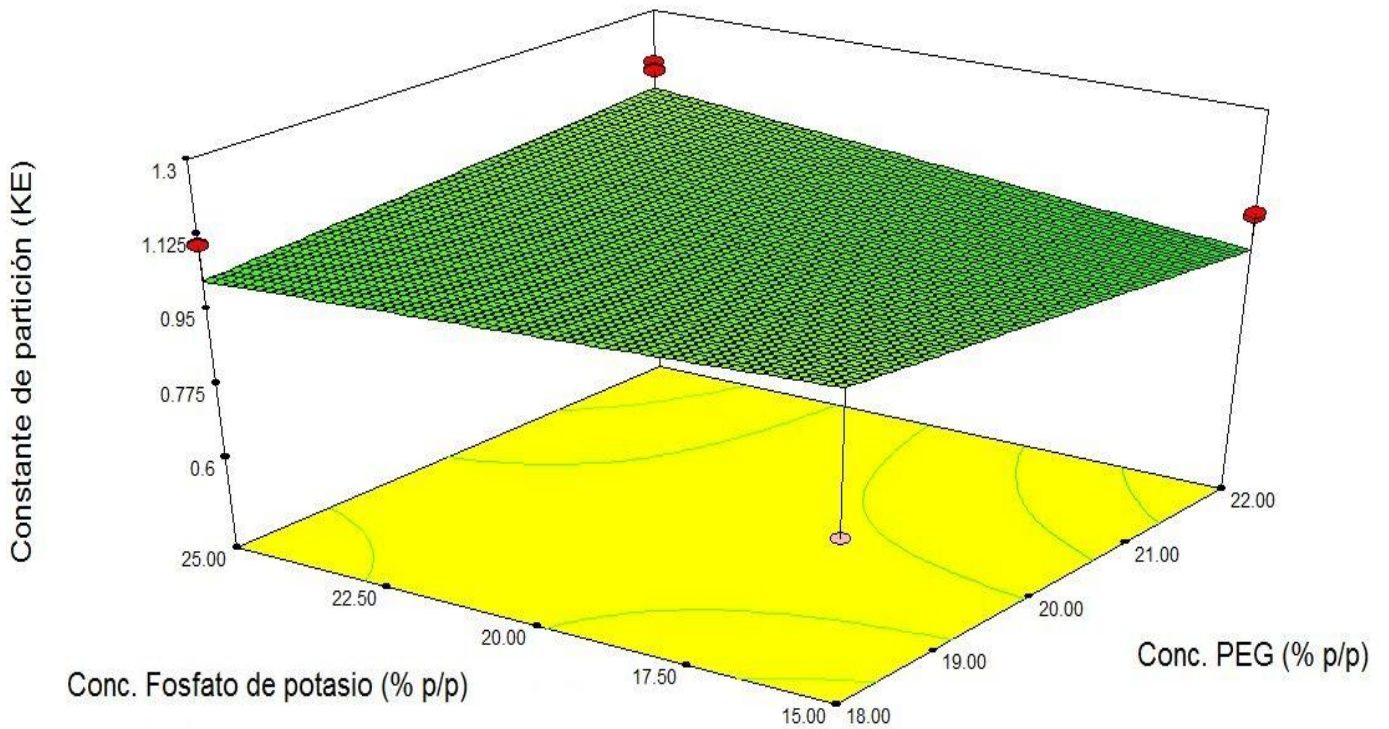


Figura 16. Superficie de respuesta para la KE utilizando PEG 1450-fosfato de potasio.

Al analizar el comportamiento de la constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE) en el sistema PEG 6000–fosfato de potasio (figura 17), se obtiene un valor máximo de 1.22 a las concentraciones utilizando 22 % (p/p) PEG y 25 % (p/p) de fosfato de potasio, los mejores resultados se obtienen utilizando el peso molecular 6000 y las mayores concentraciones de Fosfatos y PEG. Al analizar la ecuación de la superficie de respuesta (ecuación 32) se observa que el efecto de la KE esta dominado por la interacción entre las concentraciones de PEG y fosfato de potasio y la concentración de PEG en el sistema, de manera que la concentración de PEG domina el efecto de la constante de partición ya que el efecto de la concentración de fosfato de potasio es negativo.

$$\hat{y} = 0.78527 + 0.00318507 C_{PEG} - 0.10145 C_{Fosfatos} + 0.00521647 C_{PEG * CFosfatos} \quad (32)$$

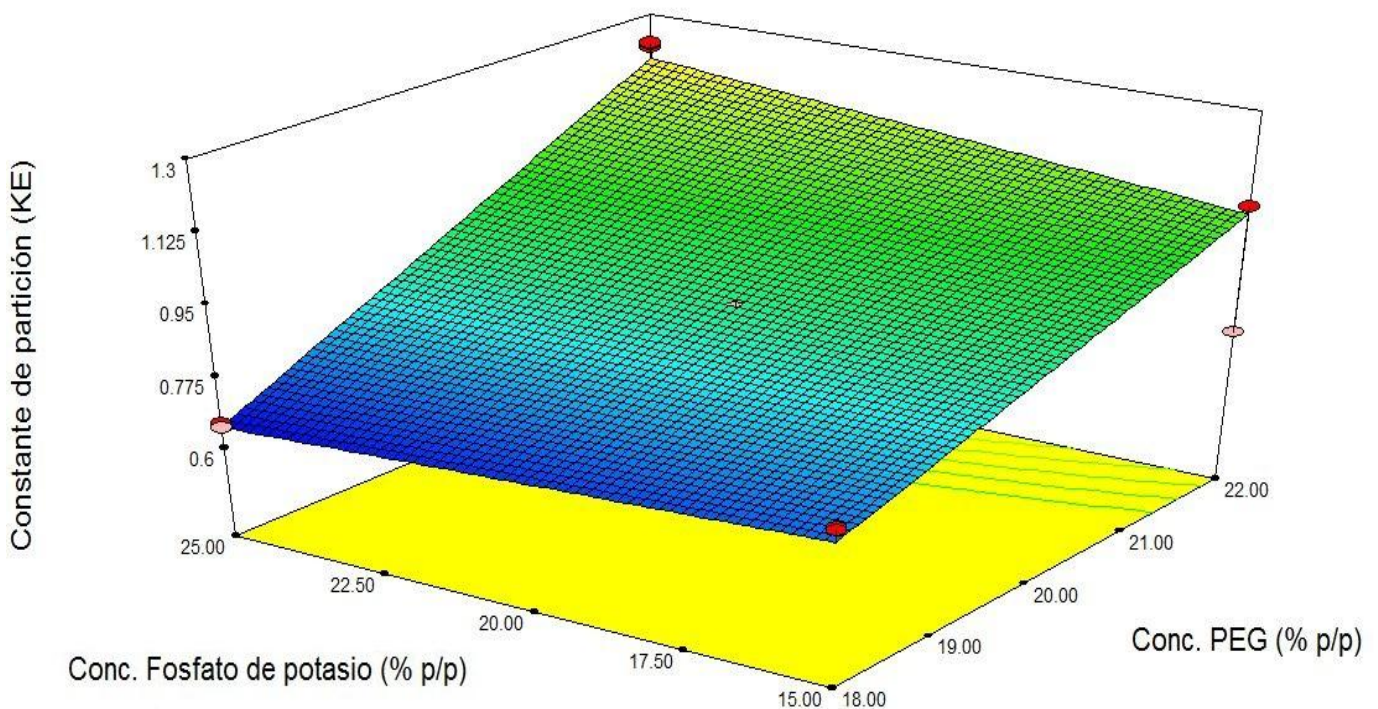


Figura 17. Superficie de respuesta para la KE utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.

Conociendo las ecuaciones que modelan la KE (ecuaciones 31 y 32) se realizó la comprobación para conocer qué tan acertado es el modelo para la predicción con los datos obtenidos experimentalmente, en el cuadro 12 se muestran dichos resultados para la KE utilizando el PEG 1450 y 6000, el valor más alto para la KE se registró en la corrida 4 (22 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio) siendo esta de 1.22 unidades, por otra parte el valor mínimo se registro en la corrida 8 (18 % (p/p) de PEG 6000 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 0.66 unidades, tanto en el PEG 1450 como para el PEG 6000 las ecuaciones tienen un alto grado de predicción en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el anexo 5 se muestra el análisis de varianza para el rendimiento, se observan valores de Prob > F menores a 0.05 indicando que los términos del modelo y sus ecuaciones para los dos pesos moleculares son significativos (no difiere de manera mucho de un modelo perfecto), el valor de F es significativo, esto debido a que solo hay 0.01 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo, la regresión de la ecuación obtenida después del ANOVA indica que el valor de  $R^2$  ordinaria es 0.7805, el valor de  $R^2$  ajustada es de 0.7598, en el caso de la KE, el valor de  $R^2$  de predicción es 0.7287 (anexo 5) indicando que se tiene un 72.87 % de poder predictivo, por otra parte el coeficiente de variación debe de ser menor a 10 % para que sea considerado aceptable, el valor del coeficiente de variación es 9.84 %, lo que indica que los experimentos pueden ser precisos y reproducibles (Montgomery, 2011).

Por otro lado, todos los experimentos tienen resultados diferentes, en algunos casos tienen resultados cercanos, así que se requiere probar todas las comparaciones de las medias ya que los experimentos tienen el mismo tamaño para los dos pesos moleculares del polietilenglicol probados, para esto se propuso la prueba de Tukey, la cual consiste en comparar todas las medias de los experimentos y probar si dos experimentos son estadísticamente diferentes, estas diferencias se representan por letras, de manera que los experimentos cuyas medias comparten la misma letra son estadísticamente diferentes (Montgomery, 2011), los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el cuadro 12, se observó que de todos los experimentos solo ocho son estadísticamente distintos.

Cuadro12. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para KE.

Experimentos	Constante de partición con respecto a la actividad enzimática (KE)			
	Experimental	Modelo	KE Media	Prueba de Tukey
1	1.11±0.0047	1.02	1.220	A
2	1.15±0.3328	1.10	1.160	AB
3	0.76±0.0019	0.73	1.149	AB
4	1.22±0.0067	1.19	1.107	B
5	0.87±0.0251	0.91	1.056	BC
6	1.06±0.0045	0.97	1.055	C
7	1.16±0.2891	1.11	0.918	CD
8	0.66±0.0125	0.65	0.872	CD
9	0.92±0.0082	1.05	0.761	D
10	1.06±0.0057	1.06	0.655	E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

#### 9.3.4 Constante de partición con respecto al contenido de proteína (KP)

La constante de partición con respecto al contenido de proteína en las fases da información del equilibrio entre las fases, en la figura 18 se muestra el comportamiento del sistema PEG 1450–fosfato de potasio, el valor máximo que alcanza la KP para éste peso molecular es de 2.15 unidades con una concentración de 22 % (p/p) PEG y 15 % (p/p) fosfato de potasio, al analizar la ecuación de superficie de respuesta de la constante de



partición (ecuación 33), se observó que a diferencia de los datos obtenidos en la KE usando el mismo peso molecular del polímero en la que el efecto estaba dominado por la interacción entre ambas concentraciones, el mayor efecto esta dado por de la concentración de PEG que por parte de la concentración de fosfato de potasio, por otro lado se observa un efecto negativo por parte de la interacción de ambas concentraciones, lo que nos indica que el efecto dominante para ésta respuesta es el “volumen de exclusión” ya que depende del volumen de la fase rica en PEG aunque también hay un efecto significativo por parte de la concentración de fosfatos, lo cual es coherente con lo la teoría de la extracción bifásica, que explica que el efecto principal que regula la separación de las proteínas en solución es el efecto “salting out” el cual hace que las enzimas o proteínas catiónicas migren hacia la fase superior rica en polímero (Bohinski, 1991).

$$\hat{y} = -5.85115 + 0.40315C_{PEG} + 0.31041C_{Fosfatos} - 0.016327C_{PEG*CFosfatos} \quad (33)$$

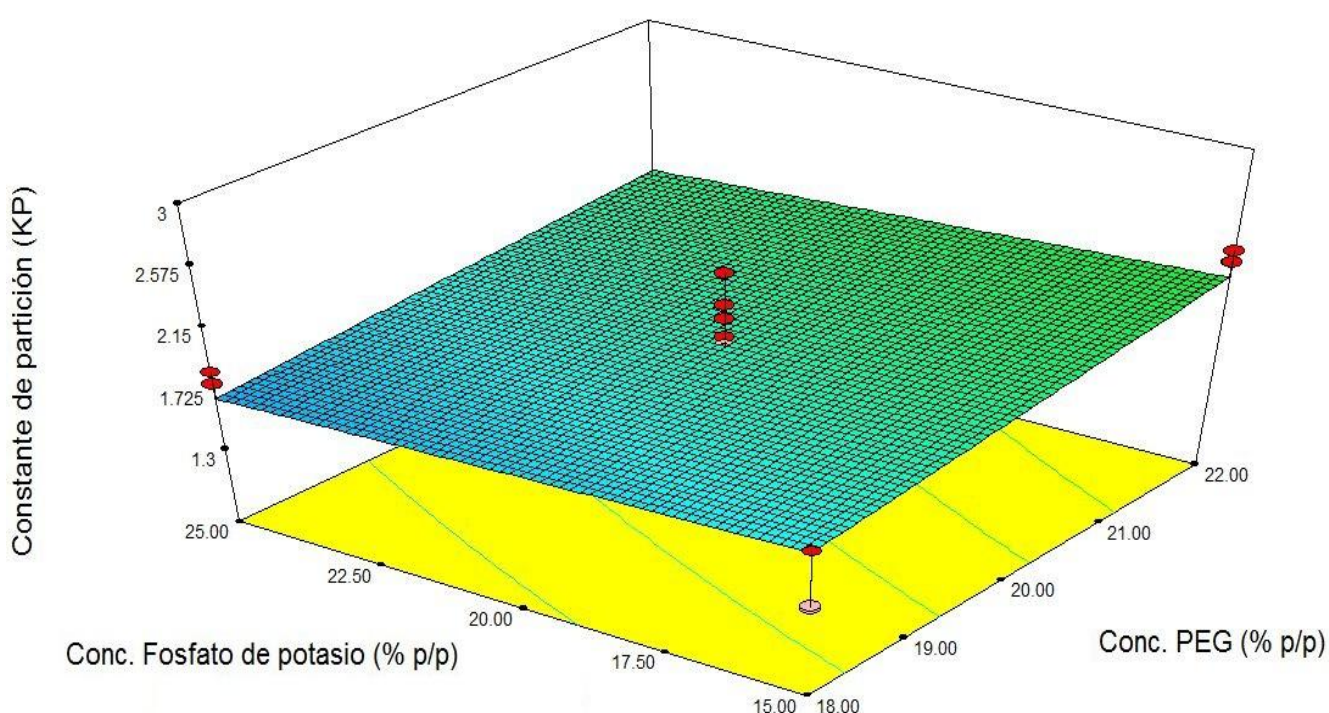


Figura 18. Superficie de respuesta para la KP utilizando PEG 1450–fosfato de potasio.

Al analizar el efecto del PEG 6000 y de la concentración de PEG y fosfato de potasio en la KP (figura 19), se observa que el valor máximo para la KP es de 2.5 unidades utilizando las concentraciones de 22 % (p/p) de PEG y 25 % (p/p) de fosfato de potasio, al analizar la ecuación de la superficie de respuesta para la KP utilizando PEG 6000, se observa un comportamiento similar al obtenido utilizando el PEG 1450, al analizar la ecuación 34 se

observa que el mayor efecto está dado por de la concentración de PEG que por parte de la concentración de fosfato de potasio, por otro lado se observa un efecto negativo por parte de la interacción de ambas concentraciones.

$$\hat{y} = -5.10502 + 0.34215C_{PEG} + 0.33062C_{Fosfatos} - 0.016327C_{PEG*CFosfatos} \quad (34)$$

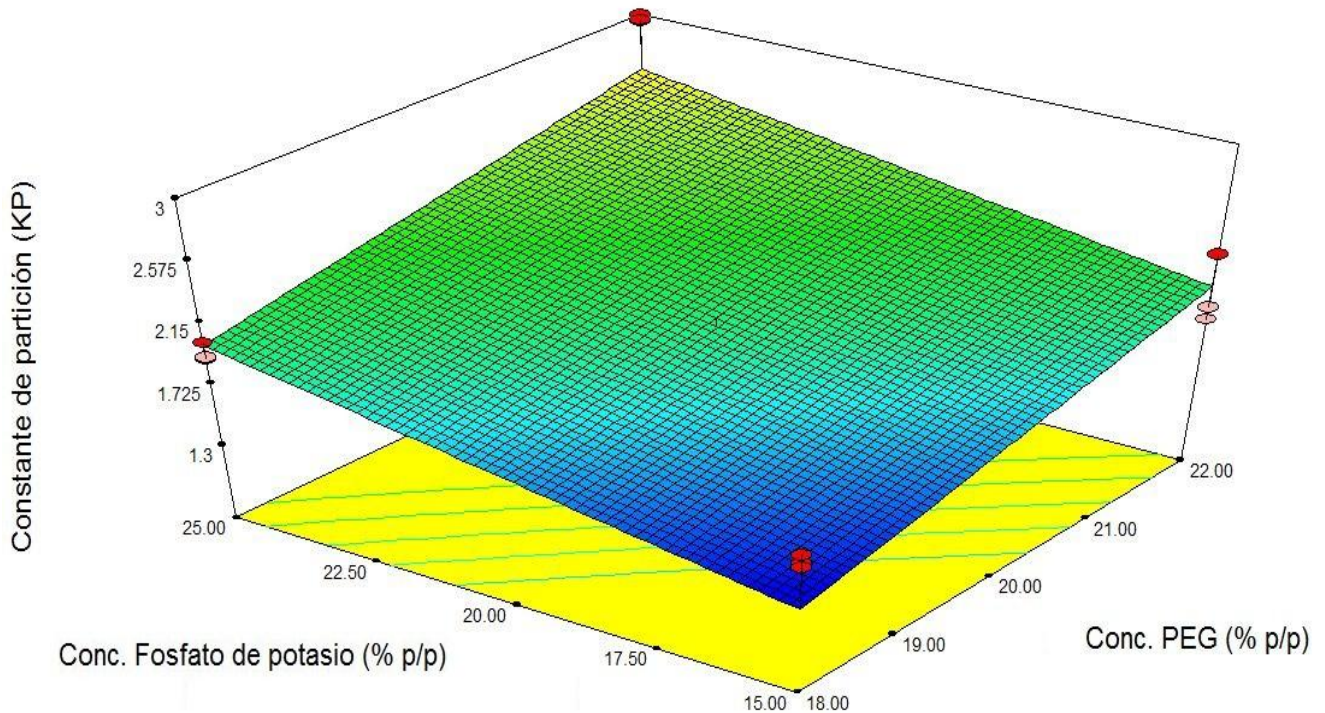


Figura 19. Superficie de respuesta para la KP utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio.

Conociendo las ecuaciones que modelan la KP (ecuaciones 33 y 34) se realizó la comprobación para conocer qué tan acertado es el modelo para la predicción de datos en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el cuadro 13 se muestran dichos resultados para la KP utilizando el PEG 1450 y 6000, el valor más alto para la KP se registró en la corrida 4 (22 %(p/p) PEG 6000 y 25 %(p/p) fosfato de potasio) siendo esta de 2.81 unidades, por otra parte el valor mínimo se registro en la corrida 2 (18 % (p/p) de PEG 1450 y 15 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 1.54 unidades, tanto en el PEG 1450 como para el PEG 6000 las ecuaciones tienen un alto grado de predicción en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el anexo 5 se muestra el análisis de varianza para el rendimiento, se observan valores de Prob > F menores a 0.05 indicando que los términos del modelo y sus ecuaciones para los dos pesos moleculares son significativos (no difiere de manera mucho de un modelo perfecto), el valor de F es significativo, esto debido a que solo hay 0.02 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo. La regresión de la ecuación obtenida después del ANOVA indica que el valor de R<sup>2</sup> ordinaria es 0.6742, el valor

de  $R^2$  ajustada de 0.6458, en el caso de la KP, el valor de  $R^2$  de predicción es 0.6189 (anexo 5) indicando que se tiene un 61.89 % de poder predictivo, por otra parte el coeficiente de variación debe de ser menor a 10 % para que sea considerado aceptable, el valor del coeficiente de variación es 9.06 %, lo que indica que los experimentos pueden ser precisos y reproducibles (Montgomery, 2011).

Por otro lado, todos los experimentos tienen resultados diferentes, en algunos casos tienen resultados cercanos, así que se requiere probar todas las comparaciones de las medias ya que los experimentos tienen el mismo tamaño para los dos pesos moleculares del polietilenglicol probados, para esto se propuso la prueba de Tukey, la cual consiste en comparar todas las medias de los experimentos y probar si dos experimentos son estadísticamente diferentes, estas diferencias se representan por letras, de manera que los experimentos cuyas medias comparten la misma letra son estadísticamente diferentes (Montgomery, 2011), los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el cuadro 13, se observó que de todos los experimentos son estadísticamente distintos.

Cuadro 13. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para KP.

Experimentos	Constante de partición con respecto a la proteína (KP)			
	Experimental	Modelo	KP Media	Prueba de Tukey
1	1.81±0.0457	1.82	2.273	A
2	1.54±0.2347	1.65	2.020	AB
3	1.70±0.0496	1.65	1.988	ABC
4	2.81±0.0779	2.70	1.967	BC
5	1.73±0.0751	1.89	2.807	B
6	2.27±0.0453	2.29	1.805	BCD
7	1.68±0.2418	1.80	1.725	CD
8	1.97±0.0119	1.82	1.703	D
9	2.02±0.2045	1.89	1.681	CD
10	1.99±0.0616	2.29	1.535	E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

### 9.3.5 Actividad recuperada

La actividad recuperada la define Babu (Babu *et al.*, 2008) como una relación entre la actividad en cada fase por el volumen de la fase, esta relación viene dada por la ecuación 35, es un parámetro porcentual parecido al rendimiento, solo que el rendimiento explica la forma en la que funciona el sistema de manera general, por otro lado la actividad recuperada nos brinda información de cada fase, nos muestra la cantidad en porcentaje de enzima en cada fase.

$$A_{Recuperada} = \frac{\text{Actividad en fase} \cdot \text{volumen de fase}}{\text{Actividad inicial} \cdot \text{volumen inicial del sistema}} \times 100 \quad (35)$$

Al referirse al volumen inicial del sistema, refiere al volumen inicial del experimento, antes de que se lleve a cabo la extracción, es decir, cuando solo se tiene una sola fase. Ahora analizaremos el comportamiento de la actividad en cada una de las fases

#### a) Actividad recuperada fase superior

En el caso de la actividad recuperada en la fase superior la superficie de respuesta se muestra en la figura 20 para el caso del PEG 1450, el valor máximo que alcanza la actividad recuperada es de 66 % utilizando una concentración de 22 % (p/p) de PEG y 15 % (p/p) de fosfato de potasio, al analizar la ecuación 36, se observa que el efecto de la interacción de las concentraciones de PEG y fosfato de potasio es nula por lo cual desaparece de la ecuación, por otro lado, la concentración de PEG es la que demuestra un mayor efecto que la concentración de fosfato de potasio, ya que éste último presenta un efecto negativo.

$$\hat{y} = 32.15077 + 1.84418 C_{PEG} - 0.99906 C_{Fosfatos} \quad (36)$$

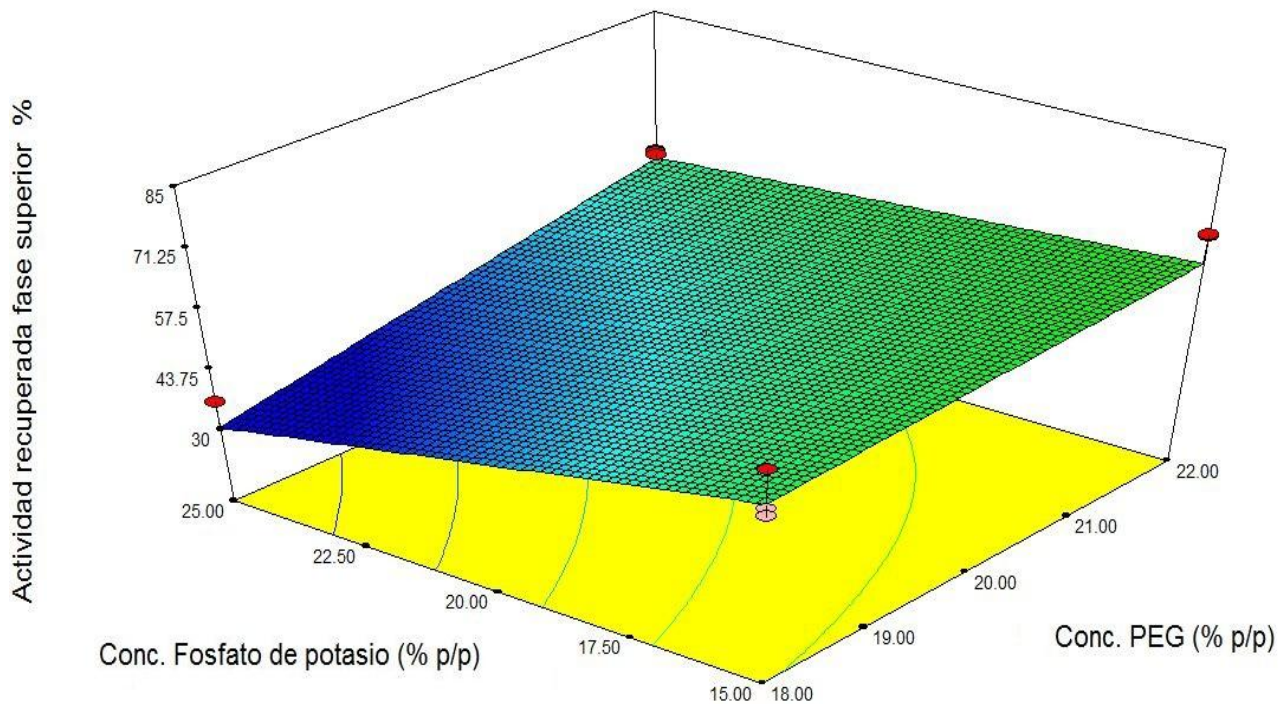


Figura 20. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase superior utilizando PEG 1450 – fosfato de potasio.

Al analizar la actividad recuperada en la fase superior del peso molecular 6000 (figura 21), el valor máximo para la actividad recuperada utilizando PEG 6000 es de 84.97 % utilizando una concentración de 22 % (p/p) de PEG y 25 % (p/p) de fosfato de potasio, en comparación con el resultado obtenido con el PEG 1450 que alcanzo a penas un valor del 66 %. Al analizar la ecuación 37 que es la ecuación que modela la superficie de respuesta, se observó que al igual que con el sistema 1450 el valor de la interacción de las concentraciones de PEG y fosfato de potasio es nula de la misma manera el efecto dominante es el de la concentración de PEG.

$$\hat{y} = 41.82071 + 1.84418C_{PEG} - 0.99906C_{Fosfatos} \quad (37)$$

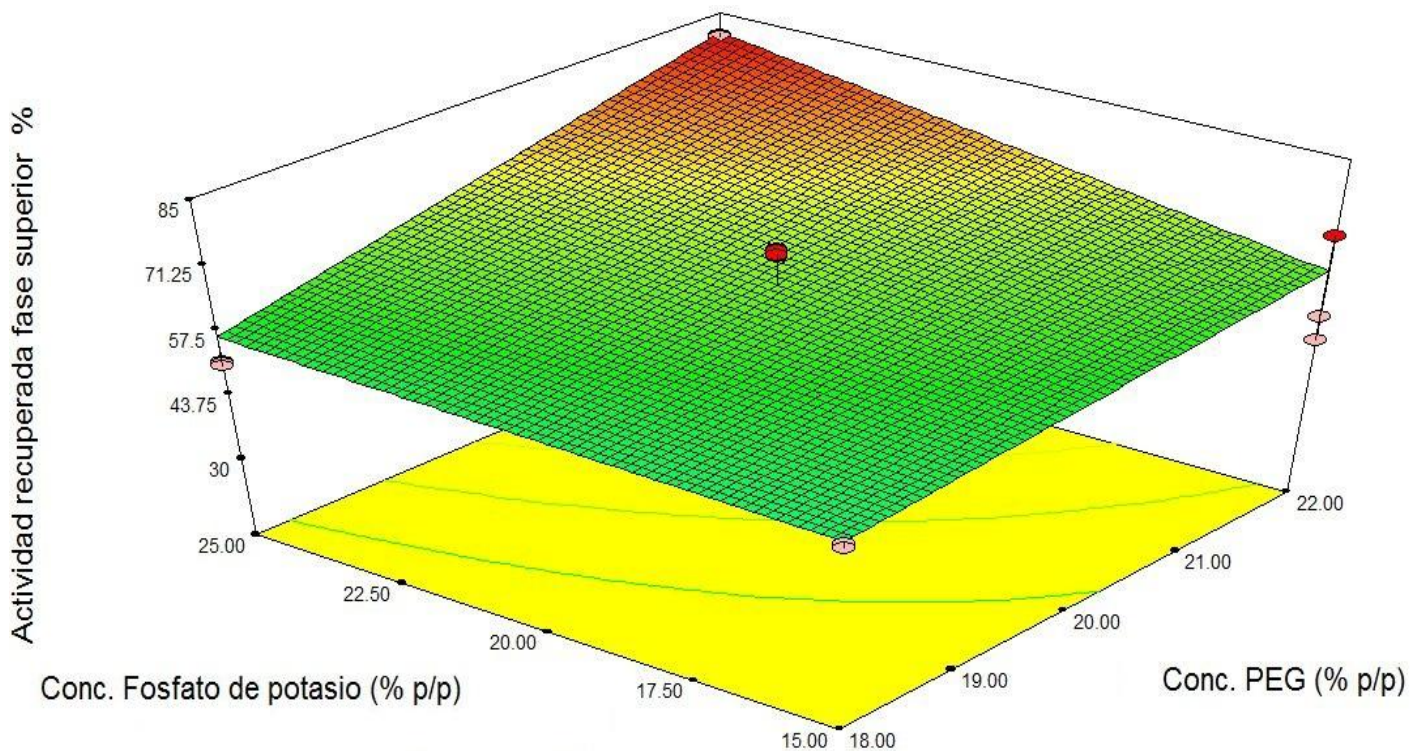


Figura 21. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase superior utilizando PEG 6000-fosfato de potasio.

b) Actividad recuperada en la fase inferior

Analizando la actividad recuperada en la fase inferior para el caso del PEG 1450 (figura 22) observó que su máximo es de 33.21 % utilizando una concentración de 18 % (p/p) PEG y 15 % (p/p), en comparación con el 66 % obtenido en la fase superior utilizando el mismo peso molecular, a pesar de que en la fase superior se concentró una mayor cantidad de actividad, aun en la fase inferior se encuentra una cantidad considerable de actividad, esto puede deberse a la conformación del complejo enzimático con el que se está trabajando, recordemos que la muestra está compuesta de 8 isoformas con diferentes puntos isoeléctricos y divididas en dos grupos dependiendo de su carga, así, tenemos a las isoformas catiónicas las cuales se encuentran en mayor proporción y las isoformas aniónicas que se encuentran en menor proporción y tienen la menor actividad enzimática (Briones-Martínez *et al.*, 2001), por lo que puede ser que algunas de ellas (las catiónicas) migren a la fase superior, y algunas de las isoformas (aniónicas) permanecen en la fase inferior, los dos fenómenos que rigen la extracción bifásica son el “volumen de exclusión” y el efecto por parte de la concentración de fosfatos, el cual regula la separación de las proteínas en solución mediante el efecto “*salting out*” el cual hace que las enzimas o proteínas catiónicas migren hacia la fase superior rica en polímero (Bohinski, 1991). Al analizar la

ecuación 38 se observó que hay un mayor efecto por la interacción de la concentración de PEG y de fosfato de potasio que por cada una de las concentraciones por separado.

$$\hat{y} = 144.27545 - 5.84372C_{PEG} - 4.53733C_{Fosfatos} + 0.23488C_{PEG*CFosfatos} \quad (38)$$

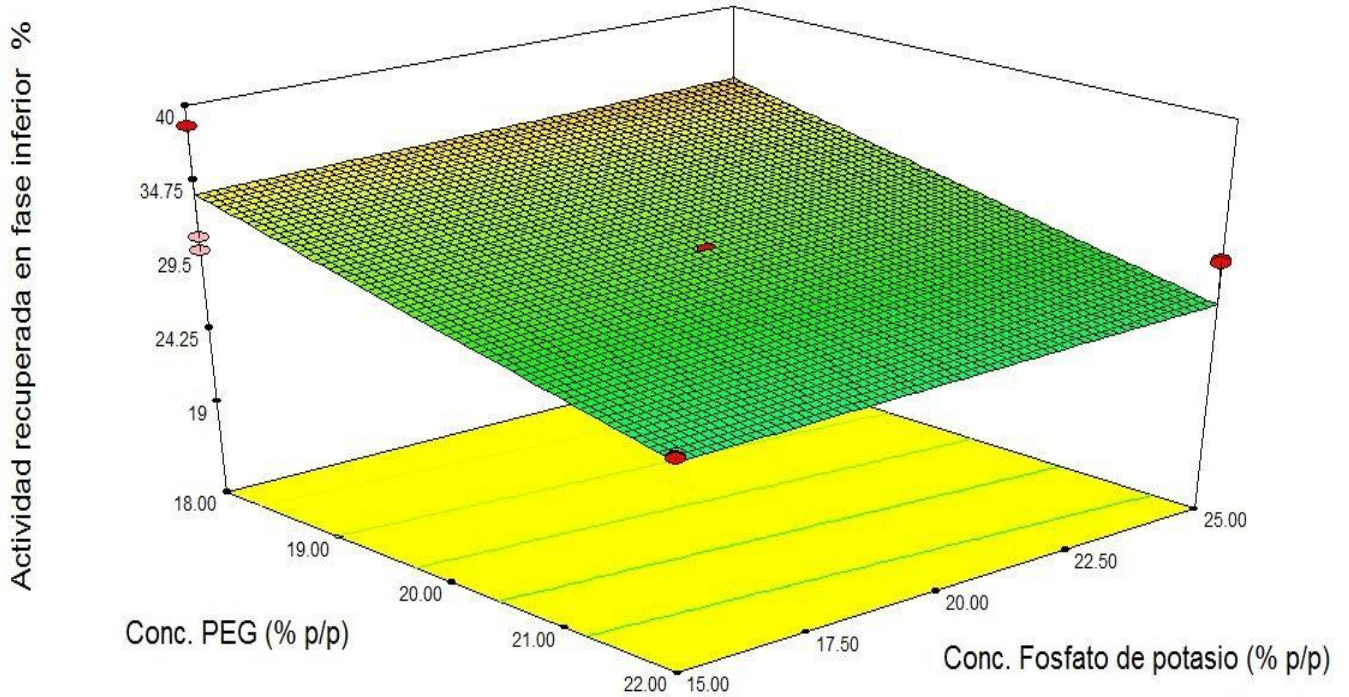


Figura 22. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase inferior utilizando PEG 1450–fosfato de potasio

Para el caso de la actividad recuperada en la fase inferior utilizando el peso molecular 6000 (figura 23), el valor máximo de la actividad recuperada es de 33.45 % bajo las concentraciones de 18 % (p/p) de PEG y 25 % (p/p) de fosfatos en comparación con el 80 % recuperado en la fase superior con éste mismo peso molecular, al analizar la ecuación 39, el cual es la ecuación de la gráfica de superficie de respuesta, se observó un mayor efecto por parte de la interacción de las concentraciones de PEG y fosfato de potasio, el cual es mayor que el de las concentraciones por separado.

$$\hat{y} = 95.13701 - 4.46209C_{PEG} - 3.58512C_{Fosfatos} + 0.23488C_{PEG*CFosfatos} \quad (39)$$

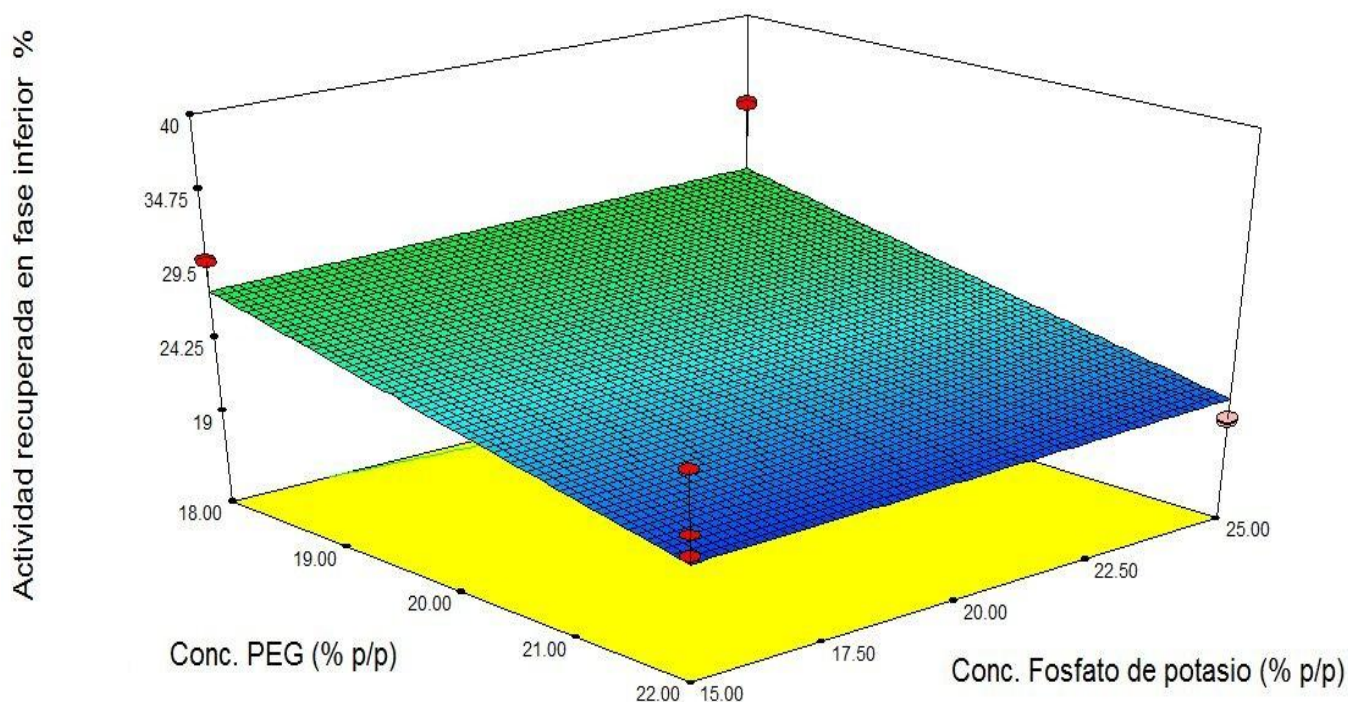


Figura 23. Superficie de respuesta para la actividad recuperada en la fase inferior utilizando PEG 6000 – fosfato de potasio

Una vez que se conoce la ecuación que modela la superficie de respuesta para la actividad recuperada (ecuaciones 36-39) se realizó la comprobación para conocer qué tan acertadas son para la predicción de datos en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el cuadro 14 se muestran los resultados para la actividad recuperada en la fase superior (FS) y la fase inferior (FI) utilizando el PEG 1450 y PEG 6000, el valor más alto de la actividad recuperada en la fase superior se registró en la corrida 4 (22 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio) siendo esta de 80.26 %, por otra parte el valor mínimo para la fase superior es en la corrida 1 (18 % (p/p) de PEG 1450 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 36.55 %, para el caso de la fase inferior el valor máximo en la corrida 8 (18 % (p/p) de PEG 6000 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio) siendo éste de 33.45 y el valor mínimo se obtuvo en la corrida en la corrida 4 (22 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio) siendo esta de 19.99 %, tanto en la fase superior como en la fase inferior las ecuaciones tienen un alto grado de predicción en comparación con los datos obtenidos experimentalmente, en el anexo 5 se muestra el análisis de varianza para el factor de purificación, se observan valores de Prob > F menores a 0.05 indicando que los términos del modelo y sus ecuaciones para los dos pesos moleculares son significativos (no difiere de manera mucho de un modelo perfecto), el valor de F es significativo, esto debido a que solo hay 0.01 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo para la fase superior y un 0.028 % de probabilidades de que el valor de F sea afectado en la predicción del modelo por cuestiones ajenas al modelo para la fase inferior, la regresión de la ecuación obtenida después del



ANOVA indica que el valor de  $R^2$  ordinaria es 0.8285 para la fase superior y de 0.7729 para la fase inferior, el valor de  $R^2$  ajustada de 0.7756 para la fase superior y de 0.7534 para la fase inferior, en el caso de la fase superior el valor de  $R^2$  de predicción es 0.7399 y en la fase inferior es de 0.7134 (anexo 5) indicando que se tiene un 73.99 % y un 71.34 %, respectivamente, de poder predictivo, por otra parte el coeficiente de variación debe de ser menor a 10 % para que sea considerado aceptable, los valores del coeficiente de variación son: 9.31 % para la fase superior y 9.07 % para la fase inferior, lo que indica que los experimentos pueden ser precisos y reproducibles (Montgomery, 2011). Como se puede observar en los datos experimentales reportados en el cuadro 14, todos los experimentos tienen resultados diferentes, en algunos casos tienen resultados cercanos, así que se requiere probar todas las comparaciones de las medias ya que los experimentos tienen el mismo tamaño para los dos pesos moleculares del polietilenglicol probados, para esto se propuso la prueba de Tukey, la cual consiste en comparar todas las medias de los experimentos y probar si dos experimentos son estadísticamente diferentes, estas diferencias se representan por letras, de manera que los experimentos cuyas medias comparten la misma letra son estadísticamente diferentes (Montgomery, 2011), los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el cuadro 14, se observó para la fase superior e inferior que de todos los experimentos solo ocho y siete experimentos, respectivamente, son estadísticamente distintos.

Cuadro 14. Comparación de los resultados experimentales y los datos obtenidos a través del modelo, además de la prueba de Tukey para la actividad recuperada en la fase superior (FS) y fase inferior (FI).

Experimentos	Actividad recuperada FS		Prueba Tukey FS		Actividad recuperada FI		Prueba Tukey FI	
	Experimental	Modelo	Media	Prueba Tukey	Experimental	Modelo	Media	Prueba Tukey
1	36.55±0.0408	40.37	80.256	A	33.02±0.1004	31.35	33.449	A
2	55.91±0.2099	50.36	70.199	B	33.21±0.7336	34.45	33.209	A
3	53.19±0.0444	60.03	66.099	BC	29.93±0.0316	24.46	33.016	A
4	80.26±0.0697	77.42	56.338	CD	19.99±0.0996	18.53	30.225	AB
5	70.20±0.0716	68.72	55.908	D	20.12±0.1028	18.14	30.183	B
6	66.10±0.0405	57.74	53.194	DC	26.83±0.0283	25.16	29.926	BC
7	52.62±0.2163	47.75	52.618	E	30.22±0.8836	31.46	26.828	C
8	51.15±0.0106	50.04	51.153	DC	33.45±0.0313	30.89	23.266	CD
9	41.57±0.1950	39.05	41.572	F	30.18±0.2711	30.61	20.118	D
10	56.34±0.0551	57.41	36.551	F	23.27±0.1101	20.70	19.326	D

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Resumiendo, en todos los experimentos de extracción bifásica se aprecia que en las condiciones de 22 %(p/p) PEG 6000 y 25 %(p/p) fosfato de potasio (corrida 4) se obtienen los mejores resultados experimentalmente, los resultados experimentales resumidos se muestran en el cuadro 15, en el caso de la extracción bifásica en sistemas acuosos se eligen las condiciones en las que se tenga el mayor rendimiento, la máxima actividad recuperada en alguna de las fases y en la mismas condiciones la mínima actividad recuperada en la otra fase.

Cuadro 15. Resumen de datos experimentales de extracción bifásica en sistemas acuosos

Experimento	Factor de purificación FS	Factor de purificación FI	Rendimiento %	KE	KP	Actividad Recuperada FS %	Actividad Recuperada FI %
1	0.97	1.57	52.54	1.11	1.81	36.55	33.02
2	1.54	2.17	62.73	1.15	1.54	55.91	33.21
3	1.29	2.89	64.00	0.76	1.70	53.19	29.93
4	1.99	4.23	84.97	1.22	2.81	80.26	19.99
5	1.12	2.21	77.72	0.87	1.73	70.20	20.12
6	1.73	3.73	71.13	1.26	2.27	66.10	26.83
7	1.82	2.64	63.51	1.16	1.68	52.62	30.22
8	1.10	3.29	60.46	0.665	1.97	51.15	33.45
9	1.28	2.81	57.93	0.92	2.02	41.57	30.18
10	1.38	2.71	70.37	1.06	1.81	56.34	23.27

### 9.3.6 Selección de las mejores condiciones para llevar a cabo los experimentos

Después de conocer todas las interacciones y efectos de los factores principales (concentración de PEG, Concentración de Fosfatos, Peso molecular del polímero) se realizó un análisis estadístico utilizando la opción de optimización del programa *Design expert* versión 8.0.7.1. Se realizó éste análisis para saber cuáles son las condiciones en las que se presentan las mejores condiciones para la extracción bifásica de la karatasina, se eligieron los valores máximos para todas las respuestas, se obtuvieron siete soluciones para obtener el mejor resultado, estos valores se presentan en el cuadro 16.

Cuadro 16. Condiciones proporcionadas por el programa *Design expert* para obtener el mejor resultado en la extracción bifásica de karatasina.

Número	PMPEG	CPEG	C Fosfatos	Factor Purificación	R %	KE	KP	Actividad.	Actividad.	Conveniencia
								Recuperada. FS	Recuperada. F1	
1	6000	22	25	1.99	86	1.22	2.70	81.10	21.04	<b>0.883</b>
2	1450	22	25	1.76	63	1.10	1.80	27.25	27.25	0.48
3	1450	19.9	15	1.55	65	1.03	1.74	30.34	30.34	0.45
4	1450	20.17	15	1.56	65	1.03	1.77	29.92	29.92	0.44

El programa dio como resultado óptimo el sistema compuesto por el PEG-6000 con una concentración del polímero de 22 % (p/p) y una concentración de fosfatos de 25 % (p/p) lo cual corresponde con los datos experimentales del cuadro 14, bajo estas condiciones se obtuvo un factor de purificación de la fase superior de 1.99, con una constante de partición con respecto a la enzima de 1.22 y con respecto a proteína de 2.70, con un rendimiento de 86 %, el programa propone estas condiciones como óptimo debido a que presenta un grado de conveniencia de 0.883, éste parámetro de conveniencia va de 0 a 1 y está basado en un método que hace uso de una función objetivo (media geométrica de todas las respuestas) esta función de conveniencia refleja los límites convenientes para cada respuesta, proponiendo las condiciones más convenientes para la realización de un experimento.

#### 9.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la figura 25 se muestra la corrida de electroforesis de los principales puntos en donde se obtuvo el máximo y mínimo rendimiento y actividad recuperada en cada fase de cada uno de los dos pesos moleculares PEG 1450 y PEG 6000 (corrida 1, 4, 6 y 8), la electroforesis se realizó de acuerdo al punto 8.7 de la metodología, todas las muestras presentan un retraso ya que el peso reportado para la karatasina es de 24 kDa (Briones-Martínez *et al.*, 2001), éste retraso se debe a que se está trabajando con una glicoproteína, las glicoproteínas presentan un comportamiento anómalo en la técnica SDS-PAGE esto debido a que la parte no protéica no se une al SDS lo cual impide el acceso del mismo a la proteína, con lo cual las glicoproteínas se unen menos al SDS que la mayoría de las proteínas, esto causa que la relación carga-tamaño sea menor y por lo tanto tengan una menor movilidad electroforética y se comporten como si tuvieran mayor tamaño (Cultek, 2006), por otro lado las muestras introducidas a la electroforesis se tomaron directamente de la fase por lo que además de la proteína estaba presente el polietilenglicol y los fosfatos, los cuales retrasan a la proteína quedando esta de un peso molecular diferente al original, en el caso de la fase superior (enzima junto con el polímero), el polietilenglicol

interacciona de manera que dificulta la movilidad electroforética, en el caso de la fase inferior, en la cual están presentes las sales, produce que la carga que experimenta la proteína para correr se amplifique de manera que las muestras no corren al mismo tiempo (Aguilar *et al.*, 2009).

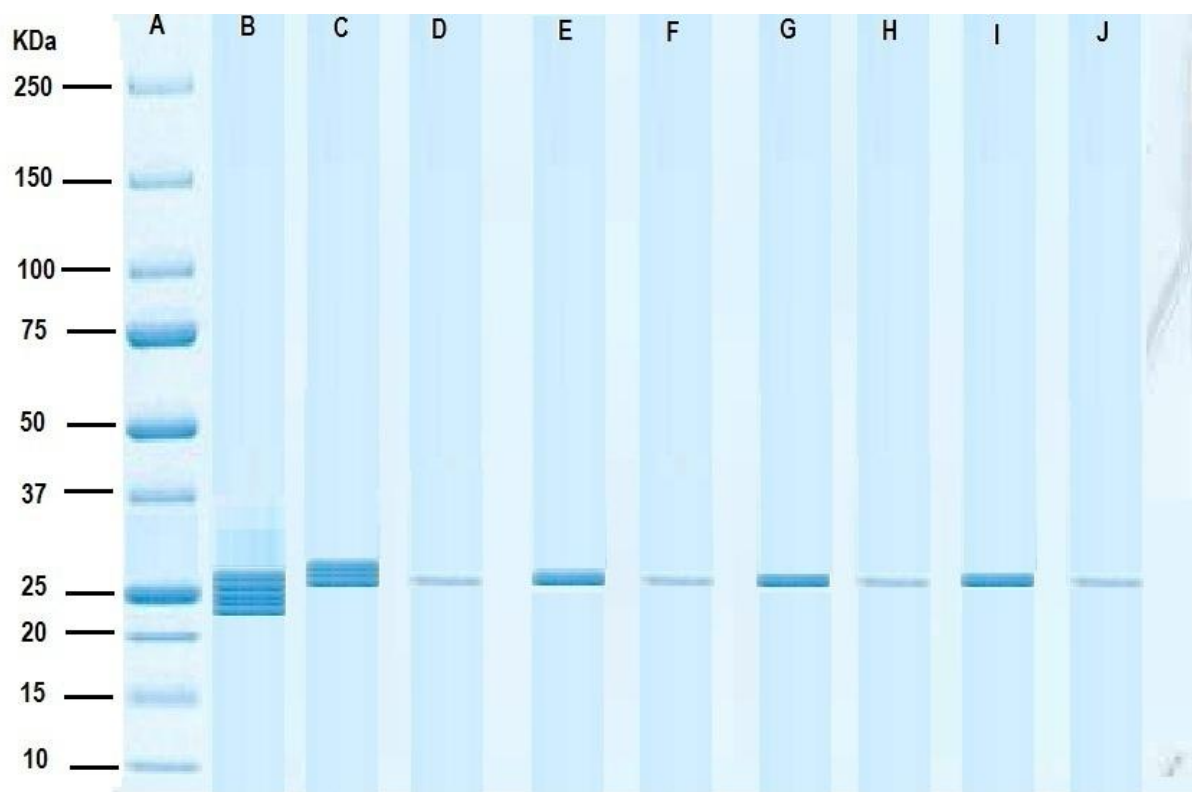


Figura 24. Gel de poliacrilamida de las diferentes fases obtenidas de la extracción bifásica acuosa. A) Marcador de peso molecular, B) extracto enzimático de *B. karatas*, C) Fase superior 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) Fosfato de potasio, D) Fase inferior 22 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio, E) Fase superior 22 % (p/p) PEG 1450 y 15 % (p/p) fosfato de potasio, F) Fase inferior 22 % (p/p) PEG 1450 y 15 % (p/p) fosfato de potasio, G) Fase superior 18% (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio, H) Fase inferior 18 % (p/p) PEG 6000 y 25 % (p/p) fosfato de potasio, I) Fase superior 18 % (p/p) PEG 1450 y 25 % (p/p) fosfato de potasio. J) fase inferior PEG 18 % (p/p) PEG 1450 y 25 % (p/p) fosfato de potasio.

### 9.5 Efecto del peso molecular del PEG en la extracción bifásica

Para mostrar el efecto del peso molecular Babu. En el 2008 utilizó puntos centrales tomados de los diagramas de fases obtenidos previamente, decidió que en las concentraciones de 14 % PEG y 14 % fosfatos podría analizar el efecto del peso molecular en la partición de Bromelaína, en el cuadro 17 se pueden apreciar los resultados que el obtuvo.

Cuadro 17. Efecto del peso molecular del PEG , relación de volúmenes, actividad recuperada y el factor de purificación.

PM de PEG	Relación de volúmenes	KP	Actividad Recuperada	Actividad Recuperada	Factor de purificación	Factor de Purificación
			Br	Br	Br	Br
			FS	FI	FS	FI
1500	0.96	3.2	206.1	0	3.3	0
6000	0.65	1.9	143.6	0	2.7	0

Obtenidos por Babu *et al.*, 2008, utilizando un punto central de 14 % PEG y 14 % Fosfatos (con relación 1.82:1)

En el caso particular de la karatasina se utilizaron de acuerdo a los diagramas de fases obtenidos los puntos centrales de 20 % (p/p) de PEG y de fosfatos con una relación de (1.8:1), en el cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 18. Resultados obtenidos utilizando un punto central de 20 (% p/p) PEG y 20 (% p/p) Fosfatos.

PM de PEG	Relación de volúmenes	KP	Actividad recuperada	Actividad recuperada	Factor de Purificación	Factor de Purificación
			FS	FI	FS	FI
			1450	1.5	2.020	41.572
6000	4	1.726	70.199	20.118	1.120	2.215

Al comparar ambos resultados, se tienen varias diferencias, en primer lugar en el caso de la bromelaína (cuadro 18), la actividad recuperada es mayor en todos los casos en la fase superior correspondiente a la bromelaína, por lo que los resultados esperados para la karatasina son que esta tenga preferencia por la fase superior, al aumentar el peso molecular del polímero disminuye las constantes de partición y la relación de volúmenes, lo que quiere decir que hay un mayor volumen en la fase inferior al aumentar el peso del polímero, lo cual muestra que el efecto exclusión de volumen tiene un efecto mayor que el efecto del "salting out", es decir, al aumentar el peso molecular se disminuye el volumen de la fase superior donde migra la bromelaína y a pesar de que el efecto de la sal empuja a la biomolécula a la fase superior esta no puede migrar totalmente y permanece en la fase inferior disminuyendo así su constante de partición.

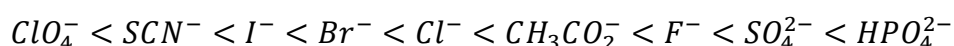
La actividad recuperada en el cuadro 18 es mayor al 100 % debido a las condiciones del experimento, según Babu pudo existir una modificación en el sitio activo lo cual propicio que existiera una mayor actividad debido a que redujo el sitio activo (Babu *et al.*, 2008).

En el caso de la karatasina (cuadro 18) se muestra que al igual que en los experimentos hechos por Babu, que la actividad recuperada en la fase superior es mayor en todos los casos, por lo que la mayoría de las isoformas con actividad enzimática tienden a migrar a la fase superior, por otra parte al tener actividad en la fase inferior y de acuerdo a la electroforesis se puede inferir que algunas isoformas de la karatasina quedaron presentes en esta fase.

De igual forma al analizar la constante de partición con respecto a la actividad enzimática y contenido de proteína, al incrementarse el peso molecular del polímero hay una disminución en estas constantes de partición, por otro lado al incrementarse el peso molecular del polímero hay un aumento en el rendimiento de la extracción, posiblemente al igual que en el caso de Babu, el efecto del volumen de exclusión pudo ser la causa de que el factor de purificación fuera más elevado que en la fase superior en todos los casos, sin embargo al analizar la constante de partición y la electroforesis se aprecia que las mejores condiciones se encuentran en el peso molecular 6000 y una concentración de 22 % PEG y 25 % fosfato de potasio.

## 10. Discusión

Todas las enzimas extraídas de frutos se comportan como un electrolito, lo cual brinda la oportunidad de separarlas utilizando el punto isoeléctrico, carga y tamaño de la enzima con facilidad, haciendo más rápidas las determinaciones, ya que se pueden realizar de manera directa (Ball, 2004), una de las desventajas de utilizar proteasas cisteínicas extraídas de frutos, es la oxidación del sitio activo, cuando la enzima se encuentra en disolución esta tiene contacto con el oxígeno de la solución y tiende a oxidarse, en el caso de la karatasina, ésta se puede mantener en solución siempre y cuando esté en congelación, se puede conservar por tiempo indeterminado sin observar una pérdida considerable de la actividad enzimática (Garduño *et al.*, 1974). Agregando cisteína la cual reduce el sitio activo, se puede devolver la actividad inicial de la enzima (González-Segura y Muñoz-Clares, 2003). En éste trabajo se utilizó fosfato de potasio (F-P), los fosfatos se encuentran entre las sales caotrópicas las cuales desestabilizan a las proteínas catiónicas produciendo el efecto denominado “*Salting out*” (Johansson y Walter, 2008), el efecto desestabilizador de las sales se encuentra dado por una serie denominada “Serie de Hofmeister”, reportado por Johansson y Walter en el 2008 y Bohinski en 1991.



La extracción bifásica se rige principalmente por dos efectos: el efecto la sal agregada sobre la proteína y el volumen de exclusión, el primero depende de la carga de la proteína y de su capa de solvatación, el efecto que tienen las sales es aumentar (“*salting in*”) o disminuir (“*salting out*”) la solubilidad de la proteína, éste efecto depende de la concentración de las sales, ésta concentración se expresa en términos de la fuerza iónica ( $I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$ ). La solubilidad de una proteína a baja fuerza iónica generalmente aumenta con la concentración de sal (Johansson y Walter, 2008). Éste fenómeno se da básicamente por la competencia por las moléculas de agua que forman parte de la capa de solvatación (Johansson y Walter, 2008).

El segundo se debe a que la relación de volúmenes es menor a uno lo que produce que el volumen de la fase superior rica en polímero en la que se desea extraer la enzima de interés es pequeño, por lo que la totalidad de la enzima no puede migrar hacia la fase de interés, éste volumen de exclusión se representa por la relación de volúmenes, volúmenes arriba de uno representan un volumen de la fase superior mayor que el de la fase inferior, valores iguales a uno representan volúmenes iguales en ambas fases, los puntos donde los valores son iguales se denominan puntos críticos y tocan la curva binodal, y por último, valores menores a 1.0 representan volúmenes mayores en la fase inferior que en la fase superior (Rabelo *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2011). Una vez explicado lo anterior es posible entender por qué algunos resultados presentan rendimientos arriba del 75 % y

otros apenas alcanzan el 20 %, o el porque la actividad recuperada tiende a ser mayor en la fase superior que en la inferior.

Cuadro 19. Relación de volúmenes y fuerza iónica.

Experimento.	Factores a probar				
	A	B	C	Relación de volúmenes	Fuerza iónica
1	18	25	1450	1	3.4
2	18	15	1450	1.5	2.0
3	18	15	6000	2.3	2.0
4	22	25	6000	2.3	3.4
5	20	20	6000	2.3	2.7
6	22	15	1450	2.3	2.0
7	22	25	1450	1.5	3.4
8	18	25	6000	1	3.4
9	20	20	1450	1.5	2.7
10	22	15	6000	4	2.0

El cuadro 18, muestra dos puntos críticos (puntos 1 y 4), con una concentración de 18 % (p/p) de PEG-1450 y 25 % (p/p) F-P, y con una concentración de 18 % (p/p) de PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P. En estos puntos críticos la fuerza iónica fue de 3.4 unidades, en ambos puntos se tienen rendimientos cercanos al 50 %, valores de actividad recuperada cercanos al 45 % en la fase superior y de 30 % en la fase inferior, valores de las constantes de partición (KE y KP) superiores a 1 y a 1.8 unidades, respectivamente, estos puntos se muestran en el gel de electroforesis (figura 25), para el PEG-6000, hay una mayor concentración de proteína en la fase superior (G) con un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, lo cual aunado a los resultados de actividad y rendimiento en estas condiciones, indica la recuperación de las fracciones proteolíticas con mayor actividad enzimática en la fase superior, sin embargo, tal como lo mostraron los datos experimentales en la fase inferior (H) se observa la presencia de un pequeño grupo de proteínas del mismo peso molecular (24 kDa), se infiere que éste pequeño grupo de proteínas corresponden a la fracción de iso-enzimas aniónicas de la karatasina. Por otro para el PEG-1450, se observa en la fase superior (I) una concentración mayor de una proteína con peso molecular de 24 kDa y en la fase inferior (J) una pequeña concentración de proteína del mismo peso molecular, estas proteínas corresponden a la karatasina según fue reportado por Briones-Martínez *et al.*, 2001.



En el experimento 10 (cuadro 18) el máximo valor en la relación de volumen (4 unidades) mostro un valor de fuerza iónica de 2.05 unidades, con 22 % (p/p) de PEG 6000 y 15 % (p/p) F-P, se obtiene un rendimiento de 70 %, se alcanza una actividad recuperada de 56.3 % en la fase superior y de 23.27 % en la fase inferior. A pesar de que el rendimiento es alto, la actividad recuperada es baja, esto pudo deberse a que la concentración de fosfatos no fue suficiente para lograr una migración completa de la enzima a la fase superior.

El punto 4 (cuadro 18) compuesto por 22 % (p/p) de PEG-6000 y 25 % (p/p) F-P, éste punto presenta una relación de volúmenes de 2.3 unidades y una fuerza iónica de 3.42 unidades al igual que en los puntos críticos, en éste caso el volumen de la fase superior es 2 veces mayor que la fase inferior, por lo que hay un volumen lo suficientemente grande como para que migren las isoformas catiónicas a la fase superior, en éste punto se registraron los valores máximos del factor de purificación en ambas fases siendo estos de 1.99 unidades en la fase superior y 4.23 unidades en la fase inferior, se alcanzó el máximo rendimiento (84 %) con un valor de las constantes de partición (KE y KP) de 1.22 y de 2.81 unidades, respectivamente, se alcanzó una actividad recuperada en la fase superior cercano al 80 % con un valor de actividad recuperada en la fase inferior cercano al 20 %, en estas condiciones se alcanza el valor máximo tanto experimental como en la optimización del programa *Design expert*, éste punto se presenta en el gel de electroforesis (figura 25), en el punto C se tiene la fase superior y en el punto D se tiene la fase inferior, se presenta una concentración de proteína elevado en la fase superior siendo la más concentrada de todos los experimentos mostrados en la figura 25, en el punto D se observa la presencia de un pequeño grupo de proteínas del mismo peso molecular, se infiere que en éste punto se encuentran las isoformas aniónicas las cuales se encuentran en menor proporción, con lo cual se puede deducir que el proceso de extracción y purificación podría ser un proceso que logra la partición de las isoformas catiónicas en la fase superior y las formas aniónicas en la fase inferior, también se infiere que para el caso particular de la preparación biorefinada de *B. karatas* y por las características bioquímicas de la muestra analizada ( 8 isoformas enzimáticas con pI en el intervalo de pH de 3.8 a 10.4).

Existe otro punto que presenta valores estadísticamente similares en cuestión de rendimientos y actividades recuperadas en la fase superior e inferior, teniendo valores de 77 % para el rendimiento, 70 % de actividad recuperada en la fase superior y un 20 % de actividad en la fase inferior con unas condiciones de 20 % (p/p) PEG-6000 y 20 % (p/p) fosfato de potasio.

Se infiere que las fracciones presentes en la fase inferior son distintas a las presentes en la fase superior, esto por las propiedades bioquímicas de la muestra utilizada, se espera que en el conjunto de condiciones arrojado por el proceso de optimización estén presentes las isoformas que tienen una mayor proporción en la fase superior, la cual presenta una actividad enzimática superior al 70 % y un rendimiento superior al 75 % con

respecto a las isoformas presentes en la fase inferior, las cuales presentan una actividad enzimática cercana al 30% y un rendimiento menor al 40 %, se infiere que disminuyó la hidrofobicidad de las proteínas catiónicas presentes en el sistema de manera que las condiciones bioquímicas del sistema permitieron la migración de una gran cantidad de proteína hacia la fase superior rica en polímero. En el caso de los experimentos en los que la relación de volúmenes fue 2.7 unidades se obtuvieron rendimientos arriba del 60 % y actividades recuperadas en la fase superior por encima del 50 % y en la fase superior se obtuvieron rendimientos menores al 30 %.

Para el caso del PEG 1450, el máximo se encontró con 22 % (p/p) PEG-1450 y 15 % (p/p) F-P, con una relación de volúmenes de 2.3 unidades y una fuerza iónica de 2 unidades, con un rendimiento de 70 %, una actividad recuperada en la fase superior de 64 % y un 30 % en la fase inferior. Éste experimento se muestra en el gel de electroforesis (figura 25), para la fase superior (E) se observa el mismo comportamiento que en los experimentos anteriores, en la fase superior hay una mayor concentración de proteína que en la fase inferior.

Todas las muestras en el gel de electroforesis (figura 25), quedaron retrasadas del peso reportado para la karatasina la cual es de 24 KDa (Briones-Martínez *et al.*, 2001), se observa éste comportamiento anómalo en la técnica SDS-PAGE, debido a que la enzima tienen azúcares en su conformación lo cual produce que la parte no proteica no se una al SDS, lo cual impide el acceso del mismo a la proteína, con lo cual las glicoproteínas se unen menos al SDS que la mayoría de las proteínas, esto causa que la relación carga / tamaño sea menor y por lo tanto tengan una menor movilidad electroforética y se comporten como si tuvieran mayor tamaño (Cultek 2006). Por otro lado las muestras introducidas a la electroforesis se tomaron directamente de la fase por lo que además de la proteína estaba presente el polietilenglicol y los fosfatos, los cuales retrasan a la proteína quedando esta de un peso molecular diferente al original, en el caso de la fase superior (enzima junto con el polímero), el polietilenglicol interacciona de manera que dificulta la movilidad electroforética, en el caso de la fase inferior, en la cual están presentes las sales, produce que la carga que experimenta la proteína para correr se amplifique de manera que las muestras no corren al mismo tiempo (Aguilar *et al.*, 2009). Cuando ya se tiene separada la enzima en la fase superior rica en polímero se procede a realizar una ultrafiltración de manera que la enzima se desprende del PEG y puede ser recuperada para su futuro uso, en el caso de otras proteínas que no presentan actividad enzimática, después de la extracción en sistemas bifásicos se procede a realizarse una precipitación con ATC al 20 % o re-suspender la fase superior en agua y ajustar el pH para que precipite la proteína por su punto Isoeléctrico (Aguilar *et al.*, 2009).

Los resultados mostrados en este trabajo no pueden ser comparados con otros resultados debido a que no hay datos de esta índole reportados en la bibliografía.

Las sales son consideradas uno de los reactivos más baratos, el costo por kilogramo de fosfato de potasio ya sea monobásico o dibásico se encuentra alrededor de los 70 pesos el kilogramo, por otro lado, el costo del polietilenglicol se encuentra alrededor de los 500 pesos el kilogramo, por otra parte, para la extracción bifásica y su escalamiento a nivel industrial no sería muy rentable estar comprando nuevo polietilenglicol para cada vez que se requiera realizar una extracción. Para evitar éste gasto algunos autores (Aguilar *et al.*, 2009; Nagaraj *et al.*, 2005, Jiang, 2009) han propuesto métodos para el re-uso del polietilenglicol, cada uno de las metodologías difiere entre sí, sin embargo, la metodología propuesta por Nagaraj *et al.*, en el 2005, presenta una buena alternativa de hecho es una patente, él propone que después de extraída la proteína o enzima de interés de la fase rica en polietilenglicol, se debe someter éste polietilenglicol con ondas de microondas con una frecuencia de 900-2450 MHz con una potencia de 175-800 watts cuando éste aun está húmedo o en solución por 1.5 a 3 minutos, esto con el fin de que las moléculas de polietilenglicol recupere su actividad inicial, posteriormente se realiza un secado por aire caliente de 45 a 60 minutos a una temperatura de 100 a 105 °C, con esto se obtiene un polímero con una pureza del 95 % del que tenía originalmente, y es posible su reutilización para cualquier otra extracción.

Por otro lado varios autores (Ahmad *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2011;) han utilizado el diseño de superficie de respuesta usando un diseño del tipo central compuesto para la extracción y purificación de enzimas, todos ellos reportan que éste tipo de modelo tiene una buena predicción ( $R^2$  predicha dentro del intervalo del 70 % al 95 %), los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro de este intervalo, el diseño de superficie de respuesta con un modelo central compuesto es de utilidad para abordar problemas vinculados a los efectos individuales e interactivos de factores establecidos además de que prefiere su uso debido a que utiliza un conjunto de técnicas útiles para el diseño de experimentos y construcción de modelos. La principal ventaja del diseño de superficie es la reducción del número de ensayos experimentales necesarios para evaluar múltiples factores y sus interacciones (Pereira *et al.*, 2011). Esta metodología puede utilizarse en el desarrollo de las nuevas tecnologías y técnicas de extracción y purificación de enzimas dándole un tratamiento adecuado teniendo en cuenta los efectos de las condiciones operacionales en el proceso de extracción y purificación enzimática para determinar la región que satisfaga las mejores condiciones (Pereira *et al.*, 2011).

## 11. Conclusiones

- Los rendimientos de la extracción bifásica de proteínas con actividad proteolítica contenidas en el extracto de *Bromelia karatas*, en todos los experimentos, fueron mayores al 60 % en la fase superior y menores al 30 % en la fase inferior.
- Las mejores condiciones de extracción de las proteínas con actividad proteolítica contenidas en el jugo de *Bromelia karatas* son 22 % (p/p) PEG-6000 y 25 % (p/p) de fosfato de potasio; con lo cual en rendimiento es de 84 %; las constantes de partición con respecto a la actividad enzimática y respecto a proteína, de 1.22 y de 2.81, respectivamente; y la actividad recuperada de 80 % en la fase superior y 19.9 % en la fase inferior.
- El modelo obtenido tiene alto porcentaje de predicción (superior al 75%) lo cual lo hace valido para el intervalo de condiciones presentes en éste trabajo.
- Con la ecuación del modelo propuesto por Merchuck se modeló el diagrama de fases con un coeficiente de correlación de 0.99.

## 12. Perspectivas del trabajo

- Realizar ensayos de escalamiento a escala piloto con base en los resultados del presente trabajo para validar o identificar mejoras en las condiciones de extracción de las proteasas de *B. karatas*.
- Estudiar los procesos para recuperar el polietilenglicol de la fase superior y reutilizarlo para tener una reducción en los gastos a nivel industrial.
- Complementar con estudios de caracterización enzimática de las fases mediante electroforesis 2D y la determinación de los puntos isoelectricos de las muestras que presentaron mayor actividad.

### 13. Referencias

- Aehle W., 2007. Industrial enzymes: Enzymes in food applications. In W. Aehle (Third Edition); Enzymes in industry: Production and applications. Chichester: Wiley. Chapter 5, 99 - 111.
- Adrián-Romero M. y Gerald B., 2001. Betaine distribution in the *Bromeliaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol.29. 287-319.
- Albertsson, P.E., Johansson, G. y Tjerneld, F.1990. Aqueous two-phase separations. En: *Separation Processes in Biotechnology*. Asenjo, J.A. (Ed.). Marcel Dekker Inc.New York. 287-319.
- Abreu J. Gonzales D.M., Meneses A. Cruz M., Banze F., Martínez M., Ros O. 2005. Determinación de parámetros farmacognósticos y bromatológicos y evaluación de la actividad antiparasitaria de una preparación obtenida del fruto de *Bromelia pinguin L* que crece en cuba. *Acta Farm Bonaerense*. 24. 377-382.
- Aguilar O., Rito-Palomares M., Glatz C.E. 2009. Caracterización tridimensional de proteínas de soya mediante electroforesis de dos dimensiones y partición en fases acuosas. *Revista mexicana de ingeniería química*. 8. 57-65.
- Ahmad A.L., Derek C.J.C. Zulkali. M.M.D., 2008. Optimization of Thaumatin extraction by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology (RSM). *Separation and Purification Technology*. 62. 702-708.
- Arellano-Rodríguez J.A., Flores-Guido J.S., Tun-Garrido J., Cruz-Bojórquez M.M. 2003. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. Universidad autónoma de Yucatán. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, CONACyT. No 0286. 85 - 86.
- Babu B.R., Rastogi N.K., Raghavarao K.S.M.S. 2008. Liquid-liquid extraction of Bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two phase system. *Chemical Engineering and Processing*. 47. 83-89.
- Ball D.W. 2004. *Fisicoquímica*, editorial Thomson, segunda edición, capítulo 8, 230-234.
- Benavides J. y Rito-Palomares M. 2008. Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas Polietilenglicol-sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. *Revista mexicana de Ingeniería Química*. 7. 99-111.
- Baskir, J.N., Hatton, T.A., Suter, U.W. 1989. Protein partitioning in two phase aqueous polymer systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 34, 541-558.
- Bes M.T., Sancho J., Peleato M.L., Medina M., Gómez-Moreno C., Fillat M.F. 2003. Purification of colored photosynthetic proteins for understanding protein isolation principles. *Biochemistry and molecular biology education*. 31. 119-122.

Bensch M., Selbach B., Hubbuch J. 2007. High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*. 62. 2011-2021.

Bohinski, R.C. 1991. *Bioquímica*. Adisson Wesley Iberoamericana S.A., México. *Bioquímica*, 5ª edición p. 1243.

Briones-Martínez, R., Cortés-Vázquez, M.I. 2011. Preparación biorefinada de *B. karatas*. Proyecto FOMIX-CONACYT-GOB. CAMP 126515.

Briones-Martínez R., Méndez O., Flores G., Arroyo B.K., Cortes-Vázquez I. 2001. Aislamiento y caracterización de una proteinasa catiónica de la *Bromelia karatas*. Especificidad de sustrato. *Memorias. CEPROBI IPN*. 60-68.

Bruno M.A., Lazza C.M., Errasti María E., López L.M.I., Caffini N.O., Pardo M.F. 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT Food Science and Technology*. 43. 695-701.

Buttazzoni M., Caffini N. Natalicci C. Priolo N. 1984. Proteasas de Bromeliácea I. Estudio preliminar de la fracción proteolíticamente activa presente en frutos de *Bromelia laciniosa*. *Acta Farm. Bonaerense*. 3. 33-38.

Castillo. 2006. Diagramas de fase para dos y tres componentes. *Manual de ingeniería Universidad de Chile, Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Departamento de química y fisicoquímica*. 1-57.

Cortés M.P.B. 2008. Predicción del coeficiente de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas a través de la caracterización bioinformática de su superficie. Memoria para optar al título de ingeniero civil en biotecnología. Universidad de Chile, Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de ingeniería química y biotecnología. 1-54.

Carrera J. E. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. *Revista de la facultad de ciencias agropecuarias, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia*. 1. 9-15.

Cheng S.W., Wang Y.F., Liu F.F., 2011. Optimization of medium compositions using statistical experimental design to produce lipase by *Bacillus subtilis*. *Chem. Biochem. Eng. Q*. 25. 377-383.

Cultek 2006. Protocolo y Técnicas de electroforesis tomado de [www.cultek.com](http://www.cultek.com) el 2-11-12

Dubey V.K., Pande M., Singh B.K., Jagannadham M.V. 2007. Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6. 1077-1086.

Edahiro J., Yamada M., Seike S., Kakigi Y., Miyahaga K., Nakamura M., Kanamori T. y Seki M. 2005. Separation of cultures Strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two phase system. *Journal of Bioscience and Bioengineering. The Society for Biotechnology, Japan*. 100, 449-454.

Feijoo-Siota L. y Villa T.G. 2011. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol*. 4. 1066-1088.

Ferrari Ferreira J, Rocha Antunes Pereira B.I, Silveira E., Tambourgi E.B. 2011. Purification of Bromelain from *Ananas comosus* by PEG / Phosphate ATPS. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 931-936.

- García-Carreño F.L., Dimes L.E., Haard, N. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69.
- Garduño R., Soriano M., Chávez E., Cruz M.T., del Castillo L.M. y Castañeda-Agullo M. 1974. Proteinases de plantas mexicanas II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares múltiples en enzimas de *bromeliáceas*. *Rev. Latinoamericana. Quím.*, 5, 243-248.
- Gélvez O., Mónica V., Vargas Y., Mesa L., Gómez D. 2006. Determinación de propiedades fisicoquímicas de la carne de res mediante el uso de enzimas de papaína y bromelaína. *Ciencia y tecnología alimentaria. Universidad de pamplona.* 4. 41-49.
- González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M.C. 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro – A review. *Biotechnology advances.* 29. 983-996.
- González-Salvatierra C., Andrade J.L., Escalante-Erosa F., García-Sosa K., Peña-Rodríguez L.M. 2010. Antioxidant content in two CAM Bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. *Journal of Plant Physiology.* 167. 792-799.
- González-Segura L., Muñoz- Clares R., 2003. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *REB* 22, 2-10
- Gu T. 2000. Liquid-liquid partitioning methods for bioseparations. En: *Handbook of separations.* A. Ahuja. (Ed.). Academic Press, New York, 2, 329-364.
- Johansson G. y Walter H. 2008. Partition and concentrating biomaterials in aqueous phase systems. *International review of cytology,* 192, 33-60.
- Jiang Y., Xia H., Yu J., Guo C., Liu H. 2009. Hydrophobic ionic liquids – assisted polymer recovery during penicillin extraction in aqueous two-phase system. *Chemical Engineering Journal.* 147, 22-26.
- Kaul R.H. 2000. Aqueous two phase system. A general overview. *Methods and Protocols.* Humana Press, Sweden. Chaper 1, 1-10.
- Ketnawa S., Chaiwut P., Rawdkuen. 2011. Aqueous two-phase extraction of Bromelain from pineapple peels (“Phu Lae” cultv). And its biochemical properties. *Food Science Biotechnology.* 20, 12191226.
- Li M., Su E., You P., Gong X., Sun M., Xu D., Wei D., 2010. Purification and in situ immobilization of papain with aqueous two-phase system. *Plosone.* 5. 1-10.
- Ling H., Su S. Branford-White C., Zhu L. 2010. Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology. *Separation and Purification technology.* 73. 343-348.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- López M. L., Sequeiros C., Natalucci C.L., Brullo A., Maras B., Barra D., Caffini N.O. 2000. Purification and characterization of *macrodontes* (Morr) Harms (*Bromeliaceae*). *Protein Expression and purification.* 18. 133-140.



Merchuck J.C., Andrews B.A., Asenjo J.A. 1998. Aqueous two-phase systems for protein separation Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B* , 711. 285-293.

Montgomery 2011. *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª edición, 3, 96 y 97; 6, 218-271.

Nagaraj N., Sampangi C., Karumanchi M.S.R., 2005. Process for separation and recovery of polyethylene glycol (PEG) from spent aqueous two-phase systems. Patente No.: US 6, 863,828 B2.

Nascimento K.S., Rosa P.A.J. Nascimento K.S., Cavada B.S., Azevedo A.M, Aires-Barros M.R. 2010. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two phase systems using design of experiments methodology. *Separation and Purification Technology*. 75. 48-54.

Nitsawang S., Hatti-Kaul R., Kanasawuda P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two phase extraction versus two step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*.39. 1103-1107.

Ortega M.L y Del Castillo L.M. 1966. Actividad de la mexicana en presencia de altas concentraciones de urea. *Ciencia, México*, 24. 247-251.

Orozco C., Gete V., Castillo M., García S., Ordaz L. 2003. Purificación de Bromelaína y Hemisfericina. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 8 al 12 de septiembre de 2003, Puerto Vallarta, J. Área de Biotecnología alimentaria.

Pereira A.L.A., Minim L.A., Rodríguez M.P.V., Ferreira B.R.C., Mendes da Silva L.H., Hespanhol da Silva M.C., 2011. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PRG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*. 870. 1881-1885.

Peña D.A., Aroyo B.A., Gómez P.A., Tapia I.R. 2004. *Bioquímica*. Ed. Limusa, 2ª edición, capítulo 3, pp. 96.

Pio-León J.F., López- Angulo G., Paredes-López O., Uribe-Beltrán M., Díaz-Camacho S.P. 2009. Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 181-187.

Porto C.S., Porto T.S., Nascimento K.S., Edson H., Teixeira C., Benildo S., Lima-Filho J.L., Porto A.L.F. 2011. Partition of lecithin from *Canavalia grandiflora Benth* in aqueous two phase systems using factorial design. *Biochemical Engineering Journal*. 53. 165-171.

Rabelo B.A.P., Tambourgi E.B., Pessoa A. Jr. 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. *Journal of Chromatography*. 807. 61-68.

Rawdkuen S., Pintathong P., Chaiwut P., Benjakul P. 2011. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food and Bioproducts Processing*. 89. 73-80.

Ross K.C y Zhang C. 2010. Separation of recombinant glucoronidase from transgenic tobacco by aqueous two phase extraction. *Biochemical Engineering Journal* 49, 343-350.

- Saravanan S., Rao J.R., Nair B.N., Ramasami T. 2008. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-poly (acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*. 43. 905-911.
- Schägger H. y Von. J. G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166. 368-379.
- Shahbaz M.H., Omidina E., 2008. Development and application of aqueous two-phase partition for the recovery and separation of recombinant phenylalanine dehydrogenase. *Chem. Chem. Eng. Vol 27*. 119-127.
- Sánchez R.I.S. 1989. Aislamiento y caracterización de formas moleculares de *karatasina*. Tesis profesional. Universidad Veracruzana, Facultad de ciencias químicas. 3-57.
- Silvério S.C., Wegrzyn A., Lladosa E., Rodríguez O., Macedo E.A. 2012. Effect of aqueous two-phase systems constituents in different Poly(ethylene glycol)-Salt phase diagrams. *Journal of chemical & engineering data*. 57, 1203-1208.
- Singh S. y Singh J. 2003 Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme. En *AAPS PharmSciTech* 2003; 4 (3) ([www.pharmscitech.org](http://www.pharmscitech.org)). Article 42. 1-9.
- Tejeda, M.A., Montesinos C, R., Guzmán, Z.R. (1995). *Bioseparaciones*, Editorial Unisol, Hermosillo, Sonora. México. Capítulo 6. 227-255.
- Teijón R. J.M. y Garrido P.A. 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural*, segunda edición, Editorial Tébar, S.L. Madrid, Capítulo 13. 191-201.
- Valles D., Furtado S., Cantera A.M.B. 2007.Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha Bertol (Bromeliaceae)*.*Enzyme and Microbial Technology*. 40. 409-413.
- Vaidya, B.K., Suthar, H.K, Kasture, S., Nene, S. 2006. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two phase system. *Biochemical Engineering Journal*. 28. 161-166.
- Vieira-de-Abreu A., Amendoeira F.C., Gomes G.S., Zanon C, Chedier L.M., Figueiredo M.R, Kaplan M.A., Frutuoso V.S, Castro-Faria-Neto H.C, Weller P.F., Bandeira-Melo C, Bozza P.T. 2005. Anti-allergic properties of the *Bromeliaceae Nidularium procerum*: Inhibition of eosinophil activation and influx. *International Immunopharmacology* .5. 1966-1974.
- Whitaker J.R. 1972. *Principles of enzymology for the food sciences*. Cap 3: 66-116.
- Yücekan Í. y Önal S. 2011. Partitioning of invertase from tomato in poly ethylene glycol /sodium sulfate aqueous two phase systems. *Process Biochemistry* 46. 226-232.

## 14. Anexos

### Anexo 1. Curvas de conductividad

Las curvas de calibración se realizaron con agua desionizada y por triplicado, se utilizaron las concentraciones de 0.75, 1.5, 3 y 6 % de polietilenglicol, esto debido a que en esas concentraciones no se observaba una interacción del PEG en la conductividad, en la figura 25 y 26 se muestran las curvas de conductividad, todas las curvas son muy similares por lo que se utilizó la de concentración 0.75 % ya que presentaba resultados muy cercanos a la realidad. Los valores de la ecuación de las diferentes curvas al igual que sus coeficientes de correlación se muestran en el cuadro 20 y 21.

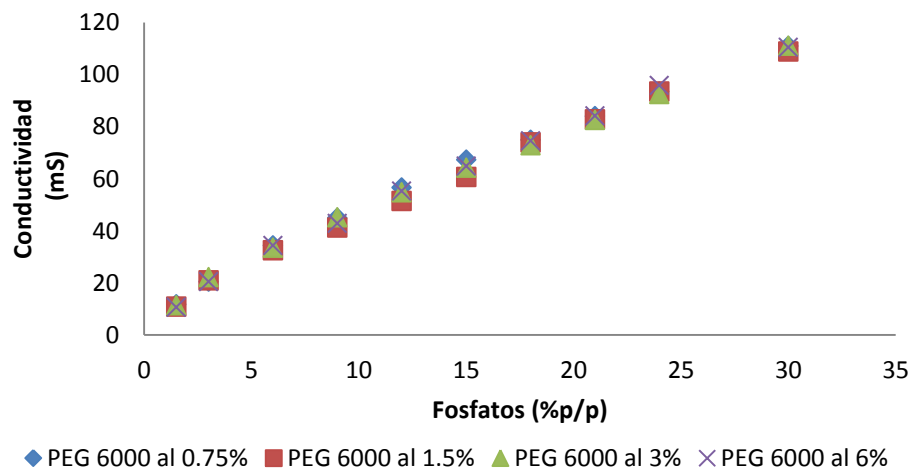


Figura 25. Curvas de conductividad de fosfatos con diferentes concentraciones de PEG-6000.

Cuadro 20. Ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación para las diferentes curvas de conductividad utilizando PEG 6000.

Concentración de PEG-6000	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación
0.75 %	$Y = 3.419x - 12.183$	0.9910
1.5 %	$Y = 3.3165x - 10.029$	0.9951
3 %	$Y = 3.3765x - 11.917$	0.9939
6 %	$Y = 3.4676x - 10.957$	0.9924

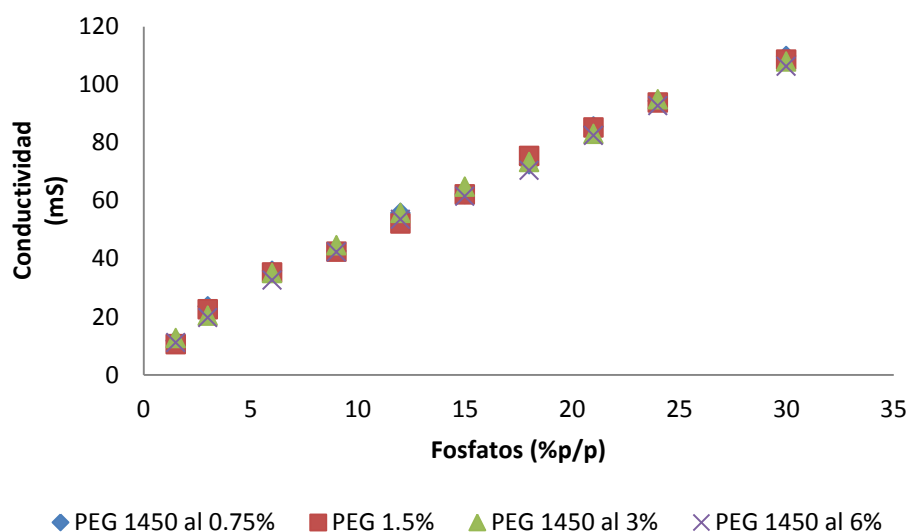


Figura 26. Curvas de conductividad de fosfatos con diferentes concentraciones de PEG-1450.

Cuadro 21. Ecuaciones de la recta y coeficientes de correlación para las diferentes curvas de conductividad utilizando PEG 1450.

Concentración de PEG-1450	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación
0.75 %	$Y = 3.3619x - 12.471$	0.9920
1.5 %	$Y = 3.3887x - 11.518$	0.9907
3 %	$Y = 3.3407x - 12.626$	0.9909
6 %	$Y = 3.3323x - 10.754$	0.9928

## Anexo 2. Curva tipo de Lowry

Para llevar a cabo la determinación de contenido de proteína por el método de Lowry se necesitan los siguientes reactivos.

1. Reactivo A: Solución al 2 % de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $\text{NaOH}$  0.1 N, para elaborar la solución de hidróxido de sodio es necesario poner a ebullición el agua con el fin de eliminar el oxígeno presente en el agua y evitar la oxidación del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
2. Reactivo B: Solución al 0.5 % de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en citrato de sodio al 1 %
3. Reactivo C: 1 mL de reactivo B en 50 mL reactivo A, preparar al momento de usarse.
4. Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciucaltenau diluido en 2 volúmenes de agua destilada

Nota: Leer a 600 nm antes de 2 horas de reacción.

Se realiza una solución tipo de albumina a una concentración de 1mg/mL disuelta en el reactivo A. y se elabora una curva tipo como se muestra en el cuadro 19, obteniéndose la figura 27.

Cuadro 22. Cantidades para formar curva tipo de proteína.

Solución tipo (mL)	Reactivo A (mL)	Reactivo c (mL)	Reposo (min)	Reactivo D (mL)	Reposo (min)	Concentración final de proteína (mg/mL)
0.05	0.2	2.5	10	0.25	30	0.2
0.1	0.15	2.5		0.25		0.4
0.15	0.1	2.5		0.25		0.6
0.2	0.05	2.5		0.25		0.8
0.25	0	2.5		0.25		1
0	0.25	2.5		0.25		0

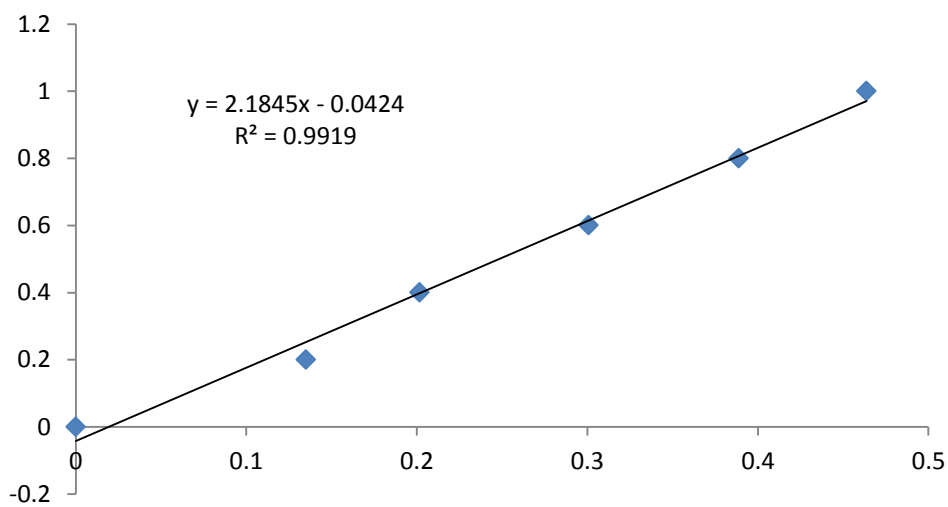


Figura 27. Curva tipo de proteína por el método de Lowry.

### Anexo 3. Curva Patrón Tirosina

A partir de una solución que contenga 500  $\mu\text{moles/L}$  de tirosina (la solución contiene 2 partes de regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6 y 3 partes de ATC 5 %). Hacer la curva tipo con 10 diferentes alícuotas (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7 y 3.0mL) de la solución de tirosina. Adicionar la mezcla de regulador - ATC para llevar a un volumen de 3mL y leer a 280nm. La curva tipo se realiza por triplicado de acuerdo al cuadro 21, en la figura 28 se muestra la curva tipo de tirosina.

Cuadro 23. Cantidades para elaborar curva patrón de tirosina.

NOTA LAS ALÍCUOTAS SE TOMARON A LA MITAD PARA TENER UN VOLUMEN FINAL DE 1.5 MI							
NUMERO DE TUBO	TIR (500 $\mu\text{moles/L}$ ) mL	ATC mL	CONCENTRACIÓN DE TIROSINA $\mu\text{moles/mL}$	ABSORBANCIA 280nm			PROMEDIO
BLANCO	0.000	1.500	0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.150	1.350	50	0.068	0.066	0.072	0.069
2	0.300	1.200	100	0.129	0.134	0.130	0.131
3	0.450	1.050	150	0.194	0.190	0.193	0.192
4	0.600	0.900	200	0.254	0.249	0.254	0.252
5	0.750	0.750	250	0.309	0.302	0.304	0.305
6	0.900	0.600	300	0.365	0.364	0.363	0.364
7	1.050	0.450	350	0.420	0.420	0.418	0.419
8	1.200	0.300	400	0.477	0.478	0.480	0.478
9	1.350	0.150	450	0.539	0.539	0.547	0.542
10	1.500	0.000	500	0.604	0.598	0.598	0.600

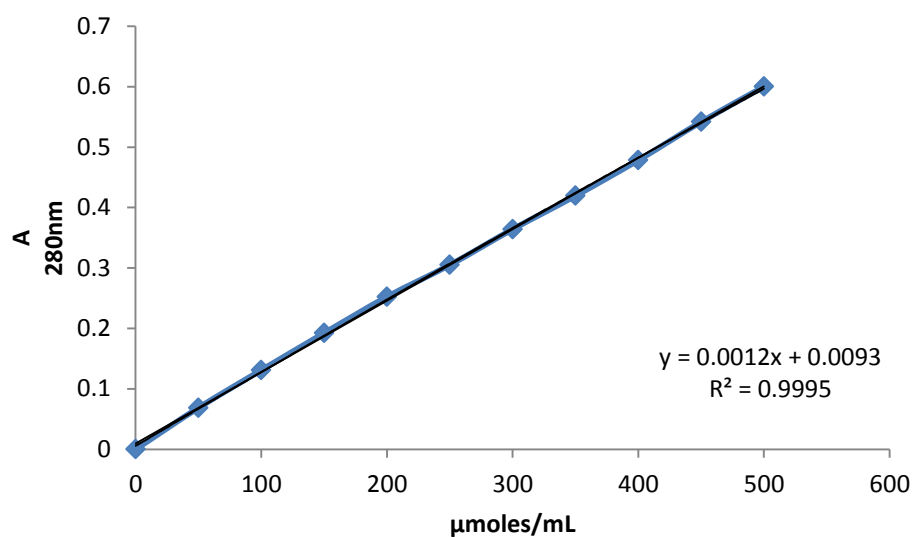


Figura 28. Curva tipo de tirosina.

#### Anexo 4. Preparación de electroforesis y zimogramas por el método de García-Carreño

- Solución de caseína al 3 %

Diluir 3 gramos en 100 mL de Tris-HCl a pH 7.6 con una concentración de 50mM

Poner a ebullición por 20 minutos para desnaturalizar la caseína.

Nota: no preparar para más de la que se vaya a consumir en 3 días.

- Regulador ánodo (Tris 0.2M pH 8.9)

Para 250mL pesar 6.057g de tris disolver en agua (150mL) y ajustar a pH 8.9 con HCl, aforar a 250mL.

- Regulador del cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1N, SDS 0.1 %)

Para 1L pesar 1g de SDS, 12.08 g de Tris y 17.88g de tricina. Disolver y aforar a 1L con agua destilada.

- Regulador del gel (Tris 3M y SDS 0.3 %)

Para 250 mL pesar 90.855 g de tris y 0.75 g de SDS. Disolver con agua destilada y ajustar pH 8.45 y aforar a 250 mL con agua.

- Poliacrilamida (acrilamida 48 % y bis-acrilamida 1.5 %)

Pesar 48 g de acrilamida y 1.5 g de bis-acrilamida, disolver y llevar a 100 mL de agua y filtrar.

➤ Regulador de muestra (para 10 mL)

Componente	Cantidad
Glicerol al 50 %	5 ml
SDS al 10 %	2 mL
Azul de bromo fenol	1 mL
Agua destilada	1.4 mL
Tris-HCl (1M, pH 6.8)	0.6 mL

➤ Solución para teñir (Para 250 mL)

Componente	Cantidad
Ácido acético 10 %	25 mL
Azul de bromo fenol g250	0.25 g
Metanol o isopropanol al 40 %	90 mL
Agua destilada	135 mL

➤ Solución desteñidora (1L)

Componente	Cantidad
Ácido acético 10 %	100 mL
Metanol o isopropanol al 40 %	400 mL
Agua destilada	500 mL



**Anexo 5. Análisis de varianza para la superficie de respuesta de todos los experimentos.**

	Factor de purificación FS	Factor de purificación FI	Rendimiento	KE	KP	Actividad recuperada FS	Actividad recuperada FI
F del modelo	13.47	9.23	8.13	0.694	6.43	16.45	4.39
Prob>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0002	<0.0001	<0.0028
PRESS	0.49	0.99	0.64	0.83	0.75	0.52	0.83
C.V (%)	7.01	8.96	6.45	9.84	9.06	9.31	9.07
R <sup>2</sup> ordinaria	0.9267	0.7210	0.8603	0.7805	0.6742	0.8285	0.7729
R <sup>2</sup> ajustada	0.9083	0.6963	0.8403	0.7598	0.6458	0.7756	0.7534
R <sup>2</sup> de predicción	0.8633	0.7642	0.8051	0.7287	0.6189	0.7399	0.7134