

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

TESIS:

ESTUDIO PROSPECTIVO DE LA VARIACIÓN DE ENDOPEPTIDASAS  
CISTEÍNICAS EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE *Ananas comosus* (L.)  
Merr. EN UNA PLANTACIÓN DE LOMA BONITA, OAXACA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

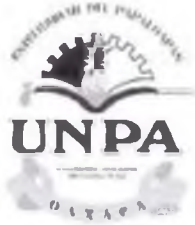
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ROSA ELIA AGUERO PADILLA

Directora: Dra. Nelda Xanath Martínez Galero

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2022.



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA


#### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 10 de junio de 2022 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Estudio prospectivo de la variación estacional de endopeptidasas cisteínicas en residuos agroindustriales de *Ananas comosus* (L.) Merr en la región de la Cuenca del Papaloapan" presentada por la alumna Rosa Elia Agüero Padilla, con número de matrícula 14090525, aspirante al título de Licenciatura.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 10 de junio de 2022.

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

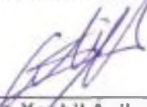
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Nelda Xanath Martínez Galero  
Profesor Investigador Titular "B"  
Universidad del Papaloapan  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Manuel Juárez Barrientos  
Profesor Investigador Asociado "C"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hipólito Hernández Hernández  
Profesor Investigador Asociado "C"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Miguel Ángel García Muñoz  
Profesor Investigador Asociado "C"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alma Xochil Avila Alejandro  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

Campus Loma Bonita  
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma Bonita,  
Oaxaca C.P. 68400  
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

Campus Tuxtepec  
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,  
Tuxtepec, Oaxaca, C.P. 68301  
Tel/Fax: 01 287 875 9240



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 14 de junio de 2022  
Oficio No. JCIB/003/06/2022

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna Rosa Elia Agüero Padilla titulado "Estudio prospectivo de la variación estacional de endopeptidasas cisteinicas en residuos agroindustriales de *Ananas comosus* (L.) Merr en la región de la Cuenca del Papaloapan". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello (Presidente, Universidad del Papaloapan)  
Dr. José Manuel Juárez Barrientos (Vocal, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Hipólito Hernández Hernández (Secretario, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Miguel Ángel García Muñoz (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)  
Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

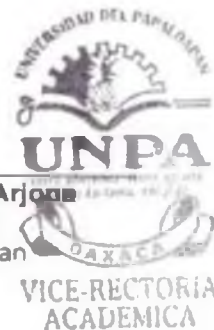
Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta  
Bou lo-jama, chl jí jú*

*Jacqueline Capataz Tafur*  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur  
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

*107*  
Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dra. Nelda Xanath Martínez, Director de tesis.  
c.c.p. Rosa Elia Agüero Padilla, Alumna. Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita  
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma Bonita,  
Oaxaca C.P. 68400  
Tel/Fax: 01 261 872 92 30

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

Campus Tuxtepec  
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,  
Tuxtepec, Oaxaca, C.P. 68301  
Tel/Fax: 01 267 875 9249

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## AGRADECIMIENTOS

Presento mi sentido agradecimiento a la Universidad del Papaloapan que me ha permitido cumplir con un sueño más en mi vida.

Un sincero agradecimiento a mi Directora de tesis la Dra. Nelda Xanath Martínez Galero por incluirme en este proyecto que sin duda ha sido una experiencia que me ha enseñado tanto, de igual forma agradezco todo el apoyo brindado, la paciencia, y los días de motivación que sin duda sirvieron durante todos estos años!

Agradezco a mis sinodales por tomarse el tiempo de aportar sus conocimientos a este trabajo: Dra. Rubí G. Utrilla Coello, Dr. José M. Juárez Barrientos, Dr. Hipólito Hernández Hernández, Dr. Miguel A. García Muñoz y a la Dra. Alma X. Ávila Alejandre.

Agradezco de corazón a mis maestros que aportaron durante mi estancia en la universidad conocimientos importantes, brindaron lecciones de vida y sobre todo me dieron su apoyo. A todos los chicos que me ayudaron durante cada proceso de este trabajo.

A los laboratorios de Química orgánica, Bioprocesos, Químico Biológico y al taller de alimentos (Ing. Juan, al Dr. Andrés, Almita, Edith y Fran).

A mis amigos Alexis, Ivan, Maximiliano, Keyla, Wendy y Luis U. porque cada uno de ustedes con sus consejos y apoyo hicieron que mi vida durante todo este tiempo haya sido una de las mejores épocas, gracias por estar siempre ahí y sacarme una sonrisa. A mi amigo Mauricio por siempre creer en mí y estar en cada momento importante desde hace 14 años y los que faltan.

Agradezco también al C. Alfredo Ortiz Juárez, quien pertenece a la Asociación del Sistema Producto Piña del estado de Oaxaca, A. C. en Loma Bonita, Oaxaca por todas las atenciones brindadas y por el material vegetal otorgado para hacer posible esta investigación.

A las becas de manutención que me fueron dadas por el gobierno federal y estatal.

## DEDICATORIA

Este trabajo es la culminación de una etapa de mi vida y el inicio de una nueva aventura. No hubiese llegado hasta aquí sin la presencia de Dios y el apoyo incondicional de las personas que mas amo en esta vida.

A mis Padres, **Elia y Vicente** por darme todo lo que han podido, por enseñarme que el esfuerzo será una guía para alcanzar mis metas, gracias por estar para mi y siempre alentarme a ser mejor persona, los amo.

A mis hermanas, **Luz, Iris y Angie**, gracias por los días que han sido mi soporte y mi consuelo, por creer en mi y demostrarme su amor de mil formas.

A quienes me han enseñado que el amor de familia no solo proviene de la misma sangre, **María y Celso**, gracias por el apoyo durante esta etapa, por mostrarme todo lo que no sabía que se podía amar, por estar para mí 24/7, por aconsejarme y sobre todo darme lo mejor del mundo.

A mi hijo, **Caleb**, por ser esa energía que me invade y me motiva a ser mejor persona, quien me ha enseñado que se puede amar más allá de lo que se conoce.

En especial a mi cielo **Romualdo**, quien me ha hecho parte de su vida otorgándome la mejor de las experiencias, me ha convertido en fuerza y alegría, gracias por creer en mí, por sostenerme en las caídas y celebrarme mis victorias, por tomarme de la mano y caminar a mi lado sin importar el tiempo o la distancia. Gracias cielo!

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. ....	6
2.1.1 Variedades .....	8
2.1.2 Grado de madurez .....	9
2.1.3 Composición química.....	11
2.1.4 Actividad proteolítica de endopeptidasas cisteínicas en <i>Ananas comosus</i> .....	13
2.1.5 Requerimientos climáticos .....	14
2.2 Residuos agroindustriales de piña en la Cuenca del Papaloapan.....	14
2.3 Área de estudio.....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	19
4. HIPÓTESIS .....	20
5. OBJETIVOS .....	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 Materiales y equipo .....	22
6.2 Muestreo y tratamiento del material vegetal .....	22
6.3 Diseño experimental.....	24
6.4 Preparación de extracto crudo .....	28

6.5	Variables de respuesta.....	28
6.5.1	Potencial de hidrógeno.....	28
6.5.2	Sólidos solubles totales .....	29
6.5.3	Concentración de proteínas .....	29
6.5.4	Actividad proteolítica .....	30
6.6	Análisis estadístico.....	30
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1	Peso de residuo fresco.....	31
7.2	Variables respuesta: pH, °Brix, concentración de proteínas y actividad de peptidasas..	32
7.2.1	Efectos principales en sólidos disueltos. ....	32
7.2.2	Efectos principales para potencial de hidrógeno .....	35
7.2.3	Efectos principales en concentración de proteínas.....	38
7.2.4	Efectos principales en actividad enzimática .....	39
7.2.5	Efecto del tiempo de almacenamiento en las variables respuesta .....	39
7.3	Análisis de correlación entre variables de respuesta. ....	41
8.	CONCLUSIONES.....	45
9.	REFERENCIAS .....	47
	Anexos .....	51
	Anexo I. Curvas de calibración .....	51
	Anexo II. Resultados de experimentos por meses y tiempos .....	52
	Anexo III. Comparaciones de Tukey.....	64
	Anexo IV. Gráficas de resultados .....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información taxonómica de <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. ....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación del grado de madurez por color de la cáscara. ....	10
<b>Tabla 3.</b> Composición de azúcares y ácidos orgánicos para Cayena Lisa.....	12
<b>Tabla 4.</b> Contenido nutricional del fruto de piña. ....	12
<b>Tabla 5.</b> Concentración y actividad de proteasas en variedades de <i>Ananas comosus</i> .....	14
<b>Tabla 6.</b> Genotipos de piña comercial en México. ....	15
<b>Tabla 7.</b> Residuos en Cayena Lisa.....	16
<b>Tabla 8.</b> Residuos agroindustriales generados en el cultivo de piña en México. ....	16
<b>Tabla 9.</b> Factores y variables respuesta. ....	26
<b>Tabla 10.</b> Etiquetas utilizadas para la identificación de las muestras.....	27
<b>Tabla 11.</b> Peso promedio de pulpa y residuos durante los 4 meses de muestreo. ....	31
<b>Tabla 12.</b> Sólidos disueltos (°Brix) en variedades de <i>Ananas comosus</i> .....	32
<b>Tabla 13.</b> Comparación de temperatura medias mensuales durante el 2019. ....	34
<b>Tabla 14.</b> Comparación de valores de pH en diferentes variedades de piña. ....	36
<b>Tabla 15.</b> Efectos principales considerando 30 días de almacenamiento .....	40
<b>Tabla 16.</b> Correlación de Pearson de concentración proteica vs actividad proteolítica (mayo to). ....	43
<b>Tabla 17.</b> Resultados obtenidos del mes de mayo al tiempo cero .....	52
<b>Tabla 18.</b> Resultados obtenidos del mes de mayo al tiempo quince.....	53
<b>Tabla 19.</b> Resultados del mes de mayo al tiempo treinta.....	54
<b>Tabla 20.</b> Resultados del mes de junio al tiempo cero. ....	55
<b>Tabla 21.</b> Resultados del mes de junio al tiempo quince.....	56
<b>Tabla 22.</b> Resultados del mes de junio al tiempo treinta.....	57
<b>Tabla 23.</b> Resultados del mes de julio al tiempo cero. ....	58
<b>Tabla 24.</b> Resultados del mes de julio al tiempo quince.....	59
<b>Tabla 25.</b> Resultados del mes de julio al tiempo treinta.....	60
<b>Tabla 26.</b> Resultados del mes de agosto al tiempo cero.....	61
<b>Tabla 27.</b> Resultados del mes de agosto al tiempo quince.....	62

<b>Tabla 28.</b> Resultados del mes de agosto al tiempo treinta.....	63
<b>Tabla 29.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Mes .....	64
<b>Tabla 30.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez.....	64
<b>Tabla 31.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo .....	64
<b>Tabla 32.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo .....	64
<b>Tabla 33.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Mes .....	64
<b>Tabla 34.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez.....	64
<b>Tabla 35.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo .....	65
<b>Tabla 36.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo .....	65
<b>Tabla 37.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Mes .....	65
<b>Tabla 38.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez.....	65
<b>Tabla 39.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo .....	65
<b>Tabla 40.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo .....	65
<b>Tabla 41.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Mes .....	66
<b>Tabla 42.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez.....	66
<b>Tabla 43.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo .....	66
<b>Tabla 44.</b> Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta de piña y sus partes (PNGWING, 2022).....	7
<b>Figura 2.</b> Códigos de color según NMX-FF-028-SCFI-2008. ....	11
<b>Figura 3.</b> Mapa -de Loma Bonita, Oaxaca (SNIM, 2020). ....	18
<b>Figura 4.</b> Plantación de piña en Loma Bonita (18° 4' 0.4'' N, 95° 53' 32.4'' O).....	23
<b>Figura 5.</b> Material vegetal de <i>Ananas comosus</i> . A) fruto (G5) y B) residuos y pulpa.....	24
<b>Figura 6.</b> Diseño factorial 2 <sup>k</sup> .....	25
<b>Figura 7.</b> Pesos totales de residuos y pulpa en cada mes de recolecta. ....	32
<b>Figura 8.</b> °Brix en residuos el día de la colecta en el período mayo-agosto. ....	33
<b>Figura 9.</b> Efectos principales para °Brix.....	35
<b>Figura 10.</b> Valores de pH de los residuos el día de la colecta durante el período mayo-agosto. .....	36
<b>Figura 11.</b> Efectos principales para pH.....	37
<b>Figura 12.</b> Efectos principales para concentración de proteínas. ....	38
<b>Figura 13.</b> Correlaciones al t <sub>0</sub> en el período mayo-agosto. ....	42
<b>Figura 14.</b> Correlación de Actividad proteolítica y concentración de proteínas del mes de mayo. ....	43
<b>Figura 15.</b> Curva de calibración con BSA.....	51
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración con L-Tirosina.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Actividad proteolítica
BSA	Albumina sérica bovina
Cs	Cáscara
cm	Centímetros
EC.	Clasificación numérica para las enzimas
CP	Concentración proteica
Cz	Corazón
Cr	Corona
cv	Cultivar
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
°Brix	Grados brix
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Kcal	Kilocalorías
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
G2	Piñas de un cuarto de color
G5	Piñas maduras
pH	Potencial de hidrógeno
Pu	Pulpa
SST	Sólidos solubles totales
$t_0$	Tiempo cero
$t_{15}$	Tiempo quince
$t_{30}$	Tiempo treinta
UDC	Unidad digestora de caseína

## RESUMEN

En la Cuenca del Papaloapan, la disposición de los residuos sólidos agroindustriales de piña presenta un gran problema a resolver debido a los enormes volúmenes generados (101792 toneladas en 2019). Dar valor a los desechos de la comercialización de la piña, convirtiéndolos en insumos en la producción de enzimas, es solo una parte del engranaje de la economía circular a esta agroindustria. Para que la producción industrial de enzimas sea técnica y económicamente factible, es importante contar con información del comportamiento en el tiempo de algunas propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de distintos residuos de la piña. Por ello y como prospección, el presente trabajo muestra los resultados del seguimiento de la variación de concentración proteica, actividad proteolítica de las enzimas cisteínicas, concentración de sólidos disueltos y potencial de hidrógeno de los extractos de cuatro residuos de frutos de piña de la variedad Cayena Lisa en dos etapas de maduración, durante los meses de mayor producción: mayo, junio, julio y agosto. Además, se dio seguimiento a los cambios cuantitativos en los parámetros mencionados a los quince y treinta días de almacenamiento a 4 °C. Como resultado, se registró una excelente correlación de la concentración proteica (170 mg/100 mL) y la actividad enzimática en el mes de mayo (221.80 UDC/100 mL) en promedio para todos los residuos sin importar el grado de maduración. En las correlaciones por residuos, la cáscara y la corona, obtuvieron buenas correlaciones (0.8–1.0); mientras que el corazón y la pulpa presentaron correlaciones de 1.0 en ambas etapas de maduración. El efecto del almacenamiento registró una pequeña disminución en concentración de proteína y actividad proteolítica en un 5% máximo, influyendo muy poco en los meses, los residuos y grado de maduración.

## ABSTRACT

The Papaloapan river Basin, the disposal and solid waste management of pineapple agroindustrial represents a major issue to solve due to the enormous quantity generated (101792 tons in 2019). Give a value to waste pineapple, turning it into raw materials in the enzymes production, is just one part of the circular economy gear of this agribusiness. To be technically and economically feasible the industrial enzyme production, it is important to have data about the behavior over time of some physicochemical and biochemical properties of the different pineapple wastes. Then, as prospecting, the present work shows the monitoring variations in protein concentration, proteolytic activity of cysteinic enzymes, concentration of dissolved solids and hydrogen potential, of four different pineapple wastes variety Smooth Cayenne in two stages of fruit ripening during the months of greatest production: May, June, July and August. In addition, the quantitative changes in the mentioned parameters were monitoring after to storage fifteen and thirty days at 4 °C. As result, excellents correlations between protein concentration (170 mg/100 mL) and enzyme activity was recorded in May (221.80 UDC/100 mL) on average for all wastes regardless ripening. Correlations by each wastes: peel and crown obtained good correlations (0.8 – 1.0), while core and pulp presented correlations of 1.0 in both ripening degree. The storage effect registered a little decrease in protein quantity and proteolytic activity in 5% maximum, influencing very little in the months, kind of wastes, and ripening degree.

## 1. INTRODUCCIÓN

La cuenca del Papaloapan se encuentra ubicada en el sureste del país abarcando tres estados: norte de Oaxaca, sur de Puebla y centro de Veracruz. Cuenta con tierras fértiles y un clima cálido-húmedo, factores idóneos para el desarrollo del sector primario, particularmente la agricultura, ganadería y pesca. En esta región se han establecido agroindustrias que aprovechan la producción primaria como la industria azucarera, papelera, cervecera y procesadoras de piña (EMM, 2018).

Tal como la conocemos, la piña (*Ananas comosus* L.) es una fruta tropical popular que es procesada para la obtención de pulpa, jugos y peptidasas. La pulpa y jugo de piña constituyen aproximadamente el 30% del peso total de la fruta, el resto del material vegetal se desecha como residuos que contienen corona, cáscara, corazón, tallo y recortes. Estos residuos de piña representan la materia prima en procesos para la obtención de productos con valor agregado como: ácido cítrico, antioxidantes, biopolímeros, celulosa, ensilados, etanol, fertilizantes, metano, papel, tejidos y bromelina (Nga H.N. Do *et al.*, 2020). Por su tamaño, peso, color amarillo pálido, suavidad de la pulpa y contenido de azúcares, los cultivares de Cayena Lisa son los más solicitados para consumirla fresca y para industrializarla (Arshad *et al.*, 2014).

La producción de piña en México se ha caracterizado por una concentración territorial, no sólo en los estados de Oaxaca y Veracruz sino además en una región específica, la Cuenca del río Papaloapan, que constituyen el 80% de la producción nacional. En dicha zona se encuentran los principales municipios piñeros del país que, si bien pertenecen a estados diferentes, muestran gran similitud de factores climatológicos, topográficos e hidrológicos y, sobre todo, una relativa homogeneidad en aspectos relacionados con las modalidades de cultivo, producción y comercialización de piña. La región productora del Papaloapan comprende nueve municipios como los principales productores de piña. Para el estado de Veracruz, los municipios de Isla, Juan Rodríguez Clara, José Azueta, Chacaltianguis, Medellín, Alvarado y Tlalixcoyan. Para Oaxaca, los municipios de Loma Bonita y San Juan Bautista Tuxtepec contribuyen con el 99% de la producción del estado y 13.97% de la producción nacional (SIAP, 2020). Derivado de dicha actividad, en la región de la Cuenca del Papaloapan se generan 582 mil toneladas anuales de residuos provenientes del procesamiento del enlatado de piña y por ello, existe la posibilidad del procesamiento *in situ* de los residuos agroindustriales de la piña para la comercialización de

diversos productos, entre ellos, peptidasas (Doukani K., 2015; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2020).

El incremento global en la producción industrial de enzimas provenientes de frutas tropicales posibilita la comercialización de la piña. En 2019, el 24% del mercado internacional de enzimas fueron peptidasas. Las peptidasas son enzimas del grupo de las hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos mediante hidrólisis (Brix y Stöcker, 2013). Bromelina, es el nombre comúnmente utilizado para una familia de enzimas proteolíticas pertenecientes a las peptidasas, particularmente a las endopeptidasas cisteínicas, que tienen amplia especificidad en la escisión de proteínas y que son obtenidas de la planta de piña. Se conocen cuatro endopeptidasas cisteínicas de la planta: bromelina de fruto, bromelina de tallo, ananaína y comosaína (Rowan y Buttle, 1994). Dado que la bromelina es de origen natural, diferentes orígenes del material biológico pueden exhibir variabilidad en su actividad proteolítica o actividad fisiológica. Por ejemplo, se ha estudiado la actividad proteolítica de las peptidasas en residuos de diferentes cultivares de piña, como la Española Roja, Morris, Nang Lae, Phu Lae y N36, encontrando resultados diferentes según el cultivar (Hajar *et al.*, 2012; Kentawa *et al.*, 2012; Misran *et al.*, 2019).

La maduración de la fruta se caracteriza por cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, que determinan las características cualitativas de cualquier cultivar y, finalmente, su depreciación durante la senescencia. Misran *et al.* (2019) informaron que los caracteres físicos, químicos y sensoriales de la piña muestran una diferencia significativa en varias etapas de maduración. El crecimiento y desarrollo de la fruta implican cambios que incluyen su morfología, anatomía, fisiología y bioquímica. Cuando una fruta madura, los cambios asociados incluyen cambios en la textura de la cáscara, la composición del jugo y el sabor.

Como prospección, el presente trabajo muestra los resultados del seguimiento de la cuantificación de la concentración proteica, actividad proteolítica de las enzimas cisteínicas y parámetros fisicoquímicos de los extractos de residuos de plantas de piña de la variedad Cayena Lisa en dos etapas de crecimiento, a modo de considerar la posible comercialización de los residuos agrícolas y agroindustriales de plantas completas de piña, cultivar utilizado en México para su enlatado.

## 2. ANTECEDENTES

La piña es conocida en México desde tiempos prehispánicos y es un cultivo de mucho interés e importancia. El cultivar Cayena Lisa, el más cultivado en todo el mundo, se introdujo en Hawái a principios del siglo XX. Entre 2010 y 2017, la demanda internacional tuvo una tendencia creciente anual de hasta un 26.5%, debido a que es considerada por los consumidores americanos y europeos como una de las más finas frutas tropicales por su excelente sabor y sus propiedades culinarias (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2019; SIAP, 2020). En 2019, la producción mundial de piña fue de 27 millones de toneladas, el 24% de la producción total de frutas tropicales. En ese mismo año, México se posicionó en el noveno lugar en la clasificación mundial en producción de piña, con 1 041 000 toneladas (SIAP, 2020).

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2021) registró que México produjo en 2020 1 209 000 toneladas de piña, cifra que implicó un crecimiento de 16.1 % en comparación con el año previo. De acuerdo con cifras reportadas por el SIAP, (2020) la piña fue el fruto que más creció en el campo mexicano en 2019, a pesar del incremento en la producción de piña a nivel nacional, el país continúa ubicado en el noveno productor a nivel mundial. El 80% de esta producción se cultiva en la zona de la Cuenca del Papaloapan, en el sur de Veracruz y el norte de Oaxaca. La presencia de más de 3000 piñeros en esta región representa una complejidad para los cronogramas de siembra y cosecha, así como para la comercialización. A pesar de la cercanía con el mayor consumidor de piña en el mundo, México solo exporta alrededor del 5.9% de su producción total, mientras que el mercado nacional de frescos consume el 80%, y el resto se destina a la industria de alimentos enlatados.

La producción de piña en el país se ha caracterizado por una evidente concentración territorial, en los estados de Oaxaca y Veracruz sino además en una región específica, la cuenca del río Papaloapan. En dicha zona se encuentran los principales municipios piñeros del país que, si bien pertenecen a estados diferentes, muestran gran similitud de factores climatológicos, topográficos e hidrológicos y, sobre todo, una relativa homogeneidad en aspectos relacionados con las modalidades de cultivo, producción y comercialización de piña. Derivado de dicha actividad, en la región de la Cuenca del Papaloapan se generan 582 mil toneladas anuales de residuos provenientes del procesamiento del enlatado de piña, por ello el procesamiento *in situ* de los

residuos agroindustriales de la piña para la comercialización de diversos productos podría resultar factible (Doukani K., 2015; SIAP, 2020).

## 2.1 *Ananas comosus* (L.) Merr.

La piña es el fruto de una planta monocotiledónea, *Ananas comosus* (L.) Merr., que pertenece a la familia Bromeliaceae. En esta familia, existen cerca de 50 géneros y alrededor de 200 especies, la mayoría son plantas xerófitas epífitas altamente eficientes en el aprovechamiento del agua. Todos los tipos comerciales de piña pertenecen al género *Ananas* y en particular, a la especie comestible *comosus* (D'Eeckenbrugge *et al.*, 2011). La Tabla 1 muestra la información taxonómica de la piña, así como sus variedades y algunos cultivares conocidos en México.

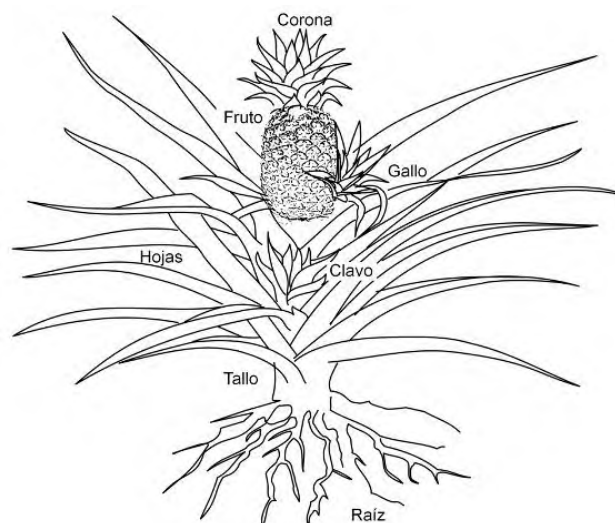
**Tabla 1.** Información taxonómica de *Ananas comosus* (L.) Merr.

Taxonomía	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Commelinidae Zingiberidae</i>
Orden:	<i>Bromeliales</i>
Familia:	<i>Bromeliaceae</i>
Género:	<i>Ananas</i>
Especie:	<i>Comosus</i>
Variedad:	<i>erectifolius</i> (domesticada, fibras y como ornamento) <i>bracteatus</i> (domesticada, cercos vivos y como ornamento), <i>bracteatus</i> (domesticada, cercos vivos y como ornamento), <i>ananassoides</i> (silvestre) <i>paraguayensis</i> (silvestre)
Cultivares de <i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>	Cayena Lisa Champaka Perola

Fuente: (ITIS, 2021)

La piña es una planta herbácea, perenne, alógama y autoincompatible que se caracteriza principalmente por una reproducción asexual a través de hijuelos. La planta adulta llega a medir entre 1.0 m de altura y 2.0 m de ancho, dependiendo de la longitud de la hoja. El sistema radical es superficial y depende esencialmente de las características físicas del suelo. El tallo es corto, presenta entrenudos y yemas para el desarrollo de retoños y raíces; mide de 20 a 40 cm de longitud y tiene un diámetro de 3.5 a 6.5 cm. Las hojas tienen forma de espadas dentadas con una espina en el ápice y pueden llegar a alcanzar hasta un metro de largo. Una vez desarrollado

el eje floral se forma el fruto entre la roseta de las hojas. Como se observa en la Figura 1 las principales partes que componen a una planta de piña madura en la que destacan las raíces, el tallo, las hojas, el fruto, además de los hijuelos conocidos como gallos y clavos. El pedúnculo es la prolongación del tallo que se desarrolla cuando la planta completa su crecimiento vegetativo, se manifiesta por el engrosamiento en el tallo en el meristemo terminal en donde se desarrolla la inflorescencia que finalmente origina al fruto. La floración puede ser inducida de manera artificial, mediante la aplicación directa o indirecta de etileno, para asegurar la uniformidad del cultivo. Las flores de piña son de color lavanda (*var.* Cayena Lisa y Champaka) o amarillas (*var.* MD-2); son hermafroditas y trímeras, con tres sépalos, tres pétalos, seis estambres en dos espirales y un pistilo tricarpelar. Los carpelos junto con sus brácteas adheridas a un eje central (el corazón) se hacen carnosos y se unen para formar la fruta compuesta de la piña, la cual madura en cinco meses. En la parte superior del fruto se localiza la corona, la cual se desarrolla mientras dura la formación del fruto. Después entra en estado de letargo y solo reanuda su desarrollo cuando se separa el fruto y se establece en algún medio de cultivo (Wali, 2019).



**Figura 1.** Planta de piña y sus partes (PNGWING, 2022).

### 2.1.1 Variedades

La piña es una especie tropical de mucha demanda que posee diferentes variedades o clones, puede ser clasificada tomando en consideración la superficie sembrada, el volumen de producción, el valor y la participación de este fruto en los mercados mundiales y en México.

#### 2.1.1.1 Cayena Lisa

El cultivar Cayena Lisa fue recolectado por primera vez en 1819 en la Guayana Francesa, luego el cultivo se extendió rápidamente a todas las regiones tropicales y subtropicales, hoy en día se cultiva ampliamente en todo el mundo. La planta es mediana mide entre 80 a 100 cm, sus hojas pueden llegar a ser de 100 cm de largo y 6 cm de ancho y presentar espinas en la parte superior y algunas en la base. La propagación vegetativa es normalmente por brotes que son bastante limitados en la producción. El ciclo de producción de Cayena Lisa es más largo que la mayoría de cultivares y esto se complica en climas fríos. El fruto es ovalado y grueso que mide en promedio 30 cm de largo y 15 cm de diámetro. La pulpa comestible se rodea de brácteas verdes que pasan a anaranjadas al madurar, formando la piel del fruto. En el extremo superior las brácteas se transforman en una corona de hojas. La pulpa, amarilla o blanca, es carnosa, aromática, jugosa y dulce. En su interior hay un tronco fibroso duro que va desde la corona al pedículo conocido como corazón. El peso promedio del fruto comercial es de 3.0 kg. El cultivar ha sido la columna vertebral de la industria mundial de la piña durante más de un siglo y ha sido utilizado con frecuencia como padre para la cría de nuevas variedades (Bartholomew *et al.*, 2003; Quiroa Robles, 2015; Sun *et al.*, 2016). La composición de la parte comestible del fruto de la piña Cayena presenta variaciones relacionadas con el manejo de la plantación, ambiente y grado de madurez. Tiene un contenido de 14 a 19% de sólidos totales, de ellos los azúcares: sacarosa, glucosa y fructuosa son los principales componentes, con valores de 11 a 17° Brix; en conjunto, los carbohidratos representan hasta el 85% de los sólidos totales y la fibra del 2 al 3%. De los ácidos orgánicos, el cítrico es el más abundante, con cantidades que varían entre 0.4 a 1.2%. La pulpa se caracteriza por la presencia de bajas cantidades de cenizas y compuestos nitrogenados en 0.01%. Del 25 al 30% de los compuestos nitrogenados corresponden a proteasas, de las cuales el 80% presentan actividad proteolítica.

#### 2.1.1.2 Española Roja

El fruto es de tamaño mediano entre 1.2 a 2 kg, de color naranja y forma de barril. La pulpa es firme, pálida y dulce, con un contenido de azúcar moderado de alrededor de 12 °Brix, pero baja acidez. La planta es de tamaño mediano, con hojas de color verde oscuro espinosas. Las brácteas florales son de intenso rojo brillante. Es vigorosa y tolerante a la alta temperatura, la sequía, pardeamiento interno y *Phytophthora* sp. pero no a nemátodos (Bartholomew *et al.*, 2003).

#### 2.1.1.3 Perola

El fruto es pequeño a mediano (0.9 - 1.6 kg), ovoide cuando es pequeño y cónica al madurar, es verde con un color amarillo iluminado en el centro de los ojos maduros. La pulpa es blanca, suave y jugosa con un exquisito aroma. Su azúcar de 13 a 16 °Brix y el contenido de ácido ascórbico es alto. La planta es de tamaño mediano y vigorosa, con hojas verde oscuro, erguidas y espinosas. Es una variedad muy resistente, mostrando resistencia a *Phytophthora* sp. y nemátodos (Bartholomew *et al.*, 2003).

#### 2.1.1.4 Híbrido MD-2

El híbrido MD-2, también llamado *piña miel*, *golden sweet* o *extra sweet*, fue desarrollado por la empresa Del Monte Fresh Produce Incorporated en Hawai a partir de un cruce efectuado entre los híbridos del PRI 58-1184 y 59-443 para el mercado de fruta fresca. MD-2 da un fruto grande (1.3 a 2.5 kg), con grandes ojos planos y un intenso color amarillo anaranjado. La pulpa es amarillo claro, dulce, compacta y fibrosa. Tiene un alto contenido en azúcar (15 a 17 °Brix) y ácido ascórbico, pero más bajo en acidez total que Cayena Lisa. El núcleo es blando, comestible y delgado. Las hojas son de color verde amarillo con una punta de color rojizo y son en su mayoría sin espinas. Es susceptible a la pudrición del núcleo y a *Phytophthora* sp. (Bartholomew *et al.*, 2003).

#### 2.1.2 Grado de madurez

La apariencia de la fruta es la primera impresión que se percibe y el componente más importante para la aceptación y compra del producto en fresco. López Camelo (2003) menciona que una característica importante para el consumo de frutas es el color, debido a que puede ser señal de gran calidad o bien un indicativo de que la fruta está lista para ser sometida a diferentes procesos dependiendo de la demanda. García *et al.* (2011) indican que hay diversos métodos para la

evaluación en la calidad del fruto de piña que se basan en técnicas de medición del color, las cuales ayudan a evaluar el fruto sin ocasionar daños y poder predecir los estados de maduración.

En México, la Norma Mexicana NMX-FF-028-SCFI-2008 establece las especificaciones mínimas de calidad que debe cumplir la piña en sus distintas variedades para ser comercializadas en estado fresco en el territorio nacional, después de su acondicionamiento. En esta norma, el fruto se clasifica por grados de calidad y por color. La clasificación por grado de calidad se describe como: extra, primera y segunda. La clasificación por color se realiza independientemente del grado de calidad (Tabla 2 y Figura 2). El código de color es útil para los productores y empresas enlatadoras ya que el código G5 es el valor indicado para la comercialización de la fruta en “fresco”, mientras que el código G2 es el valor generalmente utilizado en la comercialización de la fruta para su enlatado.

García Taín *et al.*, (2011) y Garcidueñas Paz, (2013) han estudiado ampliamente el proceso de maduración de la piña, en donde influye el manejo de la plantación, el ambiente y la variedad. Bartolomé *et al.*, (1995) informaron que a medida que la fruta madura se vuelve menos firme y más aromática.

**Tabla 2.** Clasificación del grado de madurez por color de la cáscara.

Intervalo de color en cáscara	Código de color NMX-FF-028-SCFI-2008	Nombre comercial
Inicio de color amarillo	G0	Sazona
1% al 12%	G1	“de ojo”
13% al 37%	G2	¼ de color
38% al 62%	G3	½ de madurez
63% al 87%	G4	¾ de madurez
88% al 100%	G5	Madura
100% inicia el color anaranjado	G6	Sobre madura

Fuente: NMX-FF-028-SCFI-2008



Figura 2. Códigos de color según NMX-FF-028-SCFI-2008.

### 2.1.3 Composición química

La composición química de la piña para la parte comestible del fruto dependerá del grado de madurez, involucrando a dos elementos principales como lo son la acidez y el contenido de azúcares, aunque también influye el manejo de la plantación, las condiciones ambientales y la variedad.

El aumento en la acidez de la fruta se denota durante el crecimiento de la piña y conforme esta va madurando, la acidez irá disminuyendo. Los ácidos orgánicos presentes en el fruto juegan un papel importante en la estabilización del potencial de hidrógeno de la savia celular y además participan en la fotosíntesis, la síntesis de fenoles, el metabolismo de aminoácidos, lípidos y de las sustancias aromáticas (Sun *et al.*, 2016). A diferencia de los ácidos en la fruta, la dulzura depende de la concentración de azúcar que se sintetice y acumule en la pulpa durante el crecimiento del fruto (Dorey *et al.*, 2016). La calidad de la fruta se basa en el contenido de azúcar que posee, además que es de importancia para la síntesis de pigmentos, aminoácidos, vitaminas, sustancias aromáticas y otros compuestos nutricionales (Sánchez *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

Sun *et al.* (2016) analizaron diferentes cultivares de piña tradicionales e informaron que la fructosa, glucosa y sacarosa forman parte de los principales azúcares solubles de la fruta, así mismo mencionan que los principales ácidos orgánicos de la fruta son el ácido cítrico y el ácido málico. La Tabla muestra la composición de azúcares solubles y diferentes ácidos orgánicos para el cultivar Cayena Lisa.

**Tabla 3.** Composición de azúcares y ácidos orgánicos para Cayena Lisa.

Cultivar Cayena Lisa	(mg/g de peso fresco)
Fructosa	21.03
Glucosa	24.25
Sacarosa	64.76
Azúcar total	110.05
Ácido cítrico	4.44
Ácido málico	1.61
Ácido quínico	1.02
Otros ácidos orgánicos	7.07

Fuente: Sun *et al.* (2016)

La composición nutricional de la piña es bien conocida, debido a que la calidad gustativa también depende de la proporción de componentes que la pulpa posea. La Tabla 4 muestra en términos generales la composición nutricional de la piña.

**Tabla 4.** Contenido nutricional del fruto de piña.

Nutrientes	Valor/100 g	Unidad
Energía	57.00	kcal
Proteína	0.71	g
Lípidos totales (grasas)	0.00	g
Carbohidratos, por diferencia	12.86	g
Fibra dietética total	1.40	g
Azúcares	10.00	g
Calcio	14.00	mg
Hierro	0.26	mg
Sodio	0.00	mg
Vitamina C	34.30	mg
Vitamina A	71.00	IU*
Ácidos grasos, saturados totales	0.00	g
Ácidos grasos, trans total	0.00	g
Colesterol	0.00	mg

Fuente: (USDA, 2020)

#### 2.1.4 Actividad proteolítica de endopeptidasas cisteínicas en *Ananas comosus*

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 2021) ha recomendado usar el término peptidasa para referirse a enzimas que descomponen a las proteínas, mediante la ruptura del enlace peptídico, en unidades más pequeñas, como péptidos o aminoácidos, sin embargo, aún persiste la denominación enzima proteolítica, proteasa o proteinasa.

La bromelina del fruto (EC 3.4.22.33) es la peptidasa de mayor presencia (31 kDa) en el jugo del fruto de la piña, posee una intensa actividad proteolítica que es capaz de no modificarse cuando se encuentra en intervalos de pH entre 3 y 8 a temperaturas máximas de 50 °C. EC 3.4.22.33 está constituida por una secuencia de aminoácidos plegados en dos partes separadas por un puente que posee un sitio activo con un grupo tiol libre. La bromelina del tallo (EC 3.4.22.32) es la peptidasa mayoritaria presente en un 90% en los extractos del tallo de la piña (23.8 kDa) y es estable hasta los 60 °C en un intervalo amplio de pH de 3 a 9. La piña contiene, además, otras endopeptidasas en menor cantidad como lo son, la ananaína (EC 3.4.22.31) y la comosaína. La ananaína tiene un peso molecular de 23.4 kDa e hidroliza proteínas con amplia especificidad para enlaces peptídicos a una temperatura óptima de 25°C, es estable en un intervalo de pH de 3 a 7. La comosaína por su parte, es la glicoproteína menos abundante en el extracto de tallo de piña de 24.5 kDa de peso y representa menos del 1% de las proteínas totales. Otras peptidasas similares se encuentran también presentes en la cáscara, corazón, corona y hojas de la planta de piña (Arshad *et al.*, 2014).

Dado que la bromelina es de origen natural, diferentes orígenes del material biológico pueden exhibir variabilidad en su actividad proteolítica o actividad fisiológica. Misran *et al.* (2019) obtuvieron la actividad proteolítica más alta en la cáscara del fruto de la variedad Morris,  $229.64 \pm 0.54$  UDC/mL obteniendo 0.3 g de bromelina por 100 g de residuo. Nadzirah *et al.* (2012) obtuvieron 1.0 g de bromelina en polvo a partir de 100 g de corona del fruto de piña y con actividad proteolítica de  $529.77 \pm 5.74$  CDU/mg en piña de la variedad N36. En el extracto de corona de piña de los cultivares Phu Lea y Nang Lea, Ketnawa *et al.* (2012) encontraron la mayor cantidad de proteína 220 mg de proteína/100 g de residuo y la más alta actividad proteica ( $322.73 \pm 1.67$  UDC/mL). La Tabla 5 resume estos resultados.

**Tabla 5.** Concentración y actividad de proteasas en variedades de *Ananas comosus*.

<b>Variedad</b>	<b>Concentración de proteasas</b> mg proteasa / 100 g de residuo	<b>Actividad proteolítica</b> CDU/mL
Morris	300 en cáscara	229.64 ± 0.54
N36	1000 en corona	529.77 ± 5.74
Phu Lea	220 en corona	322.73 ± 1.67
Nang Lea	220 en corona	322.73 ± 1.67

Fuente: Ketnawa *et al.* (2012), Misran *et al.* (2019), Nadzirah *et al.* (2012).

### 2.1.5 Requerimientos climáticos

Las características geográficas adecuadas para la producción de piña son distintas, ya que puede ser cultivada en una amplia variedad de suelos. Sin embargo, es indispensable contar con una altitud menor a los 800 metros sobre el nivel del mar, lluvias de 1000 a 1500 mm, temperatura promedio anual entre 25 y 30 °C con una óptima de 27 °C. Los suelos con buen drenaje, aireación, alta cantidad de materia orgánica y un pH ácido (4.5-5.5) son adecuados para el cultivo de piña (Uriza Ávila *et al.*, 2018). En general los hijuelos, gallos o las coronas, se pueden usar como material de siembra y se necesita un período de 18 a 24 meses para la cosecha. La piña se puede cosechar durante todo el año (Sun *et al.*, 2016), pero los meses de junio, julio y agosto son los meses donde se produce aproximadamente 351 toneladas anuales, representando el 33.7% de la producción nacional (SIAP, 2020).

### 2.2 Residuos agroindustriales de piña en la Cuenca del Papaloapan

En nuestro país, diversas regiones productoras de piña mantienen sus cultivares con los genotipos: Cayena Lisa, MD-2, Criollas, Champaka y piñas ornamentales (Uriza Ávila *et al.*, 2018). La Tabla 6, muestra la variación de los genotipos de piña en México.

**Tabla 6.** Genotipos de piña comercial en México.

<b>Genotipos</b>	<b>Producción (%)</b>
Cayena Lisa	60
MD-2	30
Criollas	4
Champaka	≤1
Ornamentales	0.005
Otros	<5

Durante todo el año, el país produce piña de la variedad Cayena Lisa de manera estable, sin embargo, durante los meses de junio hasta agosto se produce el 33.7% del total nacional, unas 351 mil toneladas de frutos, esto es: en la cuarta parte del año se produce la tercera parte de la producción anual (SIAP, 2020). En esta región, una planta completa de piña adulta del cultivar Cayena Lisa pesa en promedio 8.0 kg, considerando las principales estructuras como son el tallo, las hojas, las raíces, el pedúnculo, el fruto y los vástagos (Figura 1).

Para el mismo cultivar, el fruto entero pesa en promedio 3.0 kg, de los cuales el 30% corresponde a la pulpa la cual se aprovecha en el proceso del enlatado de piña en almíbar o en jugo, siendo el resto desechado como residuos agroindustriales que contienen cáscara, corazón, corona, tallo y recortes. Si a estos residuos se les agregan los residuos agrícolas, que son las otras partes de la planta que deben ser retiradas en la plantación como clavos, gallos, hojas, tallos y raíces, los residuos representan el 89 % de la planta entera (8.0 kg aproximadamente) y el 70% del fruto (Uriza Ávila *et al.*, 2018). Esto es, por cada lata de piña en rebanadas se generan 7.1 kg de residuos totales por planta, cuando se renueva todo el acahual, o bien, 2.1 kg de residuos generados por cada fruto (Tabla 7).

**Tabla 7.** Residuos en Cayena Lisa

Partes de la planta	Peso promedio	
	Fruto kg (%)	Planta kg (%)
Pulpa	0.9 (30%)	0.9 (11.25%)
Residuos	2.1 <b>(70%)</b> <i>cáscara, corona, corazón</i>	7.1 <b>(88.75%)</b> <i>clavos, hojas, gallos, tallos</i>
Total	3.0 (100%)	8.0 (100%)

En la Tabla 8 se presentan las cantidades en toneladas de residuos generados en 2020 a partir del fruto de piña en la zona de la Cuenca del Papaloapan, 582 000 toneladas anuales, aproximadamente (SIAP, 2020).

**Tabla 8.** Residuos agroindustriales generados en el cultivo de piña en México.

Producción en toneladas (%)	México (100%)	Veracruz (66.0%)	Oaxaca (14.0%)	Loma Bonita (12.0%)	Tuxtepec (2.0%)
Piña cosechada	104000	686784	145417	124643	20774
Piña para industrialización	208200	137357	29083	24929	4155
Residuos del fruto	728700	<b>480749</b>	<b>101792</b>	87250	14542
Residuos de la planta	2467170	1627678	344638	295404	49234

Fuente: SIAP, (2020)

## 2.4 Aprovechamiento de los residuos agroindustriales

En años recientes, la generación de residuos a partir de piña ha propiciado un impacto ambiental negativo que afecta al sector agrícola mexicano. Por ello, este sector considera alternativas que aprovechen la biomasa generada a partir de piña.

Banerjee *et al.* (2018) señalan que la baja valorización de los residuos de piña se debe a la poca comprensión de su valor económico que éstos podrían proporcionar. Los residuos de piña representan materia prima que se convierte en productos de valor agregado como: ensilados, papel, tejidos, biopolímeros, celulosa y la hemicelulosa, fertilizantes, metano, etanol, ácido cítrico, compuestos antioxidantes y enzimas proteolíticas. Las proteasas provenientes de la piña

tienen aplicación en la industria alimentaria, como ablandador de carne, hidrolizan proteínas solubles de la cerveza, en las industrias vinícola, cosmética y farmacéutica. En el área clínica se han visto exitosamente aplicadas como fitoterapéuticos (Arshad *et al.*, 2014; Banerjee *et al.*, 2018; Sánchez Hernández *et al.*, 2015; Uriza Ávila *et al.*, 2018).

Dado que la mayoría de estos subproductos no tienen un destino específico, pueden desecharse de manera inadecuada causando problemas ambientales. En consecuencia, es de vital importancia reutilizar los subproductos industriales para mejorar la economía del proceso y su sostenibilidad (Selani *et al.*, 2014).

Los extractos obtenidos a partir de los residuos de *Ananas comosus* son una combinación de diferentes cisteíno-endopeptidasas y una mezcla compleja de fosfatasas, glucosidasas, peroxidadas, celulasas, inhibidores, glicoproteínas y carbohidratos (Errasti, 2013). Maurer (2001) informó que elevadas cantidades de endopeptidasas cisteínicas pueden presentar un extenso uso como por ejemplo la aceleración de la cicatrización en heridas, el empleo en terapia de trastornos inflamatorios, aditivos para quimioterapia, entre otras (Salas *et al.*, 2008).

### 2.3 Área de estudio

La ciudad de Loma Bonita está localizada al norte del estado de Oaxaca, en la región de la Cuenca del Papaloapan, en las coordenadas 95° 52' 50" longitud oeste y 18° 06' 25" latitud norte (Figura 3), a una altura de 30 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con los municipios de Otatitlán, Tlacojalpan y Chacaltianguis y al este con los municipios de José Azueta y Playa Vicente, pertenecientes al estado de Veracruz, al sur con los municipios oaxaqueños de Santiago Jocotepec y San Juan Lalana (Distrito de Choapam) y al oeste con los municipios de San Juan Bautista Tuxtepec y Santiago Jocotepec. Es cabecera del municipio con el mismo nombre al que pertenecen 164 localidades de tipo rural distribuidas en una superficie de 588.15 km<sup>2</sup> (INIM, 2020). Su posición dentro de la llanura costera del Golfo le confiere un relieve plano con pequeños lomeríos aledaños que poseen una decena de metros de altura en promedio. Su altitud y la relativa cercanía a la línea de costa condicionan que posea un clima cálido húmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 25°C y un total acumulado de precipitación media anual de 1.90 mm. El mes más cálido es mayo, con una temperatura media de 34.7°C; por su parte, enero posee la temperatura menor del año con 16.6°C como media. El mes más húmedo es septiembre con un promedio pluvial acumulado de 363.70 mm, mientras que el más seco es



### 3. JUSTIFICACIÓN

En la Cuenca del Papaloapan, el manejo de los residuos sólidos agroindustriales de piña ha representado un gran problema debido a que se generan más de 100 mil toneladas anuales. Valorizar los desechos de la comercialización de la piña como insumos para la producción de enzimas, sería solo una parte del engranaje de la economía circular a esta agroindustria.

Para que la producción industrial de enzimas sea técnica y económicamente factible, es importante contar con información del comportamiento en el tiempo de algunas propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de distintos residuos de la piña.

Del seguimiento de la variación de concentración proteica, actividad proteolítica de las enzimas cisteínicas, grados Brix y potencial de hidrógeno de los extractos de cuatro residuos de frutos de piña de la variedad Cayena Lisa en dos etapas de maduración, durante los meses de mayor producción de piña en la Cuenca del Papaloapan (mayo, junio, julio y agosto), se podrá correlacionar los parámetros bioquímicos y fisicoquímicos. Resultados con buenas correlaciones entre la concentración de proteína y la actividad proteolítica de las mismas podrán contribuir en la toma de decisiones en inversión de infraestructura en la industria de producción de peptidasas y por ende a un mayor desarrollo en el sector agrícola de la región.

#### 4. HIPÓTESIS

Existen variaciones significativas en la actividad proteolítica y la concentración de proteínas asociadas a las dos etapas de maduración de los extractos obtenidos de pulpa y residuos (cáscara, corazón, corona) durante los meses de mayor producción (mayo, junio, julio y agosto) generados por la industrialización del cultivar Cayena Lisa de *Ananas comosus* (L.) Merr.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Establecer la correlación en la variación de la actividad proteolítica, concentración proteica, concentración de sólidos disueltos y potencial de hidrógeno de cuatro residuos agroindustriales de *Ananas comosus* (L.) Merr. variedad Cayena Lisa en dos grados de maduración.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Establecer el diseño del experimento: factores y variables respuesta
2. Obtener extractos de muestras de plantas completas de piña en dos etapas de maduración del cultivar Cayena Lisa provenientes de una plantación de Loma Bonita Oaxaca durante los meses de mayo, junio, julio y agosto.
3. Cuantificar cada mes la concentración de proteína, actividad proteolítica, grados Brix y potencial de hidrógeno de los extractos frescos de los residuos cáscara, corazón, corona y pulpa del cultivar Cayena Lisa de *Ananas comosus* en dos etapas de maduración.
4. Cuantificar concentración de proteína, actividad proteolítica, grados Brix y potencial de hidrógeno de los extractos almacenados a 4 °C de los residuos a los 15 y 30 días.
5. Realizar análisis de correlación entre dos variables respuesta.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Materiales y equipo

Los reactivos utilizados: azul de Coomassie G-250, ácido fosfórico al 88%, etanol absoluto, albúmina de suero bovino (BSA), caseína, cisteína, L-tirosina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), disolución tampón de potasio y ácido tricloroacético (TCA), fueron grado analítico marca Aldrich. Para todas las disoluciones amortiguadoras, suspensiones y medios de reacción se utilizó agua destilada, desionizada y esterilizada. Para ello se utilizó una destiladora marca Felisa modelo FE-393, una desionizadora con un sistema de dos cartuchos marca Barnstead modelo B-pure con resistividad de 1.0 M $\Omega$ /cm, COT menor a 5 ppb, libre de partículas con diámetro menor a 0.22 mm y una autoclave eléctrica vertical, modelo GL311 CAT 3060.

La temperatura se midió con un termómetro bimetálico digital con intervalo de temperatura entre -40 y 250  $\pm$  0.1 °C marca Hanna, modelo HI98501. El pH se ajustó con un potenciómetro de mesa marca Hanna Instruments modelo HI 2211 ORP Meter, equipado con un electrodo de vidrio y calibrado con disoluciones amortiguadoras estándar comercial de pH 4, 7 y 10. Para la determinación del porcentaje de sólidos disueltos (°Brix) en extractos de *Ananas comosus* var. Cayena Lisa se utilizó un refractómetro óptico marca Atago Master-M. La centrifugación de las muestras fue realizada en una centrífuga refrigerada marca Thermo Scientific modelo Megafuge 16R. Antes de la utilización de las pipetas automáticas (Eppendorf Research plus) se comprobó el volumen nominal y el volumen mínimo de cada pipeta, además de calibrar por peso. El seguimiento de las reacciones y las curvas de calibración se realizaron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, marca Thermo Scientific modelo Genesys 10S.

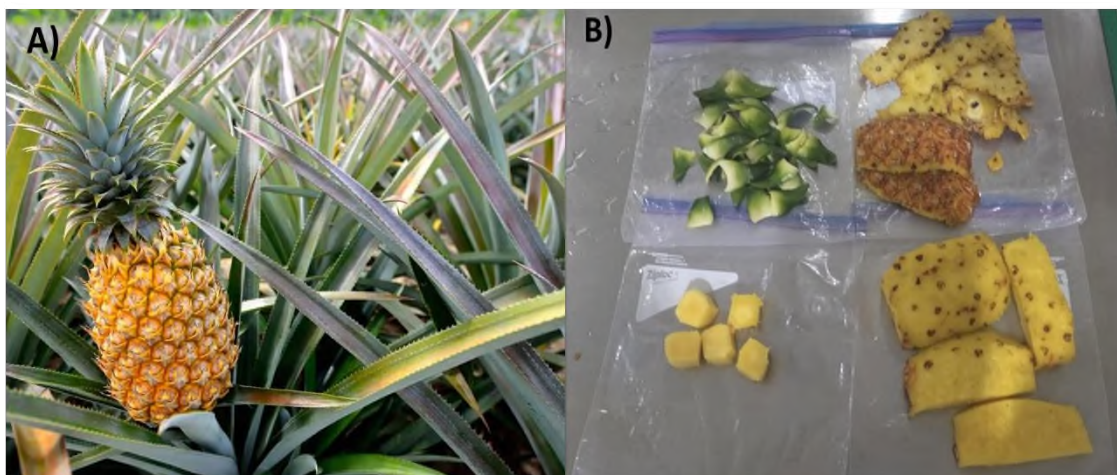
### 6.2 Muestreo y tratamiento del material vegetal

La recolección del material vegetal de *Ananas comosus* (L.) Merr del cultivar Cayena Lisa en dos diferentes estados de madurez fisiológica (grado 2 y grado 5), libres de daños se realizó en horas de la mañana durante los meses de mayo, junio, julio y agosto en una plantación de la Cuenca del Papaloapan (Figura 4) en el municipio de Loma Bonita, Oaxaca, México (coordenadas: 18° 4' 0.4" N, 95° 53' 32.4" O). Para cada etapa de maduración se obtuvo una muestra compuesta por 5 frutos durante cada mes proveniente de un diseño de muestreo aleatorio de campo.



**Figura 4.** Plantación de piña en Loma Bonita ( $18^{\circ} 4' 0.4''$  N,  $95^{\circ} 53' 32.4''$  O).

El material vegetal fresco fue revisado de forma visual directamente en campo, de tal modo que las plantas no mostraran alguna enfermedad o plaga. Posteriormente, el fruto fue trasladado al laboratorio donde fue separado del resto del material vegetal, lavado a chorro de agua para remover el suelo y secado al aire. Ya limpio y seco, se procedió a pelar manualmente cada réplica del fruto de piña. De cada etapa de maduración se obtuvieron los diferentes residuos: cáscara, corazón y corona (Figura 5). Los resultados fueron contrastados utilizando la pulpa como respuesta positiva máxima.



**Figura 5.** Material vegetal de *Ananas comosus*. A) fruto (G5) y B) residuos y pulpa.

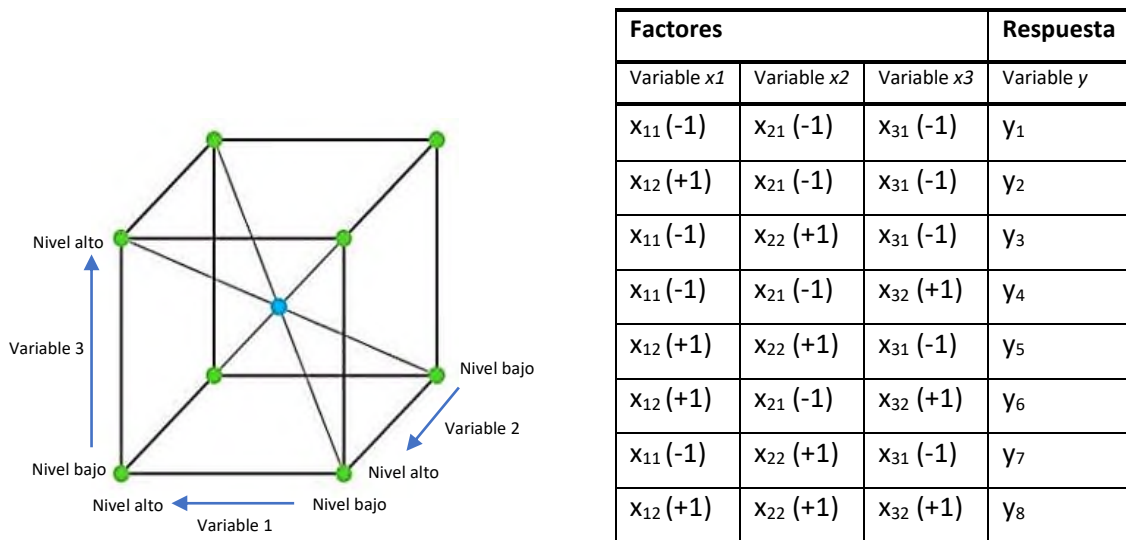
### 6.3 Diseño experimental

El diseño de experimentos (DOE) ayuda a investigar los efectos de las variables de entrada (también conocidas como factores) sobre variables de salida (respuestas) al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de experimentos, o pruebas, en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada. En cada corrida se recolectan datos. El DOE se utiliza para identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan la calidad, para luego determinar la configuración de factores que optimiza los resultados. La ventaja de la implementación del diseño de experimentos en el desarrollo de un proceso radica en la posibilidad de evaluar simultáneamente distintas variables de entrada, o “factores”, como la concentración de los reactivos, catalizador, pH, temperatura y otros promotores que pueden afectar al producto para determinar las condiciones en las que las variables de salida, o “respuestas”, alcancen un valor óptimo.

En un estudio de diseño de experimentos, los factores de interés varían sistemáticamente de su valor más bajo al más alto y se ejecutan todas las combinaciones de factores posibles en el mismo conjunto de experimentos.

Como ejemplo, en un diseño de experimentos de tres factores con dos niveles (Figura 6), los valores pueden representarse en un cubo donde las esquinas muestran las ocho condiciones de

comprobación. En un diseño factorial completo, las condiciones de comprobación resultantes se calculan según la fórmula  $2^k$ , de manera particular  $2^3 = 8$ , lo que lleva a ocho resultados distintos. En la misma Figura puede observarse un ejemplo esquemático de un diseño factorial completo que da lugar a ocho resultados de comprobación distintos y posiblemente a un valor óptimo.



**Figura 6.** Diseño factorial  $2^k$

Los datos obtenidos de un estudio mediante diseño de experimentos se emplean para crear funciones matemáticas que describan mejor la relación entre los factores y las respuestas medidas. Estas ecuaciones pueden ser de primer, segundo u orden mayor, dependiendo de la reacción de las respuestas ante los cambios en los factores.

En un modelo matemático donde  $y$  es la variable de respuesta,  $x_n$  son los factores de entrada y  $\beta_n$  los coeficientes de función, la variable respuesta  $y$  puede representarse con respecto a una o dos variables de entrada ( $x$ ) para crear la superficie de respuesta en dos o tres dimensiones, mediante la expresión:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + e$$

en donde:  $\beta_0$  es un valor constante, el término  $(\beta_1x_1+\beta_2x_2+\beta_3x_3)$  corresponde a los efectos principales de los factores,  $(\beta_{11}x_1^2+\beta_{22}x_2^2+\beta_{33}x_3^2)$  a la curvatura,  $(\beta_{12}x_1x_2+\beta_{13}x_1x_3+\beta_{23}x_2x_3)$  a las interacciones entre factores y  $e$  al error del diseño.

#### 6.4.1 Relación entre las variables de entrada y salida.

Para el estudio prospectivo de la variación de endopeptidasas cisteínicas en residuos agroindustriales de *Ananas comosus* en una plantación de Loma Bonita, Oaxaca, se aplicó un diseño experimental tipo  $2^k$ . El diseño experimental consta de 3 factores o variables independientes: el período de muestreo, el grado de madurez y el tipo de residuo con tres réplicas (Tabla 9). La variable  $x_1$ , que es el grado de madurez (G2 o piñas verdes en su valor mínimo y G5 o piñas maduras en su valor máximo), la variable  $x_2$ , que es el tipo de residuo (corazón, corona, cáscara, pulpa), y la variable  $x_3$ , el período de muestreo (mayo, junio, julio y agosto). El primer factor a dos niveles, mientras dos factores se consideraron a 4 niveles. El número de variables respuesta quedaría  $2^k \times 4^k$  por triplicado, es decir  $2^1 \times 4^2 \times 3=96$  resultados en un día de muestreo. Lo mismo a los 15 y 30 días de la preservación de la muestra a 4 °C.

**Tabla 9.** Factores y variables respuesta.

Variables de entrada (factores)				Variables respuesta	Constantes
Grado de madurez	Residuo	Meses	Réplicas		
G2	Cs cáscara	Mayo	1	<i>pH</i>	<i>Plantación</i>
	Cr corona	Junio			
G5	Cz corazón	Julio	2	<i>Concentración de proteínas</i>	<i>Hora de muestreo</i>
	Pu pulpa	Agosto			
			3		

La Tabla 10 muestra las etiquetas de cada experimento realizado el día del muestreo (tiempo cero,  $t_0$ ). En el Anexo II se presentan los resultados de los 288 experimentos a los tiempos  $t_0$ ,  $t_{15}$  y  $t_{30}$ , esto es, el día del muestreo, y a los 15 y 30 días de almacenamiento a 4°C.

**Tabla 10.** Etiquetas utilizadas para la identificación de las muestras.

PROMEDIO	Replicas			G5				G2			
	1	2	3	Cs*	Cr*	Cz*	Pu*	Cs*	Cr*	Cz*	Pu*
Myg5PHCsT0PM	Myg5PHCsTOR1	Myg5PHCsTOR2	Myg5PHCsTOR3	Myg5PHCsTOR1	Myg5PHCsTOR2	Myg5PHCsTOR3	Myg5PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR2	Myg2PHCsTOR3	Myg2PHCsTOR1
Myg5GBCsT0PM	Myg5GBCsTOR1	Myg5GBCsTOR2	Myg5GBCsTOR3	Myg5GBCsTOR1	Myg5GBCsTOR2	Myg5GBCsTOR3	Myg5GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR2	Myg2GBCsTOR3	Myg2GBCsTOR1
Myg5CPCsT0PM	Myg5CPCsTOR1	Myg5CPCsTOR2	Myg5CPCsTOR3	Myg5CPCsTOR1	Myg5CPCsTOR2	Myg5CPCsTOR3	Myg5CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR2	Myg2CPCsTOR3	Myg2CPCsTOR1
Myg5APCsT0PM	Myg5APCsTOR1	Myg5APCsTOR2	Myg5APCsTOR3	Myg5APCsTOR1	Myg5APCsTOR2	Myg5APCsTOR3	Myg5APCsTOR1	Myg2APCsTOR1	Myg2APCsTOR2	Myg2APCsTOR3	Myg2APCsTOR1
Myg5PHCzT0PM	Myg5PHCzTOR1	Myg5PHCzTOR2	Myg5PHCzTOR3	Myg5PHCzTOR1	Myg5PHCzTOR2	Myg5PHCzTOR3	Myg5PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR2	Myg2PHCzTOR3	Myg2PHCzTOR1
Myg5GBCzT0PM	Myg5GBCzTOR1	Myg5GBCzTOR2	Myg5GBCzTOR3	Myg5GBCzTOR1	Myg5GBCzTOR2	Myg5GBCzTOR3	Myg5GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR2	Myg2GBCzTOR3	Myg2GBCzTOR1
Myg5CPCzT0PM	Myg5CPCzTOR1	Myg5CPCzTOR2	Myg5CPCzTOR3	Myg5CPCzTOR1	Myg5CPCzTOR2	Myg5CPCzTOR3	Myg5CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR2	Myg2CPCzTOR3	Myg2CPCzTOR1
Myg5APCzT0PM	Myg5APCzTOR1	Myg5APCzTOR2	Myg5APCzTOR3	Myg5APCzTOR1	Myg5APCzTOR2	Myg5APCzTOR3	Myg5APCzTOR1	Myg2APCzTOR1	Myg2APCzTOR2	Myg2APCzTOR3	Myg2APCzTOR1
Myg5PHPuT0PM	Myg5PHPuTOR1	Myg5PHPuTOR2	Myg5PHPuTOR3	Myg5PHPuTOR1	Myg5PHPuTOR2	Myg5PHPuTOR3	Myg5PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR2	Myg2PHPuTOR3	Myg2PHPuTOR1
Myg5GBCPuT0PM	Myg5GBCPuTOR1	Myg5GBCPuTOR2	Myg5GBCPuTOR3	Myg5GBCPuTOR1	Myg5GBCPuTOR2	Myg5GBCPuTOR3	Myg5GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR2	Myg2GBCPuTOR3	Myg2GBCPuTOR1
Myg5CPCPuT0PM	Myg5CPCPuTOR1	Myg5CPCPuTOR2	Myg5CPCPuTOR3	Myg5CPCPuTOR1	Myg5CPCPuTOR2	Myg5CPCPuTOR3	Myg5CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR2	Myg2CPCPuTOR3	Myg2CPCPuTOR1
Myg5APPuT0PM	Myg5APPuTOR1	Myg5APPuTOR2	Myg5APPuTOR3	Myg5APPuTOR1	Myg5APPuTOR2	Myg5APPuTOR3	Myg5APPuTOR1	Myg2APPuTOR1	Myg2APPuTOR2	Myg2APPuTOR3	Myg2APPuTOR1
Myg2PCsT0PM	Myg2PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR2	Myg2PHCsTOR3	Myg2PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR2	Myg2PHCsTOR3	Myg2PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR1	Myg2PHCsTOR2	Myg2PHCsTOR3	Myg2PHCsTOR1
Myg2GBCsT0PM	Myg2GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR2	Myg2GBCsTOR3	Myg2GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR2	Myg2GBCsTOR3	Myg2GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR1	Myg2GBCsTOR2	Myg2GBCsTOR3	Myg2GBCsTOR1
Myg2CPCsT0PM	Myg2CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR2	Myg2CPCsTOR3	Myg2CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR2	Myg2CPCsTOR3	Myg2CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR1	Myg2CPCsTOR2	Myg2CPCsTOR3	Myg2CPCsTOR1
Myg2APCsT0PM	Myg2APCsTOR1	Myg2APCsTOR2	Myg2APCsTOR3	Myg2APCsTOR1	Myg2APCsTOR2	Myg2APCsTOR3	Myg2APCsTOR1	Myg2APCsTOR1	Myg2APCsTOR2	Myg2APCsTOR3	Myg2APCsTOR1
Myg2PHCzT0PM	Myg2PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR2	Myg2PHCzTOR3	Myg2PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR2	Myg2PHCzTOR3	Myg2PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR1	Myg2PHCzTOR2	Myg2PHCzTOR3	Myg2PHCzTOR1
Myg2GBCzT0PM	Myg2GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR2	Myg2GBCzTOR3	Myg2GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR2	Myg2GBCzTOR3	Myg2GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR1	Myg2GBCzTOR2	Myg2GBCzTOR3	Myg2GBCzTOR1
Myg2CPCzT0PM	Myg2CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR2	Myg2CPCzTOR3	Myg2CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR2	Myg2CPCzTOR3	Myg2CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR1	Myg2CPCzTOR2	Myg2CPCzTOR3	Myg2CPCzTOR1
Myg2APCzT0PM	Myg2APCzTOR1	Myg2APCzTOR2	Myg2APCzTOR3	Myg2APCzTOR1	Myg2APCzTOR2	Myg2APCzTOR3	Myg2APCzTOR1	Myg2APCzTOR1	Myg2APCzTOR2	Myg2APCzTOR3	Myg2APCzTOR1
Myg2PHPuT0PM	Myg2PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR2	Myg2PHPuTOR3	Myg2PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR2	Myg2PHPuTOR3	Myg2PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR1	Myg2PHPuTOR2	Myg2PHPuTOR3	Myg2PHPuTOR1
Myg2GBCPuT0PM	Myg2GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR2	Myg2GBCPuTOR3	Myg2GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR2	Myg2GBCPuTOR3	Myg2GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR1	Myg2GBCPuTOR2	Myg2GBCPuTOR3	Myg2GBCPuTOR1
Myg2CPCPuT0PM	Myg2CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR2	Myg2CPCPuTOR3	Myg2CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR2	Myg2CPCPuTOR3	Myg2CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR1	Myg2CPCPuTOR2	Myg2CPCPuTOR3	Myg2CPCPuTOR1
Myg2APPuT0PM	Myg2APPuTOR1	Myg2APPuTOR2	Myg2APPuTOR3	Myg2APPuTOR1	Myg2APPuTOR2	Myg2APPuTOR3	Myg2APPuTOR1	Myg2APPuTOR1	Myg2APPuTOR2	Myg2APPuTOR3	Myg2APPuTOR1

\*Cáscara (Cs), Corona (Cr), Corazón (Cz) y Pulpa (Pu).

## 6.4 Preparación de extracto crudo

La Unión Estatal de Productores de Pina en Loma Bonita, Oaxaca proporcionó mensualmente diez plantas completas de piña (5 plantas grado de madurez G2 y 5 grado G5), visualmente sanas y libres de plagas. Las plantas fueron llevadas al taller de alimentos en la Universidad del Papaloapan (UNPA) campus Tuxtepec, donde fueron lavadas y secadas. Cada fruto fue cortado en diferentes partes para la obtención de los residuos: cáscara (Cs), corona (Cr), corazón (Cz) y pulpa (Pu).

Cada residuo de la piña se cortó en trozos pequeños para formar por separado muestras completas, de las cuales se tomaron 100 g de cada residuo y se procedió a moler utilizando un extractor de jugo doméstico marca Oster para obtener los extractos crudos. La mezcla resultante se filtró a través de una malla y mediante una probeta se midió el volumen de cada extracto obtenido. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada extracto crudo (2 mL) por triplicado y se centrifugaron a 10000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido de cada muestra se recogió, registró y se utilizó para los experimentos ya mencionados en diferentes tiempos:

- a) el día de la recolecta del fruto (tiempo de almacenamiento cero a 25 °C,  $t_0$ )
- b) a los quince días (15 días de almacenamiento a 4°C,  $t_{15}$ )
- c) a los treinta días (30 días de almacenamiento a 4°C,  $t_{30}$ )

## 6.5 Variables de respuesta

### 6.5.1 Potencial de hidrógeno

El potencial de hidrógeno de cada muestra se midió por triplicado considerando la norma mexicana NMX-F-317-S-1978, la cual establece la serie de pasos que debe seguirse para una correcta medición del pH. Por ello se realizó, previo a cada período de análisis, la calibración del potenciómetro HI 2211 ORP Meter, marca Hanna Instruments con las disoluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10.

La preparación de las muestras debe ser una etapa esencial en el proceso analítico para que el procedimiento sea correcto, por ello, antes de medir el pH de cada muestra se removió la porción sólida de cada extracto mediante centrifugación a 5000 g en tubos de 15 mL durante 8 min a

temperatura ambiente. Posteriormente, el procedimiento para registrar el pH de cada muestra se realizó de la siguiente manera: el electrodo fue sumergido en el sobrenadante de cada extracto. En cada cambio de muestra el electrodo fue lavado con agua destilada, desionizada y estéril.

### 6.5.2 Sólidos solubles totales

Para la determinación de sólidos disueltos (°Brix) de la piña var. Cayena Lisa se utilizó la NMX-F-103-1982. Esta Norma Mexicana establece el método refractométrico para la determinación de los grados Brix en alimentos. Los grados Brix, indican el por ciento de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado.

La calibración del refractómetro óptico marca Atago Master-M, se realizó añadiendo 40 µL de agua a temperatura ambiente a través del prisma, se colocó el refractómetro en una posición en donde la luz natural o artificial pudiera utilizarse para la iluminación, y se verificó la exactitud del refractómetro en donde el índice de refracción del agua a esta temperatura es cero, posteriormente se limpió cuidadosamente con etanol al 96 % v/v.

Para cargar el refractómetro se utilizaron 40 µL del sobrenadante de cada muestra, fueron colocados de manera que cubrieran perfectamente el prisma y se esperó un minuto para poder obtener el resultado de la muestra. Los resultados se expresaron en grados Brix.

El prisma del refractómetro se limpió después de medir cada muestra.

### 6.5.3 Concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford utilizando albumina sérica bovina (BSA) con una concentración de 0.5 mg/mL como estándar (Bradford, 1976). De los extractos obtenidos para cada residuo se tomaron 2 mL de cada muestra por triplicado, se procedió a centrifugar a 10000 g, durante 20 min a 4 °C para posteriormente utilizar 25 µL del sobrenadante de cada muestra y mezclar con 1 mL del reactivo de Bradford que fue preparado del siguiente modo:

Se mezcló 10 mg de azul de Coomassie G-250 con 10 mL de ácido fosfórico al 88% y 4.7 mL de etanol absoluto, se aforó con agua hasta 100 mL, filtrar y guardar en la oscuridad, posteriormente se registró la absorbancia a longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis frente al blanco.

Antes de medir las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) se dejó que las muestras se incubaran a temperatura ambiente durante 15 minutos. Y se determinó la concentración de proteína de cada muestra utilizando la curva estándar. La absorbancia de las muestras debe registrarse antes del límite de tiempo de 60 minutos y dentro de 10 minutos el uno del otro. La curva de calibración de concentración de proteína BSA se muestra en el Anexo I.

#### 6.5.4 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de los extractos enzimáticos crudos se determinó mediante el método modificado por Kentnawa *et al.*, (2012) utilizando caseína y L-tirosina (concentración de 0.4 mg/mL) como sustrato y estándar, respectivamente. El sobrenadante de los extractos crudos para cada muestra (1.0 mL) se mezcló con 1.0 mL de la disolución (1% p/v de caseína, cisteína 0.03 M, EDTA 0.006 M, en una disolución tampón de fosfato de potasio 0.05 M a pH 7.0). La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 10 min y se detuvo adicionando 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/v. La mezcla de reacción se centrifugó a 8000 *g* durante 10 min. Se midieron las absorbancias de los espectros ultravioleta del sobrenadante obtenido a 275 nm indicada por los péptidos solubles. El ensayo está fundamentado en la hidrólisis proteolítica de la caseína por la enzima. Las endopeptidasas cisteínicas hidrolizan la caseína para liberar L-tirosina.

Una unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que libera un producto equivalente a 1 µg de tirosina/min/mL en las condiciones de ensayo estándar y se expresa como unidades digestoras de caseína por mililitro (UDC/mL). La curva de calibración de actividad de las peptidasas se muestra en el Anexo I.

#### 6.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico Minitab 19. Las diferencias entre las muestras para el potencial de hidrógeno, sólidos solubles totales, concentración proteica y actividad enzimática se determinaron mediante análisis de varianza seguido de la prueba Tukey ( $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Peso de residuo fresco

De los residuos de cada etapa de maduración, las cáscaras fueron las de mayor proporción (32% p/p), especialmente las cáscaras de G5 (0.978 kg), seguido del corazón (19% p/p) y la corona (12.0% p/p) para G5, a diferencia de G2 en donde la corona presenta 20% (p/p) mayor volumen en comparación con el corazón que presenta el 17% (p/p) debido a que en esta etapa la planta aún está en proceso de crecimiento (Bartolomé *et al.*, 1995; Uriza Ávila *et al.*, 2018).

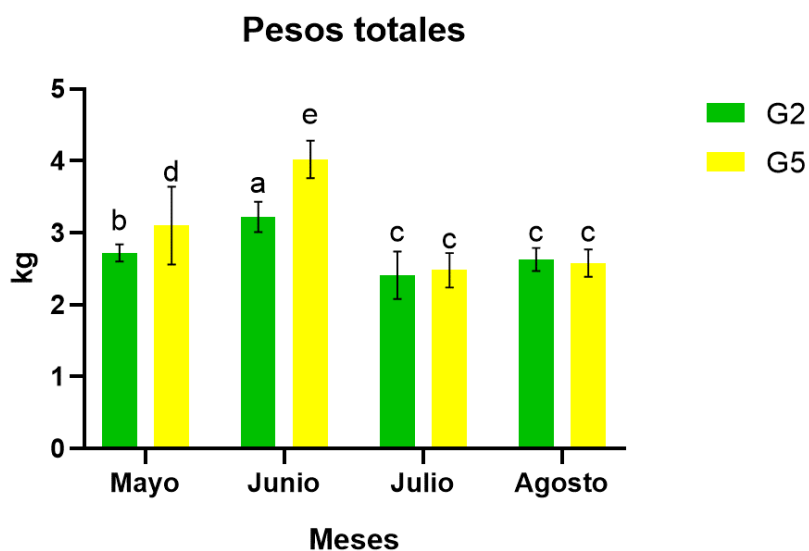
Cada residuo fue pesado por separado (Anexo II). Los valores promedio de residuo se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Peso promedio de pulpa y residuos durante los 4 meses de muestreo.

Residuo	G5 peso promedio		G2 peso promedio	
	kg	% p/p	Kg	% p/p
Cáscara	0.978±0.01	32	0.843±0.05	31
Corona	0.358±0.03	12	0.543±0.02	20
Corazón	0.586±0.01	19	0.462±0.03	17
Pulpa	1.124±0.05	37	0.899±0.01	33
Total:	3.048	100	2.748	100

La pulpa de la fruta mostró la mayor proporción en peso en ambas etapas de maduración del 33-37% (p/p). Sin embargo, el peso total de los residuos (cáscara, corona y corazón) representan el 63% (p/p) para G5 y el 68% (p/p) para G2 del total de la fruta.

El análisis de medias de los pesos, muestra que en junio hubo una cantidad significativamente mayor de residuos para ambas etapas de maduración (Figura 7).



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Figura 7.** Pesos totales de residuos y pulpa en cada mes de recolecta.

## 7.2 Variables respuesta: pH, °Brix, concentración de proteínas y actividad de peptidasas

Con el fin de evaluar el comportamiento fisicoquímico postcosecha de la piña cv. Cayena Lisa se obtuvieron los parámetros, potencial de hidrógeno (pH) y sólidos disueltos totales (°Brix) durante los meses de mayo, junio, julio y agosto en los residuos de piñas verdes (G2) y maduras (G5).

### 7.2.1 Efectos principales en sólidos disueltos.

El contenido de sólidos solubles totales (°Brix) obtenidos el mismo día de la colecta ( $t_0$ ) se muestran en la Tabla 12 junto con otros cultivares de *Ananas comosus* (Ketnawa *et al.*, 2012; Nadzirah *et al.* 2012; Misran *et al.*, 2019) con fines de comparación.

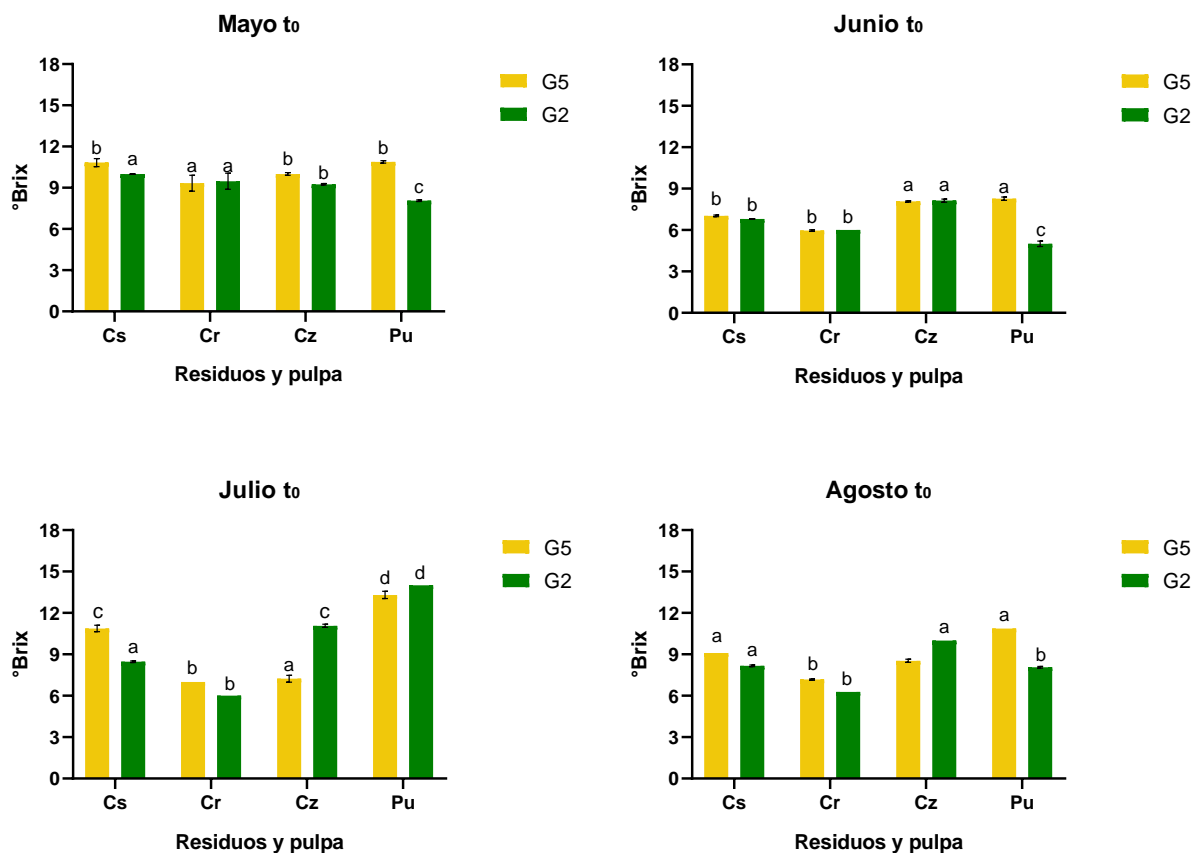
**Tabla 12.** Sólidos disueltos (°Brix) en variedades de *Ananas comosus*.

Variedad	° Brix			
	Cáscara	Corona	Corazón	Otro
Morris <sup>b</sup>	5.73	3.60	4.09	3.99 (pulpa)
N36 <sup>c</sup>	2.55	-	-	-
Phu Lea <sup>a</sup>	4.43	6.27	3.43	2.63 (tallo)
Nang Lea <sup>a</sup>	4.33	3.0	4.73	3.0 (tallo)

Cayena Lisa <sup>d</sup>	-	-	-	11 a 17 (pulpa)
Cayena Lisa en este trabajo	9.1 (11.0 máx.)	7.1 (9.1 máx.)	9.0 (11.0 máx.)	10.5±2.0 (pulpa)

Fuente: <sup>a</sup>Ketnawa *et al.* (2012), <sup>b</sup>Misran *et al.* (2019), <sup>c</sup>Nadzirah *et al.* (2012), <sup>d</sup>Torres *et al.* (2018).

Los resultados obtenidos para *Ananas comosus* cv. Cayena Lisa (11-17 °Brix) son diferentes a los cultivares de piña, Nang Lae, Phu Lae, N36 y la variedad Morris en donde el intervalo de °Brix descrito en la literatura va desde 2.55 para cáscara hasta 6.27 para corona (Ketnawa, *et al.*, 2012; Misran *et al.* 2019). Cabe señalar que todos los residuos analizados del cultivar Cayena Lisa de Loma Bonita Oaxaca, poseen en promedio, una concentración de sólidos solubles totales (SST) de 9.0 para cada uno de los residuos; de manera particular, en junio la pulpa presentó el menor valor de °Brix (5.0) en piñas verdes, mientras que para los meses de julio y agosto la pulpa presentó valores de 14.0 °Brix en piñas G2 (Figura 8).



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Figura 8.** °Brix en residuos el día de la colecta en el período mayo-agosto.

En torno al factor mes se notó que durante junio el residuo cáscara alcanzo niveles de 6.82 °Brix para G2 y 11 °Brix en G5, mientras que durante el mes de agosto el mismo residuo obtuvo valores de 9 °Brix (G2) y 9.1 °Brix (G5), dicho efecto pudo ser inducido por las condiciones climatológicas que se presentaron durante los meses de recolecta como se puede observar en la Tabla 13.

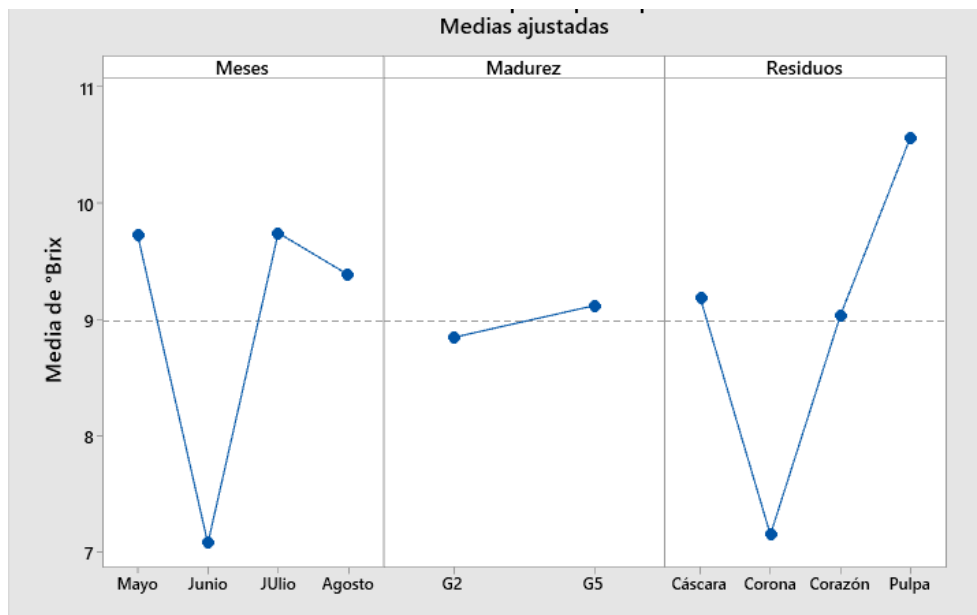
**Tabla 13.** Comparación de temperatura medias mensuales durante el 2019.

Meses	T <sub>máx</sub> (°C)	T <sub>mín</sub> (°C)	Precipitación (mm)
Mayo	38.4	26	2.3
Junio	35.6	25.3	171.7
Julio	34.3	24	211.8
Agosto	35.3	24.9	154.9

Fuente: Soto *et al.*, (2019)

Soto *et al.*, (2019) concluyen en su investigación que la variabilidad climática que se experimentó durante el 2019 se debería de considerar en la toma de decisiones en cuanto al cultivo de piña de la región ya que la temporalidad de plantación, fertilización y fumigación, así como la planeación de la cosecha puede estar modificándose a través del tiempo y afectar a los cultivos de piña.

El análisis de efectos principales del DOE de la variable de entrada °Brix presenta diferencias significativas con los cuatro meses de muestreo. De igual forma con el factor madurez. Mientras que, en el caso de los residuos, el corazón y la cáscara no presentan diferencias significativas (Figura 9, Anexo II).



**Figura 9.** Efectos principales para °Brix

La evaluación de los niveles de °Brix con respecto al factor madurez nos demuestra que no hay diferencia significativa entre G2 y G5, mientras que, en el caso de los residuos, el corazón y la cáscara no presentan diferencias significativas (Figura 9, Anexo II).

### 7.2.2 Efectos principales para potencial de hidrógeno

Los niveles del potencial de hidrógeno obtenidos en el presente trabajo reflejan que la piña Cayena lisa de Loma Bonita, Oaxaca tiene un valor promedio de 4.64 y 4.82 para G2 y G5 respectivamente. Dichos datos son similares a los de otros autores en comparación con las piñas de G2 (Tabla 14).

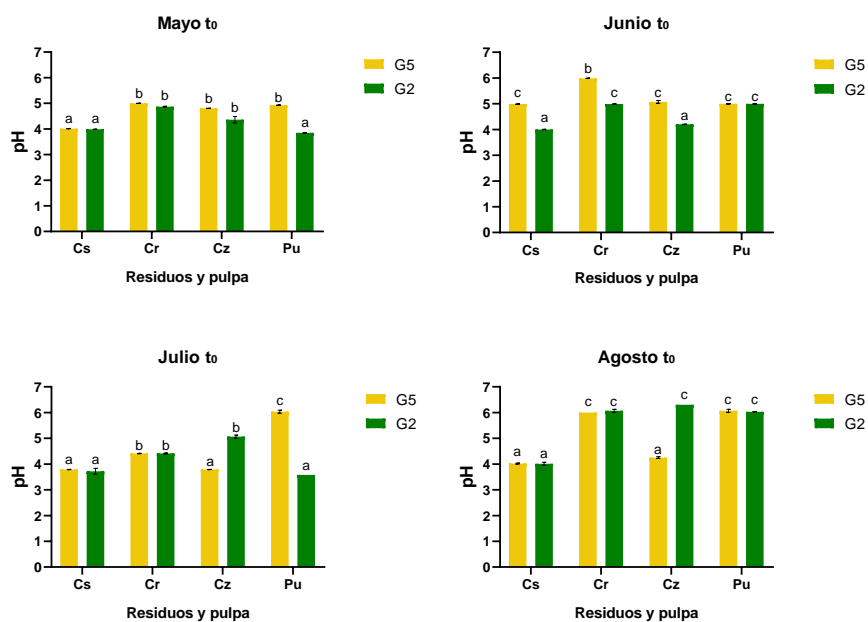
**Tabla 14.** Comparación de valores de pH en diferentes variedades de piña.

Variedad	pH			
	Cáscara	Corona	Corazón	Otro
Morris <sup>b</sup>	4.04	4.09	3.89	3.92 (pulpa)
N36 <sup>c</sup>	3.94	-	-	-
Phu Lea <sup>a</sup>	4.01	4.80	4.09	4.64 (tallo)
Nang Lea <sup>a</sup>	4.02	5.19	4.27	4.76 (tallo)
Cayena Lisa G2 en este trabajo	3.91	5.08	4.98	4.61 (pulpa)
Cayena Lisa G5 en este trabajo	4.20	5.35	4.48	5.26 (pulpa)

Fuente: <sup>a</sup>Ketnawa *et al.* (2012), <sup>b</sup>Misran *et al.* (2019), <sup>c</sup>Nadzirah *et al.* (2012).

Las piñas Cayena Lisa en G5 muestran un incremento de  $\pm 0.48$  unidades a diferencia de las piñas variedad Morris, N36 y de los cultivares Phu Lea y Nang Lea en donde se consideraron piñas maduras para cada experimento.

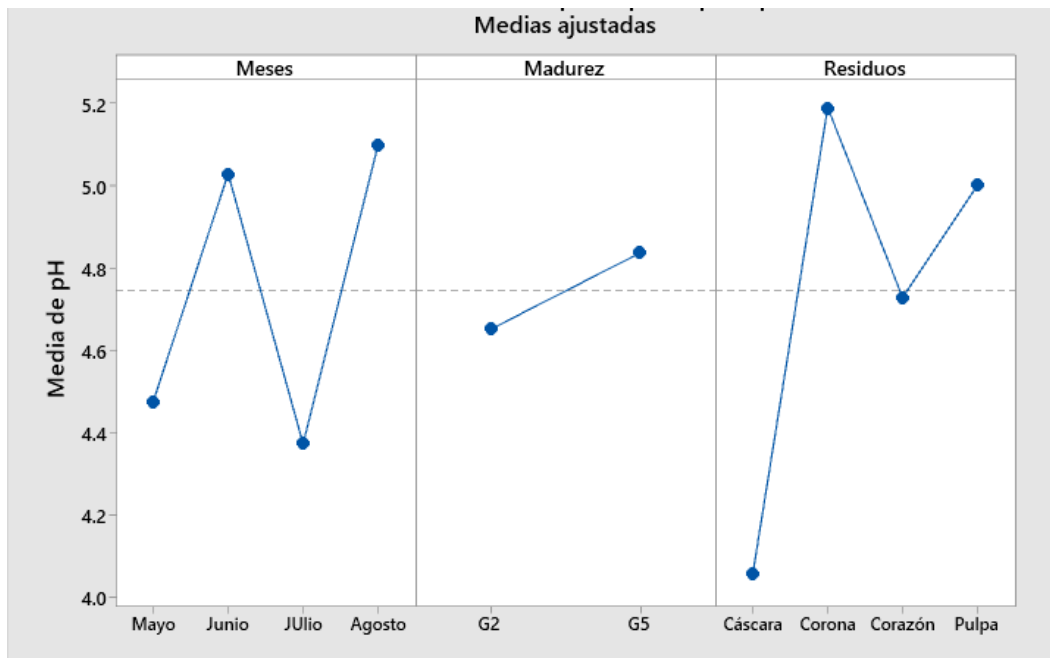
En general, el valor de pH fue mayor para todos los residuos en G5 *versus* G2 durante los cuatro meses; excepto el residuo corazón en julio y agosto. La cáscara fue el residuo que presentó niveles de pH por debajo de 5.0 para ambas etapas de maduración (Figura 10).



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Figura 10.** Valores de pH de los residuos el día de la colecta durante el período mayo-agosto.

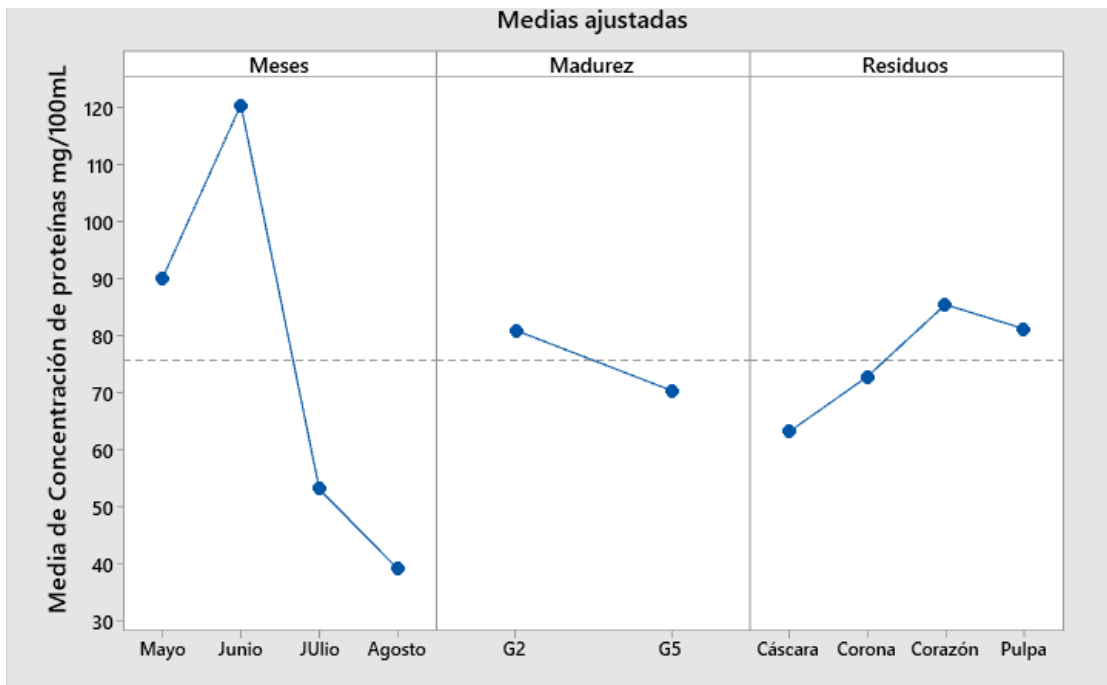
El análisis de efectos principales del DOE de la variable de entrada pH en la comparación Tukey presenta diferencias significativas en la serie de tiempo: mayo, junio, julio y agosto. Sin embargo, mayo/ julio y junio/agosto no son significativamente diferentes. En la comparación con los factores madurez y residuos, el valor de pH es significativamente diferente (Figura 11).



**Figura 11.** Efectos principales para pH

### 7.2.3 Efectos principales en concentración de proteínas

El análisis de efectos principales del DOE para la concentración de proteínas en la comparación Tukey no presenta diferencias significativas en la serie de meses: mayo/ junio y julio/agosto, mientras que en los meses junio/julio si hay diferencias significativas. En la comparación con el factor madurez, la concentración de proteínas no es significativamente diferente; mientras que en el factor residuo, el corazón es significativamente diferente y la cáscara.



**Figura 12.** Efectos principales para concentración de proteínas.

### 7.2.4 Efectos principales en actividad enzimática

Los efectos principales para la actividad enzimática en la comparación Tukey, todos los meses presentan diferencias significativas, al igual que el factor residuo. En la comparación con el factor madurez, la actividad enzimática no es significativamente diferente (Figura 12).

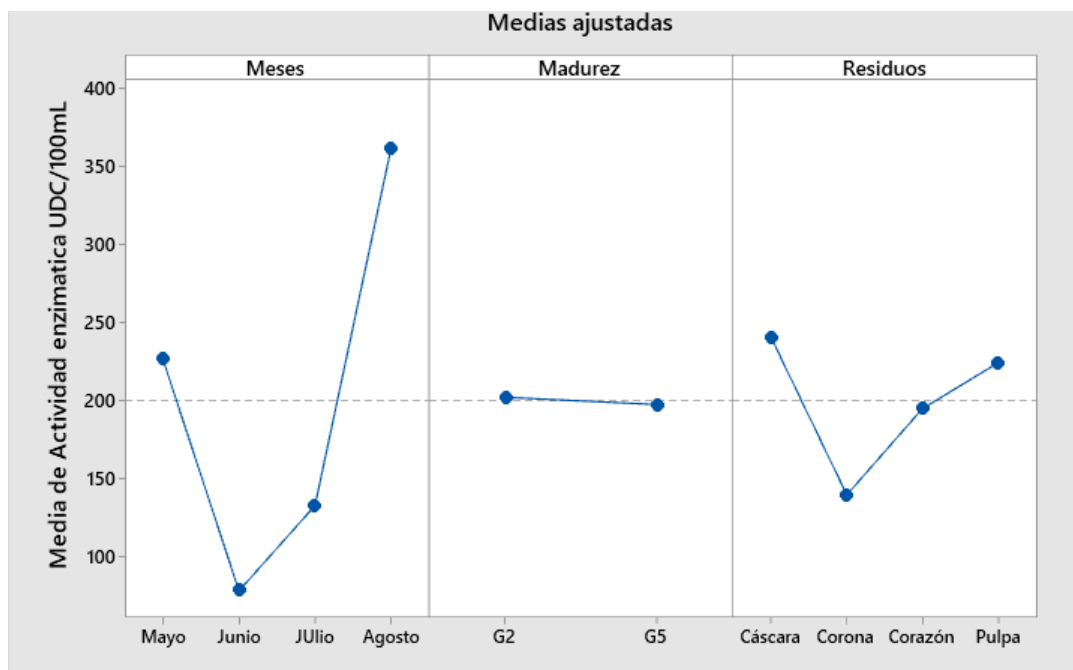


Figura 12. Efectos principales para actividad enzimática.

### 7.2.5 Efecto del tiempo de almacenamiento en las variables respuesta

Para registrar el comportamiento de las variables respuesta durante un período de almacenamiento de treinta días, cada una de las 96 muestras de los extractos fueron almacenadas a 4 °C. A los 15 y 30 días de almacenamiento, los extractos fueron llevados a temperatura ambiente para registrar los valores de °Brix, pH, concentración de proteínas y actividad enzimática de cada extracto. El comportamiento de las medias ajustadas de cada variable de respuesta, incluyendo todos los factores se resume en la Tabla 15. En ella se observa el incremento de valor medio de °Brix de 9 a 10. Efecto que pudiera considerarse de gran valor para el procesamiento de los residuos. Por otra parte, los valores de las variables de respuesta: pH, concentración de proteínas y actividad enzimática tuvieron un descenso claro durante el almacenamiento. El pH tuvo un cambio de una unidad de 4.8 a 3.8; el valor de la concentración de proteínas disminuyó de 80 a 40 mg/mL (medias ajustadas); y la actividad enzimática varió 50 unidades al cambiar su valor de 200 a 150 DCU/mL (medias ajustadas).

**Tabla 15.** Efectos principales considerando 30 días de almacenamiento

Variable respuesta	Efectos principales el día de muestreo (día 0) y a los 15 y 30 días de almacenamiento
° Brix	<p style="text-align: center;"><b>Gráfica de efectos principales para °Brix</b> Medias ajustadas</p> <p>The figure consists of four sub-graphs for °Brix:         <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Mes:</b> Shows values for Mayo (~10.3), Junio (~7.5), Julio (~11.1), and Agosto (~9.0).</li> <li><b>Madurez:</b> Shows values for G2 (~9.1) and G5 (~9.9).</li> <li><b>Residuo:</b> Shows values for Cáscara (~9.7), Corona (~7.7), Corazón (~10.0), and Pulpa (~10.5).</li> <li><b>Tiempo:</b> Shows values for Día 0 (~9.0), Día 15 (~9.6), and Día 30 (~10.0).</li> </ul> </p>
pH	<p style="text-align: center;"><b>Gráfica de efectos principales para pH</b> Medias ajustadas</p> <p>The figure consists of four sub-graphs for pH:         <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Mes:</b> Shows values for Mayo (~4.15), Junio (~4.55), Julio (~3.95), and Agosto (~4.55).</li> <li><b>Madurez:</b> Shows values for G2 (~4.2) and G5 (~4.4).</li> <li><b>Residuo:</b> Shows values for Cáscara (~3.75), Corona (~4.75), Corazón (~4.2), and Pulpa (~4.5).</li> <li><b>Tiempo:</b> Shows values for Día 0 (~4.75), Día 15 (~4.35), and Día 30 (~3.85).</li> </ul> </p>
Concentración de proteínas (mg/mL)	<p style="text-align: center;"><b>Gráfica de efectos principales para Concentración de proteínas</b> Medias ajustadas</p> <p>The figure consists of four sub-graphs for protein concentration:         <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Mes:</b> Shows values for Mayo (~82), Junio (~77), Julio (~38), and Agosto (~30).</li> <li><b>Madurez:</b> Shows values for G2 (~59) and G5 (~55).</li> <li><b>Residuo:</b> Shows values for Cáscara (~49), Corona (~50), Corazón (~65), and Pulpa (~64).</li> <li><b>Tiempo:</b> Shows values for Día 0 (~75), Día 15 (~57), and Día 30 (~39).</li> </ul> </p>
Actividad enzimática (CDU/mL)	<p style="text-align: center;"><b>Gráfica de efectos principales para Actividad enzimática</b> Medias ajustadas</p> <p>The figure consists of four sub-graphs for enzymatic activity:         <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Mes:</b> Shows values for Mayo (~220), Junio (~50), Julio (~100), and Agosto (~280).</li> <li><b>Madurez:</b> Shows values for G2 (~170) and G5 (~165).</li> <li><b>Residuo:</b> Shows values for Cáscara (~200), Corona (~110), Corazón (~160), and Pulpa (~180).</li> <li><b>Tiempo:</b> Shows values for Día 0 (~200), Día 15 (~160), and Día 30 (~135).</li> </ul> </p>

### 7.3 Análisis de correlación entre variables de respuesta.

La correlación determina el grado de asociación entre dos variables y explica el impacto que tiene el cambio de una variable en el cambio de la otra. La correlación sigue los siguientes supuestos:

- a)  $x$  y  $y$  son variables aleatorias, por lo que designarlas como dependiente e independiente dará el mismo resultado.
- b) La población bivariada es normal.
- c) La relación entre  $x$  y  $y$  es lineal.

La correlación está determinada por el coeficiente de correlación ( $r$ = grado de asociación) y se calcula con la fórmula:

$$r_k = \frac{\sum_{i=1}^{N-k} (x_i - \bar{x})(y_{i+k} - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N-k} (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=k+1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

La dirección de la relación entre dos variables es determinada por el signo positivo o negativo de  $r$  (Murray R. Spiegel y Larry J. Stephens, 2016; Pita Fernández y Pérttega Díaz, 2001)

Después de realizar el análisis descriptivo de las variables se procedió a hacer el análisis de correlación entre las variables de estudio que son la concentración proteica y la actividad proteolítica, en los tres tiempos distintos examinados.

Los valores de correlación de Pearson entre las variables respuesta concentración de proteína y actividad proteolítica al tiempo cero durante el mes de mayo fueron entre 0.9788 – 1.0 para todos los residuos en ambos estados de maduración (Tabla 16). El mismo comportamiento se observó

en julio para G5 ( $r=0.9957$ ). Sin embargo, tendencias negativas para G5 se observaron en junio ( $r=-0.9126$ ) y agosto ( $r=-0.7141$ ) (Figura 14, Anexo IV).

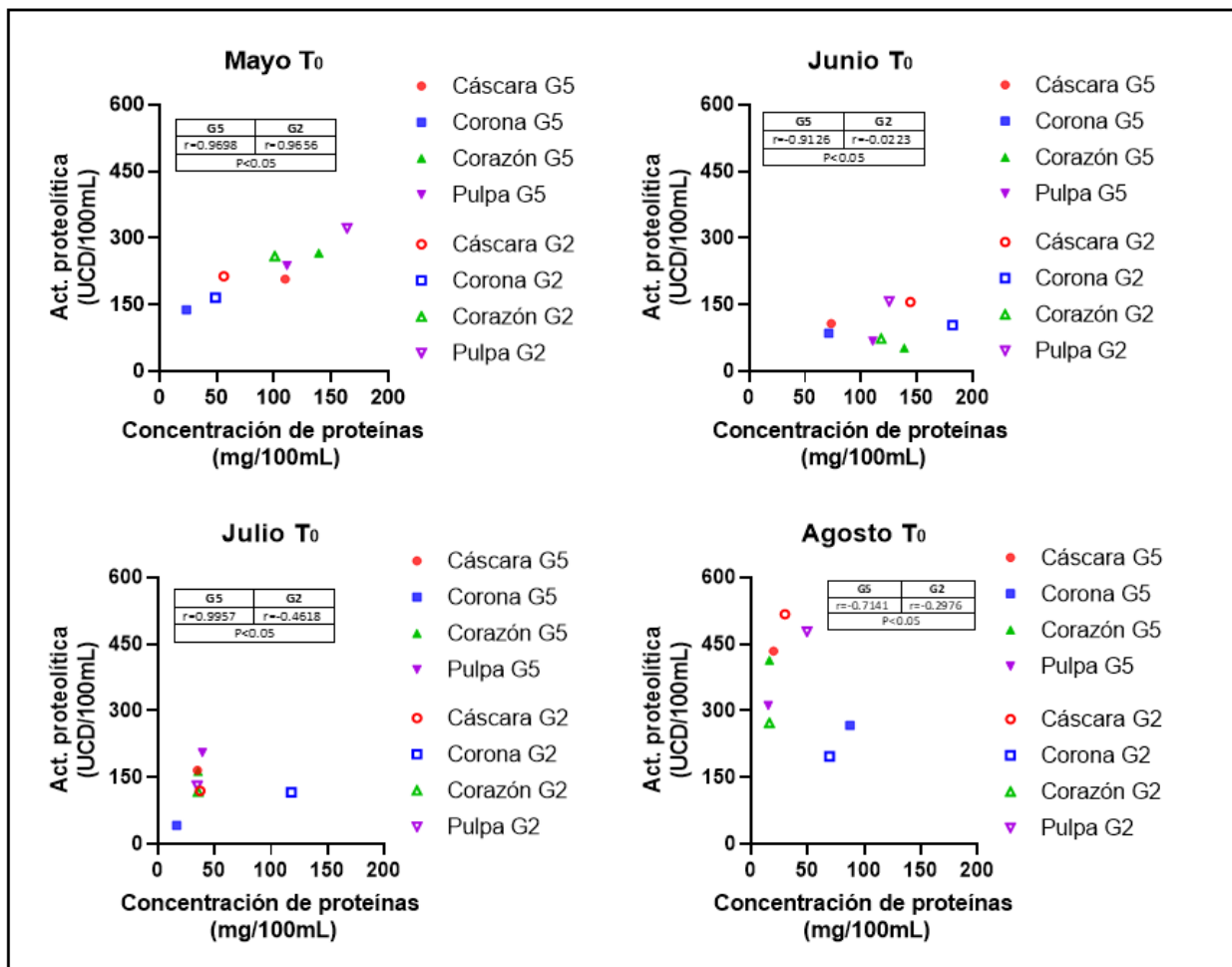


Figura 13. Correlaciones al t<sub>0</sub> en el período mayo-agosto.

En la Tabla 16 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para el mes de mayo en los tres diferentes tiempos de almacenamiento en ambos grados de maduración.

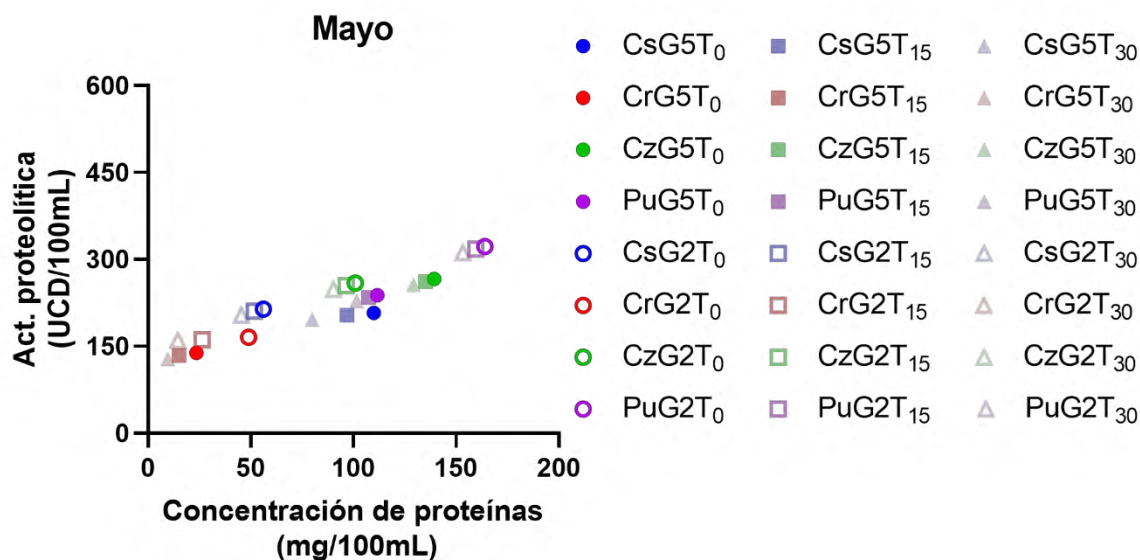
**Tabla 16.** Correlación de Pearson de concentración proteica vs actividad proteolítica (mayo t<sub>0</sub>).

Mayo								
Correlación de Pearson	Cs G5	Cr G5	Cz G5	Pu G5	Cs G2	Cr G2	Cz G2	Pu G2
r	<b>0.9967</b>	<b>0.9788</b>	<b>1<sup>b</sup></b>	<b>1<sup>b</sup></b>	<b>0.9976<sup>a</sup></b>	<b>0.9807</b>	<b>1<sup>c</sup></b>	<b>1<sup>c</sup></b>

Los valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Como se puede observar en la Tabla 16 para el mes de mayo la actividad proteolítica está muy relacionada a la concentración proteica sin importar el grado de maduración, esto quiere decir que al final obtendremos rendimiento similar en ambas etapas.

En las correlaciones por residuos de concentración proteica *versus* actividad proteolítica, la cáscara Cs y la corona Cr, obtuvieron correlaciones entre 0.8 – 1.0; mientras que para el corazón Cz y la pulpa Pu, se presentaron correlaciones de  $r=1.0$  en ambos grados de maduración.



**Figura 14.** Correlación de Actividad proteolítica y concentración de proteínas del mes de mayo.

La Figura 15, muestra que, en mayo, los 30 días de almacenamiento influyen muy poco para todos los residuos y en ambos grados de madurez. Este mismo comportamiento ocurre durante cada mes sin importar el grado de maduración.

Los resultados obtenidos de los tres meses restantes al tiempo inicial presentan correlaciones muy distintas al mes de mayo como se puede observar en la Figura 14. La causa probable de estos cambios pudieran ser los factores climáticos que se presentaron durante cada mes, ya que durante el mes de mayo la precipitación de lluvias para la identidad federativa de Oaxaca fue de 96.9mm a diferencia de los meses de junio (155.8mm.), julio (145.2mm.) y agosto (162.7mm.), otro factor importante al cual el cultivo de piña estuvo expuesto fue la temperatura máxima promedio que fue de 34.9°C, 31.9°C, 30.8°C y 31.7°C respectivamente (CONAGUA, 2019).

## 8. CONCLUSIONES

Durante el almacenamiento, los residuos incrementaron el valor de °Brix. Particularmente en julio, el residuo corazón de piñas G5 tuvo incremento desde 7.2 el día del muestreo hasta 12.3 a los 30 días de almacenamiento. El mismo residuo el mismo mes para piñas G2 tuvo incremento desde 11.0 el día de la colecta  $t_0$ , hasta 14.0 al tiempo  $t_{30}$ .

La correlación total de concentración de proteínas y actividad proteolítica durante el mes de mayo para los cuatro residuos (Cs, Cr, Cz, Pu), dos niveles de maduración (G2 y G5) y treinta días de almacenamiento a 4 °C ( $t_0$ ,  $t_{15}$  y  $t_{30}$ ) fue de  $r=+0.9358$ . Los valores de correlación el día de la colecta ( $t_0$ ) se encuentran en el intervalo de  $+0.9788\pm 1.0$  para todos los residuos en los dos niveles de maduración. Estos datos son de suma importancia para la toma de decisiones de un productor de piña ya que podrían determinar de acuerdo al grado de maduración a qué sector será más factible vender su producto.

La concentración de proteínas al  $t_0$  demostró que el residuo corazón durante los meses de mayo (139.25mg/ 100 mL), junio (138 mg/100mL) y julio (108.81 mg/100mL) obtuvo los valores más altos con respecto a las piñas de G5, mientras que para piñas de G2 el residuo corona expreso concentraciones altas a partir del mes de junio con 182.00 mg/100mL.

Durante la evaluación de los extractos de residuos y pulpa que fueron almacenados a 4°C se observó cómo existe una disminución de la concentración proteica con respecto al tiempo, dado es el caso del residuo cáscara en G5 que comienza con valores de 109.85mg/100mL y decae hasta 79.74mg/100mL al  $t_{30}$ . La evaluación de las concentraciones proteicas de acuerdo al factor madurez indica que no existen diferencias significativas entre G2 y G5, por lo tanto, se considera que el residuo corazón para el mes de mayo es el indicado para obtener altas concentraciones de proteínas (139.25mg/ 100 mL) del cultivar cayena lisa en Loma Bonita.

La actividad enzimática disminuyó en los meses de junio (52.91 UDC/100 mL) y julio (107.02UDC/100mL) respecto a la actividad presentada en el mes inicial de mayo (221.80 UDC/100mL), se esperaría que el mes que tuvo mayor concentración proteica sea aquel que tuviera mayor cantidad de actividad, sin embargo, esto no ocurre siempre ya que para el mes de agosto se presentó la mejor actividad enzimática con un valor promedio de 280.90 UDC/100mL. Por otra parte, el grado de madurez no influye de manera significativa de acuerdo a la actividad

enzimática dado que para G2 se obtuvieron valores promedios de 168.80 UDC/100mL y para G5 162.51 UDC/100 mL. Mientras tanto para los residuos se pudo observar que la cáscara (383.72mg/100mL) predominó sobre la corona (184.68 mg/100mL) en piña de G2 para el mes de agosto.

## 9. REFERENCIAS

- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(17), 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
- Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., & Arora, A. (2018). Valorisation of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science & Technology*, *82*, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.024>
- Bartholomew, D. P., Paull, R. E., Sanewski, & Sanewski, G. M. (2003). *The Pineapple, 2nd Edition: Botany, Production and Uses*. CABI.
- Bartolomé, A. P., Rupérez, P., & Fúster, C. (1995). Pineapple fruit: Morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chemistry*, *53*(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)95790-D](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)95790-D)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brix, K., & Stöcker, W. (Eds.). (2013). *Proteases: Structure and Function*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0885-7>
- CONAGUA. (2019). *Información climatológica* [Gubernamental]. Comisión Nacional del Agua. <https://smn.conagua.gob.mx/tools/RECURSOS/Promedios%20Mensuales/2019/Temperatura%20M%c3%a1xima/MEDIA/201907010000.jpg>
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., M. Sanewski, G., K. Smith, M., France Duval, M., & Leal, F. (2011). Ananas. En *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Texto original: Cereals* (Vol. 47). Springer-Verlag. <https://www.springer.com/gp/book/9783642142277>

- Dorey, E., Fournier, P., Léchaudel, M., & Tixier, P. (2016). Modeling sugar content of pineapple under agro-climatic conditions on Reunion Island. *European Journal of Agronomy*, 73, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.10.010>
- Doukani K. (2015). Environmental applications of enzymes. *Threats and Opportunities*, 37–55.
- EMM. (2018). *Enciclopedia de los municipios de México. Estado de Oaxaca*. Enciclopedia de los municipios de México. Estado de Oaxaca. <https://web.archive.org/web/20110616190754/http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/oaxaca/20reg05.html>
- Errasti, M. E. (2013). *Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina* [Doctoral]. Universidad Nacional de la plata.
- García Taín, Y., García Pereira, A., Hernández Góme, A., & Pérez Padrón, J. (2011). Estudio de la variación del Índice de Color durante la conservación de la piña variedad Cayena Lisa a temperatura ambiente. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 20(4), 12–16.
- Garcidueñas Paz, J. A. (2013). *Caracterización morfológica y molecular de piña Ananas comosus (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro*. Universidad Autonoma de Chapingo.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>
- López Camelo, A. F. (2003). *Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas*. FAOSTAT. <http://www.fao.org/3/y4893s/y4893s00.htm#Contents>
- Maurer, H. R. (2001). Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(9), 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>

- Misran, E., Idris, A., Mat Sarip, S. H., & Ya'akob, H. (2019). Properties of bromelain extract from different parts of the pineapple variety Morris. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *18*, 101095. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101095>
- Nga H.N. Do, Thao P. Luu, Quoc B. Thai, Duyen K. Le, Phung K. Le, & Hai M. Duong. (2020). *Pineapple aerogels from agricultural waste for engineering applications | Morressier Cientifica*. <https://www.morressier.com/article/pineapple-aerogels-agricultural-waste-engineering-applications/5e735fd0cde2b641284a9204>
- Quiroa Robles, C. M. (2015). *Evaluación del rendimiento y caracterización fisicoquímica del extracto acuoso obtenido del fruto de la piña (ananás comosus (L.) Merr.) Variedad cayena lisa y evaluación de la actividad enzimática- mcu- de la bromelina presente a escala laboratorio*. [San Carlos de Guatemala]. PDF.
- Rowan, A. D., & Buttle, D. J. (1994). [38] Pineapple cysteine endopeptidases. En *Methods in Enzymology* (Vol. 244, pp. 555–568). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44040-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44040-9)
- Salas, C. E., Gomes, M. T. R., Hernandez, M., & Lopes, M. T. P. (2008). Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, *69*(12), 2263–2269. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.016>
- Sánchez Hernández, M. Á., Ahuja Mendoza, S., & Acevedo Gomez, R. (2015). Producción de Piña Cayena Lisa y MD2 (Ananas comosus L.) en condiciones de Loma Bonita, Oaxaca. *ECORFAN*, *2*, 11.
- Selani, M. M., Brazaca, S. G. C., dos Santos Dias, C. T., Ratnayake, W. S., Flores, R. A., & Bianchini, A. (2014). Characterisation and potential application of pineapple pomace in an extruded

- product for fibre enhancement. *Food Chemistry*, 163, 23–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.076>
- SIAP. (2020). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Piña, reina de las frutas tropicales.* gob.mx. <http://www.gob.mx/siap/articulos/pina-reina-de-las-frutas-tropicales?idiom=es>
- SNIM. (2020). *SISTEMA NACIONAL DE INFORMACIÓN MUNICIPAL DE OAXACA.*  
<http://www.snim.rami.gob.mx/>
- Soto Molina, V. H., Alanis Méndez, J. L., & PEch Canche, J. M. (2019). Un año de observaciones meteorológicas en Loma Bonita, Oax., México; una referencia climatológica para su industria agropecuaria. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 7(2), 206–221.  
<https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v7i2.85>
- Sun, G.-M., Zhang, X.-M., Soler, A., & Marie-Alphonsine, P. (2016). Nutritional Composition of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). En M. S. J. Simmonds & V. R. Preedy (Eds.), *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 609–637). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00025-8>
- Taxonomy and nomenclature of Ananas comosus* (L.) Merr. (2019).  
[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=42335#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42335#null)
- Uriza Ávila, D., Aguilar Ávila, J., Santoyo Cortés, V. H., Zetina Lezama, R., & Rebolledo Martínez, A. (2018). *La piña mexicana frente al reto de la innovación* (2018a ed.).  
<http://ciestaam.edu.mx/libro/la-pinia-mexicana/>
- USDA. (2020). *U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE* [Servicio de búsqueda para la agricultura]. Pineapple. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/638794/nutrients>

## Anexos

### Anexo I. Curvas de calibración

#### Curva de calibración

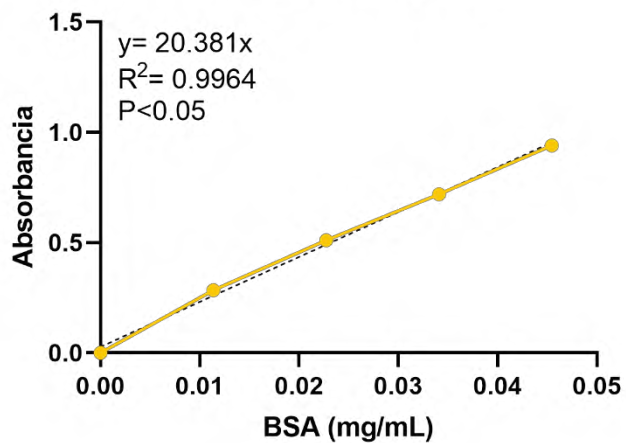


Figura 15. Curva de calibración con BSA

#### Curva de calibración

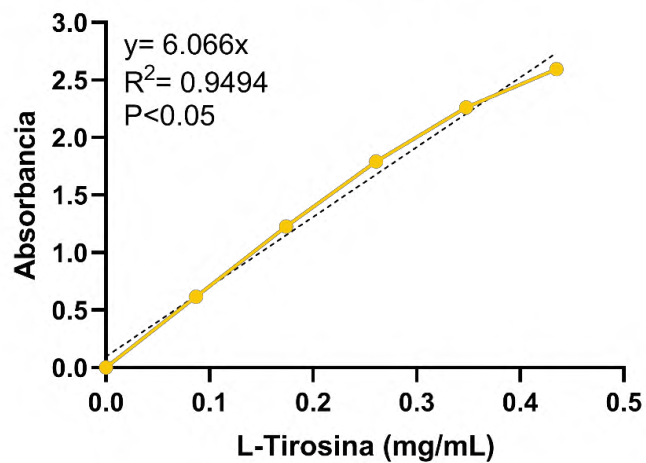


Figura 16. Curva de calibración con L-Tirosina

Anexo II. Resultados de experimentos por meses y tiempos

Tabla 17. Resultados obtenidos del mes de mayo al tiempo cero

Mayo t <sub>0</sub>								
Promedio	G5				G2			
	CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
	1	2	3		1	2	3	
4.01	4.01	4.02	4.01		4.88	4.85	4.87	
10.83	11.00	10.50	11.00		9.50	9.40	9.50	
109.85	109.96	109.83	109.78		14.88	14.88	14.87	
207.61	208.15	208.15	206.52		165.68	165.68	165.67	
5.00	5.00	5.01	4.99		4.36	4.50	4.29	
9.33	9.00	9.00	10.00		9.25	9.30	9.19	
23.54	23.56	23.54	23.53		100.88	100.88	100.88	
138.53	138.54	138.52	138.51		259.12	259.12	259.12	
4.80	4.80	4.80	4.81		3.85	3.84	3.85	
10.00	10.00	10.00	10.00		8.09	8.08	8.10	
139.28	139.27	139.32	139.26		163.94	163.94	163.93	
266.06	266.11	266.06	266.00		322.17	322.17	322.17	
4.93	4.94	4.92	4.92					
10.88	10.86	10.80	10.98					
111.54	111.54	111.54	111.54					
238.32	238.32	238.35	238.28					
3.99	3.99	3.98	3.99					
9.99	9.98	9.99	10.00					
56.13	56.13	56.13	56.12					
214.37	214.37	214.37	214.36					

**Tabla 18.** Resultados obtenidos del mes de mayo al tiempo quince.

Mayo t <sub>15</sub>											
Promedio	ω	2	1	Réplicas							
				G5				G2			
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
3.80	3.81	3.79	3.80								
11.30	11.30	11.30	11.30								
96.70	96.840	97.426	95.841								
203.55	204.183	204.171	202.301								
4.51	4.50	4.51	4.52								
10.99	10.97	10.99	11.00								
15.09	15.096	15.084	15.078								
134.30	134.297	134.298	134.291								
4.32	4.32	4.32	4.32								
11.51	11.51	11.51	11.52								
135.04	135.038	135.042	135.035								
261.79	261.790	261.786	261.780								
4.62	4.63	4.61	4.61								
11.42	11.41	11.43	11.41								
107.35	107.36	107.38	107.32								
234.10	234.12	234.13	234.07								
3.85	3.85	3.85	3.85								
10.92	10.99	10.87	10.90								
51.75	51.76	51.75	51.74								
210.65	210.993	210.987	209.981								
4.71	4.71	4.71	4.72								
9.89	9.90	9.90	9.88								
6.13	6.136	6.130	6.110								
161.30	161.310	161.302	161.292								
3.96	3.96	3.95	3.98								
9.60	9.61	9.58	9.62								
96.51	96.513	96.510	96.498								
254.74	254.748	254.742	254.735								
3.15	3.15	3.14	3.15								
8.60	8.60	8.60	8.60								
159.56	159.56	159.56	159.55								
317.79	317.80	317.79	317.79								

**Tabla 19.** Resultados del mes de mayo al tiempo treinta.

Promedio	Mayo t <sub>30</sub>															
	G5				G2											
	CsG5		CrG5		CzG5		PuG5		CsG2		CrG2		CzG2		PuG2	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
3.60	3.60	3.58	3.62	3.60												
11.51	11.51	11.50	11.52	11.51												
79.75	79.750	79.742	79.750	79.752												
196.49	196.490	196.500	196.490	196.481												
4.00	3.99	4.01	3.99	3.99												
11.30	11.30	11.30	11.30	11.30												
3.46	3.474	3.462	3.474	3.454												
128.48	128.502	128.475	128.502	128.471												
4.02	4.03	4.01	4.03	4.01												
11.81	11.82	11.80	11.82	11.81												
129.22	129.231	129.223	129.231	129.215												
256.04	256.126	256.022	256.126	255.960												
4.28	4.32	4.32	4.32	4.21												
11.22	11.21	11.23	11.21	11.21												
101.50	101.51	101.50	101.51	101.50												
228.25	228.25	228.25	228.25	228.24												
3.64	3.64	3.65	3.64	3.62												
11.40	11.41	11.38	11.41	11.40												
45.44	45.45	45.44	45.45	45.43												
203.68	203.702	203.675	203.702	203.671												
4.50	4.50	4.50	4.50	4.50												
10.40	10.40	10.40	10.40	10.40												
4.46	4.460	4.464	4.460	4.458												
160.47	160.481	160.467	160.481	160.466												
3.85	3.84	3.86	3.84	3.84												
9.82	9.82	9.82	9.82	9.81												
90.19	90.196	90.192	90.196	90.188												
248.43	248.438	248.431	248.438	248.425												
3.02	3.01	3.03	3.01	3.01												
8.87	8.90	8.70	8.90	9.00												
153.25	153.25	153.25	153.25	153.24												
311.50	311.52	311.50	311.52	311.48												

**Tabla 20.** Resultados del mes de junio al tiempo cero.

PROMEDIO	Junio t <sub>0</sub>						
	G5				G2		
	CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2
ω	ν	μ	σ	ω	ν	μ	σ
5.32	4.98	4.99	6.00	4.00	4.00	3.99	4.00
7.03	7.00	7.10	7.00	6.81	6.80	6.82	6.82
73.37	73.372	73.371	73.366	144.26	144.27	144.23	144.23
107.62	107.623	107.615	107.611	156.04	156.047	156.033	156.033
5.99	5.98	5.99	6.00	4.99	5.00	4.97	4.99
5.97	6.00	6.00	5.90	6.01	6.01	6.00	6.00
71.13	71.146	71.130	71.124	182.00	181.990	182.034	182.034
85.78	85.779	85.779	85.779	104.24	104.238	104.242	104.242
5.07	5.10	5.10	5.01	4.20	4.20	4.21	4.20
8.07	8.00	8.10	8.10	8.13	8.20	8.20	8.00
138.63	138.751	138.401	138.743	118.03	118.050	117.997	117.997
42.78	42.783	42.785	42.783	23.79	23.803	23.783	23.783
5.99	6.00	5.98	5.99	5.00	5.00	5.00	4.99
8.27	8.40	8.20	8.20	5.00	5.00	5.00	5.00
110.66	103.93	114.03	114.03	125.23	125.24	125.24	125.20
68.31	68.31	68.31	68.31	37.74	37.76	37.73	37.73

**Tabla 21.** Resultados del mes de junio al tiempo quince.

Junio t <sub>15</sub>											
PROMEDIO	ω	2	1	Réplicas							
				G5				G2			
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
4.99	4.99	4.99	4.98								
7.50	7.50	7.49	7.51								
51.82	51.827	51.825	51.818								
82.27	82.271	82.269	82.266								
6.00	6.00	6.00	6.00								
6.30	6.30	6.30	6.30								
28.04	28.048	28.036	28.028								
70.13	70.129	70.130	70.128								
4.98	4.99	4.97	4.97								
8.40	8.40	8.40	8.40								
117.00	116.853	116.953	117.195								
17.44	17.448	17.442	17.438								
5.97	5.97	5.97	5.97								
8.50	8.50	8.50	8.50								
85.72	82.39	82.38	92.39								
42.97	42.97	42.97	42.97								
3.96	3.95	3.97	3.97								
7.40	7.40	7.40	7.40								
95.56	95.57	95.57	95.53								
124.79	124.782	124.790	124.791								
4.96	4.95	4.97	4.97								
6.50	6.50	6.50	6.50								
84.65	84.644	84.648	84.644								
73.00	72.997	73.001	73.001								
2.99	2.98	2.99	2.99								
8.63	8.70	8.60	8.60								
69.31	69.314	69.308	69.301								
16.23	16.234	16.233	16.231								
4.96	4.96	4.96	4.96								
5.41	5.40	5.40	5.42								
76.51	76.51	76.51	76.50								
10.38	10.38	10.38	10.37								

**Tabla 22.** Resultados del mes de junio al tiempo treinta.

Junio t30						
PROMEDIO	G5			G2		
	ω	ν	ι	ω	ν	ι
	CsG5		CrG5	CzG5	PuG5	
	CsG2		CrG2	CzG2	PuG2	
3.60	3.62	3.58	3.60			
7.80	7.80	7.80	7.80			
21.54	21.542	21.537	21.535			
32.32	32.328	32.324	32.322			
4.88	4.88	4.88	4.88			
6.60	6.60	6.60	6.60			
20.75	20.760	20.750	20.744			
53.85	53.849	53.846	53.845			
3.83	3.84	3.82	3.82			
8.67	8.80	8.60	8.60			
41.29	41.306	41.269	41.281			
9.20	9.209	9.207	9.186			
4.82	4.82	4.82	4.82			
8.80	8.80	8.80	8.80			
29.73	29.76	29.75	29.68			
16.87	16.87	16.87	16.87			
2.80	2.80	2.81	2.80			
7.60	7.60	7.60	7.60			
42.97	42.98	42.98	42.94			
48.70	48.693	48.710	48.688			
3.81	3.78	3.82	3.82			
6.80	6.80	6.80	6.80			
54.62	54.622	54.620	54.614			
32.70	32.702	32.697	32.693			
2.77	2.78	2.75	2.78			
9.00	9.00	9.00	9.00			
34.23	33.101	34.816	34.781			
6.20	6.196	6.203	6.196			
3.84	3.84	3.84	3.84			
5.64	5.67	5.60	5.65			
36.44	36.44	36.44	36.44			
6.50	6.51	6.49	6.49			



**Tabla 24.** Resultados del mes de julio al tiempo quince.

Julio t15											
PROMEDIO	ω	Σ	μ	Réplicas							
				G5				G2			
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
3.59	3.58	3.60	3.60								
11.73	11.80	11.40	12.00								
36.52	36.524	36.524	36.501								
155.82	155.823	155.821	155.822								
4.17	4.20	4.10	4.20								
8.97	9.00	8.90	9.00								
15.70	15.698	15.704	15.704								
34.70	34.70	34.70	34.69								
3.41	3.40	3.41	3.41								
11.93	11.90	11.90	12.00								
58.74	58.773	58.747	58.707								
116.72	116.722	116.723	116.722								
3.50	3.50	3.50	3.50								
16.00	16.00	16.00	16.00								
34.66	34.65	34.67	34.67								
131.23	131.23	131.24	131.23								
3.65	3.66	3.65	3.64								
8.97	9.00	8.90	9.00								
30.69	30.69	30.69	30.69								
108.85	108.848	108.848	108.839								
4.33	4.32	4.33	4.34								
6.03	5.99	5.99	6.10								
111.72	111.722	111.716	111.720								
60.32	60.325	60.325	60.310								
4.91	4.90	4.90	4.92								
13.80	14.20	13.20	14.00								
10.03	10.025	10.025	10.025								
116.73	116.729	116.733	116.723								
3.53	3.52	3.54	3.54								
14.10	14.10	14.10	14.10								
16.26	16.26	16.27	16.26								
99.33	99.33	99.33	99.33								

**Tabla 25.** Resultados del mes de julio al tiempo treinta.

Julio t30												
PROMEDIO	ω	2	1	Réplicas								
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2	
3.00	2.99	3.00	3.00									
13.03	13.00	13.00	13.10									
25.20	25.927	24.843	24.820									
108.85	108.848	108.848	108.839									
4.00	3.99	4.01	4.01									
9.80	9.80	9.60	10.00									
13.22	13.178	13.166	13.322									
23.45	23.46	23.45	23.45									
3.01	3.01	3.01	3.00									
12.30	12.30	12.30	12.31									
44.22	44.221	44.221	44.208									
123.48	123.486	123.484	123.483									
3.42	3.42	3.41	3.42									
15.00	15.00	15.00	15.00									
26.79	26.81	26.81	26.76									
126.63	128.43	125.73	125.73									
3.41	3.42	3.41	3.41									
11.03	11.20	10.90	11.00									
25.39	25.40	25.39	25.39									
74.20	74.199	74.199	74.199									
4.01	3.99	4.01	4.02									
8.00	8.00	8.00	8.00									
23.24	23.242	23.238	23.238									
23.55	23.605	23.605	23.451									
4.51	4.51	4.50	4.51									
14.00	14.00	14.00	14.00									
8.65	8.646	8.660	8.646									
112.56	112.574	112.554	112.544									
3.13	2.99	3.20	3.21									
15.93	16.00	15.80	16.00									
13.23	13.23	13.23	13.23									
89.93	91.10	88.48	90.20									

**Tabla 26.** Resultados del mes de agosto al tiempo cero.

Agosto to											
PROMEDIO	ω	ν	μ	Réplicas							
				G5				G2			
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
4.02	4.03	4.00	4.04								
9.10	9.10	9.10	9.10								
19.87	19.875	19.875	19.870								
434.32	435.328	435.325	432.313								
6.00	6.00	6.00	6.00								
13.97	14.00	14.00	13.90								
87.35	87.356	87.352	87.342								
266.93	266.933	266.933	266.931								
4.25	4.28	4.21	4.25								
8.53	8.60	8.60	8.40								
26.31	26.324	26.312	26.288								
413.94	413.940	413.938	413.935								
4.10	4.10	4.11	4.10								
11.00	11.00	11.00	11.00								
15.24	15.63	15.57	14.52								
311.69	311.71	311.71	311.65								
4.01	4.01	4.01	4.02								
9.02	9.02	9.01	9.02								
29.78	30.54	30.52	28.27								
517.12	517.123	517.123	517.123								
6.07	6.00	6.10	6.10								
11.00	11.00	11.00	11.00								
69.27	69.280	69.272	69.264								
197.01	197.010	197.010	197.019								
6.30	6.30	6.31	6.30								
10.00	10.00	10.00	10.00								
16.27	16.273	16.265	16.265								
272.78	272.771	272.787	272.771								
6.03	6.02	6.04	6.02								
13.97	14.00	14.00	13.90								
49.45	49.45	49.45	49.44								
478.35	478.35	478.35	478.35								

**Tabla 27.** Resultados del mes de agosto al tiempo quince.

Agosto t15											
PROMEDIO	ω	ν	μ	Réplicas							
				G5	G2						
				CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
3.79	3.78	3.79	3.79	3.79	4.42	3.70	3.61	8.70	8.70	5.00	3.87
9.50	9.50	9.50	9.50	9.50	14.30	8.90	8.90	25.22	25.22	10.00	8.80
14.62	14.618	14.615	14.612	14.615	82.138	20.674	20.672	472.344	472.344	168.955	22.86
319.67	319.673	319.670	319.669	319.670	207.101	256.486	256.396	472.344	472.344	180.957	273.08
4.41	4.42	4.42	4.40	4.42	6.00	6.10	6.10	5.85	5.85	5.00	
14.30	14.30	14.31	14.30	14.30	10.90	10.90	10.90	10.90	10.90	10.00	
82.14	82.138	82.138	82.146	82.138	20.649	20.674	20.672	48.844	48.844	12.023	
207.10	207.101	207.102	207.093	207.102	3.70	3.70	3.70	168.955	168.955	180.957	
3.70	3.70	3.70	3.70	3.70	8.40	8.90	8.90	5.10	5.10	5.00	
8.73	8.40	8.90	8.90	8.90	6.00	6.10	6.10	10.00	10.00	10.00	
20.67	20.649	20.674	20.672	20.674	10.90	10.90	10.90	48.844	48.844	48.844	
256.46	256.487	256.486	256.396	256.486	10.48	10.48	10.47	168.955	168.955	168.955	
6.07	6.00	6.10	6.10	6.10	239.39	239.39	239.39	5.85	5.85	5.00	
10.90	10.90	10.90	10.90	10.90	3.61	3.61	3.61	10.90	10.90	10.00	
10.47	10.48	10.48	10.47	10.48	8.70	8.70	8.70	48.844	48.844	48.844	
239.39	239.39	239.39	239.39	239.39	25.21	25.21	25.22	472.344	472.344	472.344	
3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	472.344	472.344	472.344	5.85	5.85	5.00	
8.70	8.70	8.70	8.70	8.70	5.83	5.83	5.85	10.90	10.90	10.00	
25.22	25.21	25.21	25.22	25.21	10.90	10.90	10.90	48.844	48.844	48.844	
472.34	472.344	472.344	472.344	472.344	472.344	472.344	472.344	168.955	168.955	168.955	
5.84	5.85	5.83	5.85	5.83	5.00	5.10	5.00	5.00	5.00	5.00	
10.90	10.90	10.90	10.90	10.90	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	
48.84	48.844	48.844	48.844	48.844	11.986	11.986	12.023	11.986	11.986	12.023	
168.96	168.955	168.955	168.955	168.955	180.957	180.957	180.957	180.957	180.957	180.957	
5.03	5.00	5.10	5.00	5.10	3.87	3.87	3.87	3.87	3.87	3.87	
10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	8.80	8.80	8.80	8.80	8.80	8.80	
12.00	11.986	11.986	12.023	11.986	22.86	22.86	22.92	22.86	22.86	22.92	
180.96	180.957	180.957	180.957	180.957	273.09	273.03	273.12	273.09	273.03	273.12	
3.87	3.87	3.87	3.87	3.87							
8.80	8.80	8.80	8.80	8.80							
22.88	22.86	22.86	22.92	22.86							
273.08	273.09	273.03	273.12	273.09							

**Tabla 28.** Resultados del mes de agosto al tiempo treinta.

Agosto t30								
PROMEDIO	G5				G2			
	1	2	3	Réplicas	1	2	3	Réplicas
	CsG5	CrG5	CzG5	PuG5	CsG2	CrG2	CzG2	PuG2
3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.10	3.10	3.10	3.10
9.70	9.70	9.70	9.70	9.70	8.17	8.20	8.20	8.20
10.12	10.124	10.125	10.124	10.124	19.95	19.95	19.95	19.95
224.24	224.236	224.236	224.236	224.234	334.67	334.674	334.674	334.674
4.07	4.00	4.10	4.10	4.10	5.64	5.64	5.64	5.64
14.50	14.50	14.50	14.50	14.50	11.50	11.50	11.50	11.50
73.67	73.670	73.664	73.670	73.670	37.49	37.490	37.490	37.490
164.05	164.058	164.054	164.058	164.050	104.05	104.052	104.052	104.052
3.12	3.15	3.10	3.10	3.10	4.47	4.40	4.40	4.60
9.37	9.40	9.40	9.40	9.30	11.00	11.00	11.00	11.00
15.35	15.347	15.349	15.349	15.349	6.64	6.642	6.642	6.642
254.49	254.494	254.494	254.494	254.494	159.51	159.513	159.513	159.513
5.17	5.30	5.10	5.10	5.10	3.22	3.22	3.22	3.22
11.50	11.50	11.50	11.50	11.50	8.06	8.09	8.10	8.00
6.58	6.58	6.58	6.58	6.58	12.51	12.51	12.51	12.50
187.27	187.27	187.27	187.27	187.27	303.25	303.25	303.25	303.25
3.10	3.10	3.10	3.10	3.10				
8.17	8.20	8.10	8.10	8.20				
19.95	19.95	19.95	19.95	19.95				
334.67	334.674	334.674	334.674	334.674				
5.64	5.64	5.64	5.64	5.64				
11.50	11.50	11.50	11.50	11.50				
37.49	37.490	37.490	37.490	37.490				
104.05	104.052	104.052	104.052	104.052				
4.47	4.40	4.40	4.40	4.60				
11.00	11.00	11.00	11.00	11.00				
6.64	6.642	6.642	6.642	6.642				
159.51	159.513	159.513	159.513	159.513				
3.22	3.22	3.22	3.22	3.22				
8.06	8.09	8.10	8.10	8.00				
12.51	12.51	12.51	12.51	12.50				
303.25	303.25	303.25	303.25	303.25				

## Anexo III. Comparaciones de Tukey

### Potencial de hidrógeno

**Tabla 29.** Comparaciones por parejas de Tukey: Mes

Mes	N	Media	Agrupación
Junio	72	4.57000	A
Agosto	72	4.55347	A
Mayo	72	4.15083	B
Julio	72	3.96542	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 30.** Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez

Madurez	N	Media	Agrupación
G5	144	4.42271	A
G2	144	4.19715	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 31.** Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo

Residuo	N	Media	Agrupación
Corona	72	4.78236	A
Pulpa	72	4.48069	B
Corazón	72	4.20431	C
Cáscara	72	3.77236	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 32.** Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo

Tiempo	N	Media	Agrupación
Día 0	96	4.74385	A
Día 15	96	4.35698	B
Día 30	96	3.82896	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Grados Brix

**Tabla 33.** Comparaciones por parejas de Tukey: Mes

Mes	N	Media	Agrupación
Julio	72	11.1901	A
Mayo	72	10.3497	B
Agosto	72	9.0493	C
Junio	72	7.4760	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 34.** Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez

Madurez	N	Media	Agrupación
G5	144	9.91820	A
G2	144	9.11437	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 35.** Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo

<b>Residuo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Pulpa	72	10.5521	A
Corazón	72	10.0358	B
Cáscara	72	9.7071	B
Corona	72	7.7701	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes*

**Tabla 36.** Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo

<b>Tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Día 30	96	9.99532	A
Día 15	96	9.57104	B
Día 0	96	8.98250	C

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

## Concentración de proteínas

**Tabla 37.** Comparaciones por parejas de Tukey: Mes

<b>Mes</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Mayo	72	83.1433	A
Junio	72	77.2282	A
Julio	72	38.3019	B
Agosto	72	30.5284	B

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

**Tabla 38.** Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez

<b>Madurez</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
G2	144	58.7873	A
G5	144	55.8136	A

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

**Tabla 39.** Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo

<b>Residuo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Corazón	72	65.5309	A
Pulpa	72	64.3086	A
Corona	72	50.2475	B
Cáscara	72	49.1147	B

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

**Tabla 40.** Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo

<b>Tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Día 0	96	75.6838	A
Día 15	96	57.1209	B
Día 30	96	39.0966	C

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

## Actividad proteolítica

**Tabla 41.** Comparaciones por parejas de Tukey: Mes

<b>Mes</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Agosto	72	280.902	A
Mayo	72	221.809	B
Julio	72	107.024	C
Junio	72	52.910	D

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

**Tabla 42.** Comparaciones por parejas de Tukey: Madurez

<b>Madurez</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
G2	144	168.807	A
G5	144	162.515	A

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

**Tabla 43.** Comparaciones por parejas de Tukey: Residuo

<b>Residuo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Cáscara	72	200.996	A
Pulpa	72	183.805	B
Corazón	72	164.596	C
Corona	72	113.247	D

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

**Tabla 44.** Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo

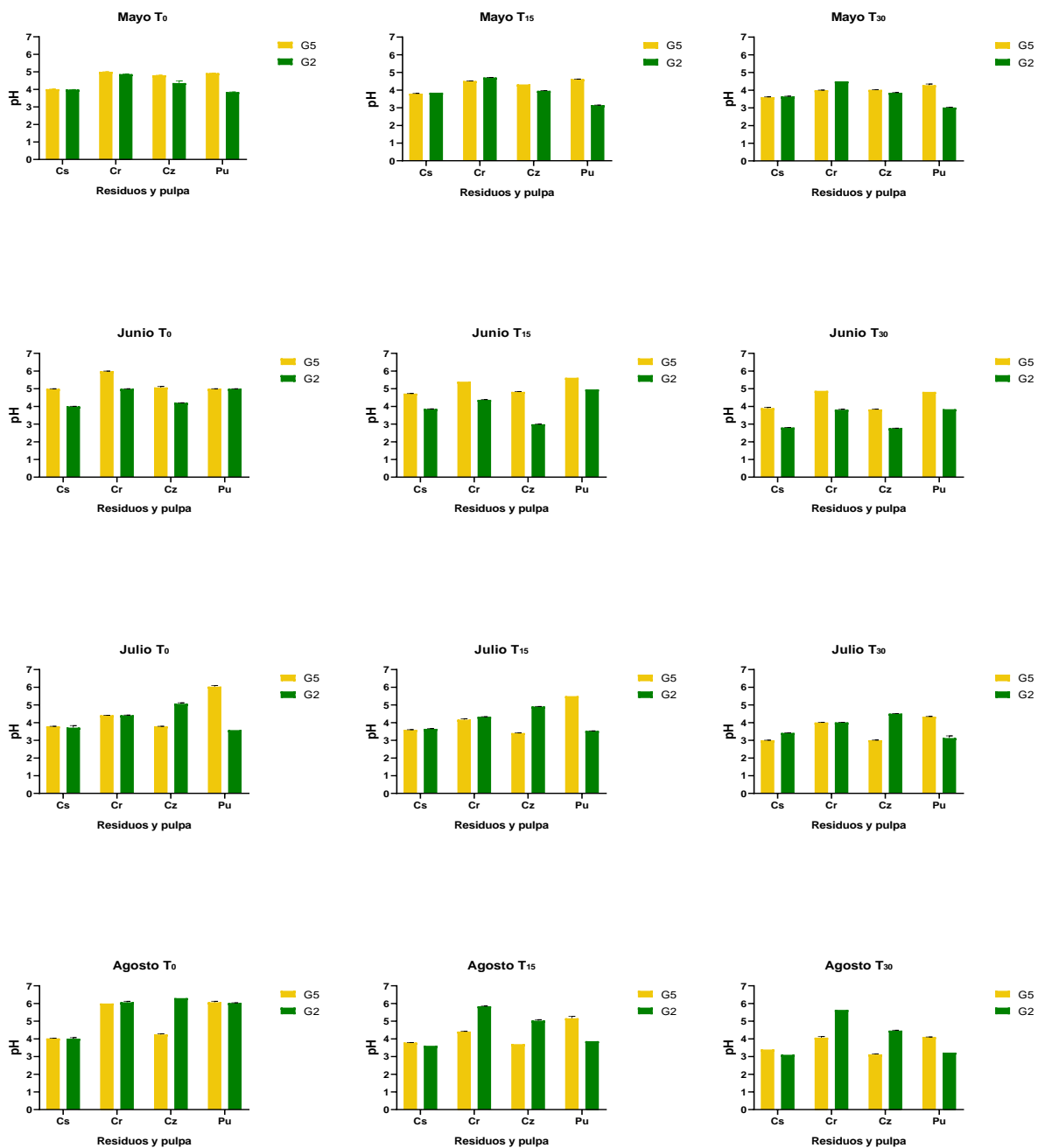
<b>Tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Día 0	96	199.785	A
Día 15	96	161.159	B
Día 30	96	136.040	C

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

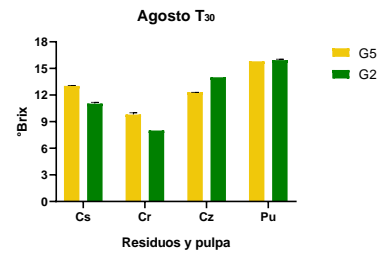
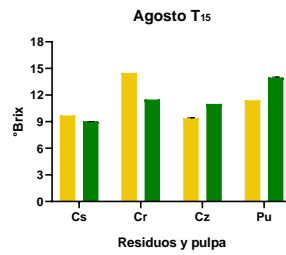
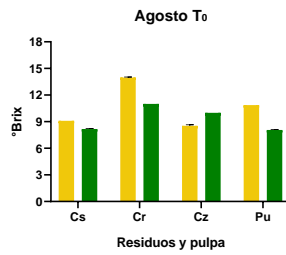
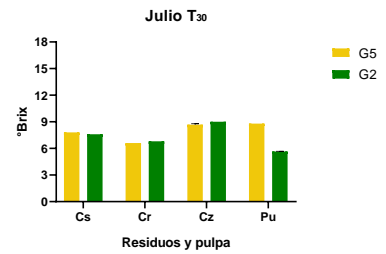
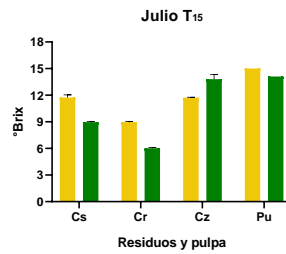
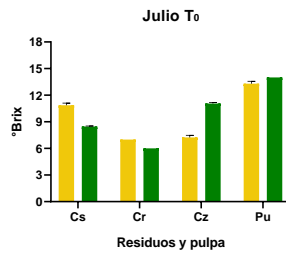
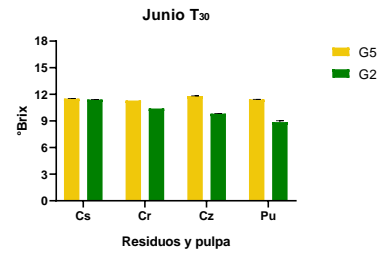
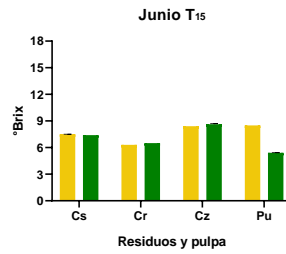
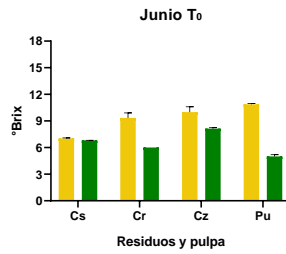
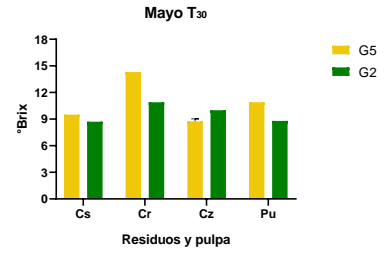
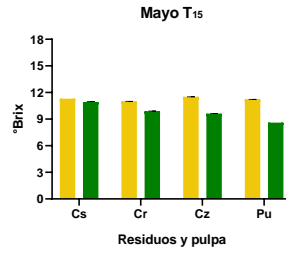
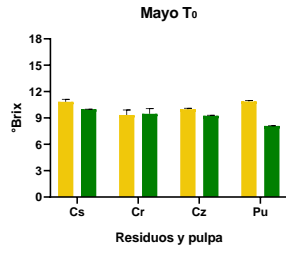
## Anexo IV. Gráficas de resultados

A continuación, se muestran las gráficas de barras de los resultados obtenidos alrededor de los 4 meses de muestreo en los tres diferentes tiempos analizados.

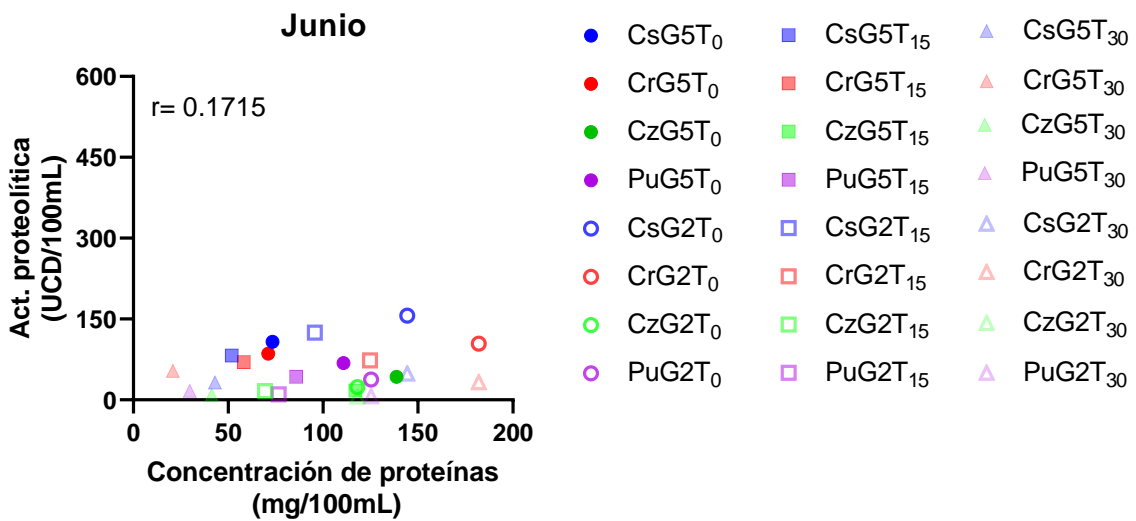
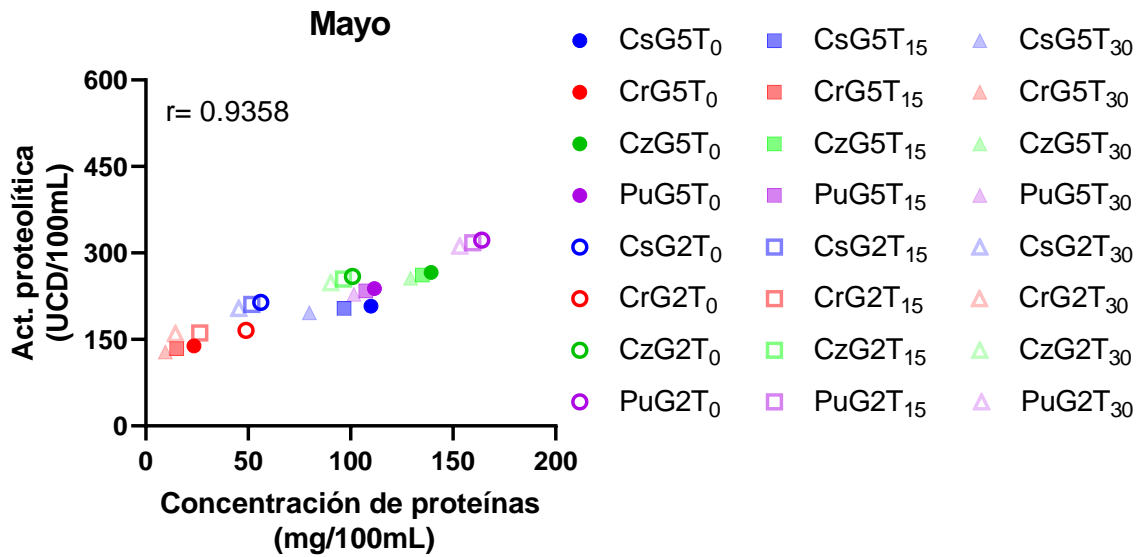
Potencial de hidrógeno (pH)

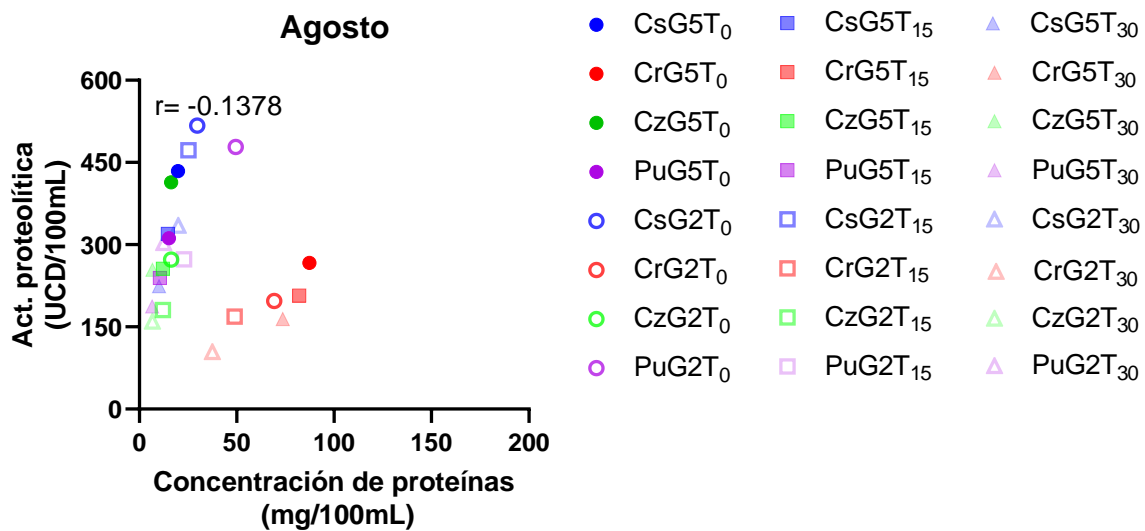
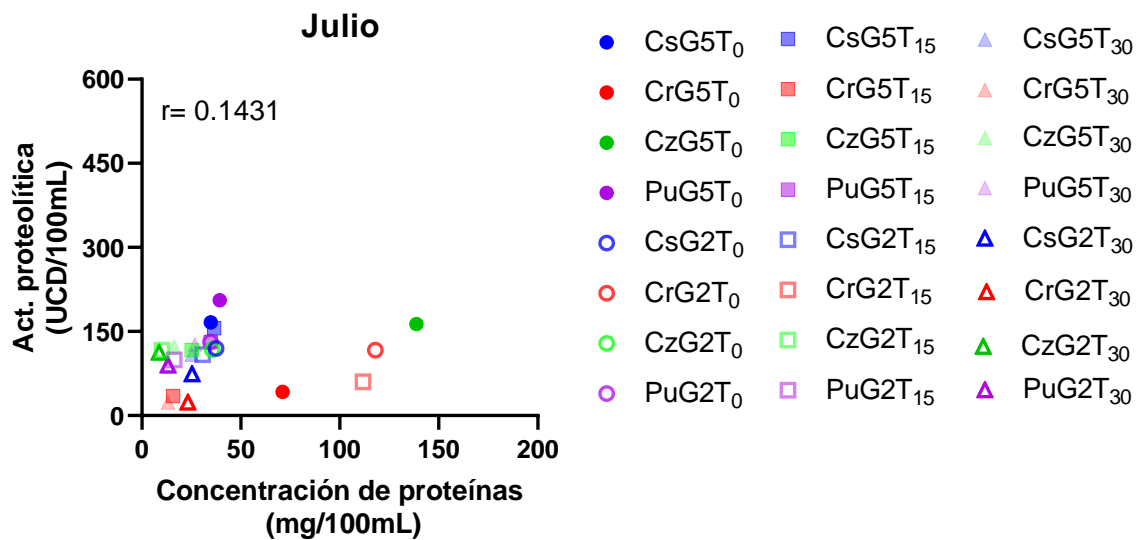


# Grados brix



Correlaciones de concentración de proteínas y actividad proteolítica para cada mes.





Año	No.	Actividades académicas asociadas al presente trabajo
2019	1	Participación en la realización del Taller <i>Capacitación y transferencia de tecnología a los productores y sus unidades de producción de la cadena de valor piña, del programa de concurrencia con las entidades federativas 2018</i> . Lugar Loma Bonita Oaxaca. Fecha: Febrero 2019.
2018	2	Nelda Xanath Martínez-Galero, Héctor López Arjona, Rosa Elia Agüero Padilla, Enrique Villalobos Amador. <b>Biochromes from in vitro culture wastes of <i>Ananas comosus</i> L. Merr.</b> Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol. 34, 608. Memorias de la Academia Nacional de Ciencias Ambientales 2017. DOI: 10.20937/2018.34.MANCA
2016	3	Nelda Xanath Martínez-Galero, Ana Karin Navarro Martínez, Iván de Jesús Romero López, Keyla López Luévano, Rosa Elia Agüero Padilla, Yanet Romero Ramírez, Roberto Ochoa Espinoza, Jeiry Toribio Jiménez. <b>Identificación de PHA producidos por fermentación de <i>Bacillus megaterium</i></b> . Presentación Oral. Congreso de Biotecnología y Química Aplicada. Puebla, Puebla. Septiembre, 2016.
	4	Yanet Romero Ramírez, Roberto Ochoa Espinosa, Jeiry Toribio Jiménez, Iván de Jesús Romero López, Keyla López Luévano, Rosa Elia Agüero Padilla, Ana Karin Navarro Martínez, Nelda Xanath Martínez-Galero <b>Producción de PHAs por fermentación de <i>Bacillus megaterium</i></b> Cartel de la 4ª Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas. Tuxtepec, Oaxaca. Julio, 2016. <b>SEGUNDO LUGAR</b>
	5	Martínez-Galero Nelda Xanath, Romero Ramírez Yanet, Toribio Jiménez Jeiry, Ochoa Espinosa Roberto, Romero López Iván de Jesús, López Luévano Keyla, Agüero Padilla Rosa Elia. <b>PHA production by fermentation of <i>Bacillus megaterium</i></b> . Ponencia en el XV Congreso Internacional y XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Oaxaca, Oaxaca. Junio, 2016



**BIS**  
UNIVERSITIES

La Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla

otorga a

**AGÜERO PADILLA ROSA ELIA**

la presente

## **CONSTANCIA**

Por su asistencia al "1er Congreso de Biotecnología y Química Aplicada", Puebla, México, Septiembre 2016.

MTRO. EDGAR JESÚS SALOMÓN ESCORZA  
RECTOR





**BIS**  
UNIVERSITIES

La Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla

otorga a

**Nelda Xanath Martínez-Galero, Ana Karin Navarro Martínez, Iván de Jesús Romero López, Keyla López Luévano, Rosa Elia Agüero Padilla, Yanet Romero Ramírez, Roberto Ochoa Espinosa, Jeiry Toribio Jiménez**

la presente

## CONSTANCIA

Por su participación, con el trabajo "Identificación de PHA producidos por fermentación de *Bacillus megaterium*", en la categoría exposición oral, en el "1er Congreso de Biotecnología y Química Aplicada", Puebla, México,

Septiembre 2016.

  
MTRO. EDGAR JESÚS SALOMÓN ESCORZA  
RECTOR



**1ER**  
CONGRESO DE BIOTECNOLOGÍA  
Y QUÍMICA APLICADA

BA-934

**BIOCROMOS EN RESIDUOS DE CULTIVO *IN VITRO* DE *Ananas comosus* L. MERR****[BIOCHROMES FROM *IN VITRO* CULTURE WASTES OF *Ananas comosus* L. MERR]**Marriner-Galero Nelda Xanath<sup>1</sup>, Héctor López Arjona<sup>1</sup>, Villalobos Amador Enrique<sup>2</sup>, Agüero Padilla Rosa Elia<sup>1</sup>, Sánchez-Cervantes Ireri Paola<sup>1</sup>Instituto de Química Aplicada, Universidad del Paraíso *campus* Tuxtpec. <sup>2</sup>Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla, Puebla, Pue. <sup>3</sup>Círculo Central 300, Col. Parque Industrial, Tuxtpec, Oax. C.P. 6830. Tel +52 387 875 9240.

§Autor para correspondencia (galero02@hotmail.com)

**Palabras Clave:** *colorantes, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas*

Los biocromos o pigmentos naturales son sustancias coloridas producidas por organismos. Un pigmento es un material que cambia el color de la luz que refleja o transmite como resultado de la absorción selectiva de la luz según su longitud de onda y son utilizados para teñir plásticos, textiles, cosméticos, alimentos y otros productos. La industria está en búsqueda continua de innovaciones sustentables y de bajo costo en la producción de pigmentos como puede ser aprovechando las características de algunos hongos, levaduras y bacterias. Ciertos hongos como *Monascus purpureus* tienen la capacidad de producir pigmentos como metabolitos secundarios. Algunos productores de cultivos *in vitro* han aislado e identificado hongos productores de biocromos para su aprovechamiento comercial. Por otra parte, las fermentaciones en estado sólido, son metodologías exitosas para la producción de biocromos asociados a las diversas fases del crecimiento microbiano y que pueden ser escalados a nivel piloto o industrial. Además, es posible que estos biocromos puedan ser producidos mediante fermentación líquida. El objetivo del trabajo fue producir e identificar los pigmentos producidos por cepas ya caracterizadas de hongos aislados en residuos de cultivo de tejido *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merr, iniciando con la selección de colonias productoras de pigmento. Para la fermentación líquida el inóculo se sembró en reactores batch de 2 L con medio MS al 25, 50, 75 y 100%. Las fermentaciones se realizaron: a) con agitación controlada y a temperatura de 27 y 35 °C, b) a 22, 27 y 35 °C y fotoperíodos controlados. La fermentación sólida se realizó bajo las mismas condiciones dadas anteriormente utilizando medio MS en Phytigel™. La mejor producción de pigmentos se logró en medio sólido a 22 °C, con MS al 50% en Phytigel. Posteriormente se obtuvo el extracto del biocromo tras adicionar 200 mL de acetato de etilo, 1 g de NaCl, y agitar en vórtex, centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente se tomó el sobrenadante y concentró con a presión reducida en rotoevaporador. La elucidación estructural de los biocromos presentes en las muestras se realizó a partir de espectrometrías infrarroja FTIR por ATR (Perkin Elmer Spectra 100), resonancia magnética nuclear en CDCl<sub>3</sub> (Varian a 400 MHz para <sup>1</sup>H) y masas (Water Synapt Si G2 HDMS).