
APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE ALCACHOFA

I. Aspectos Teóricos

José Neptuno Rodríguez López

Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia

1. La alcachofa (*Cynara scolymus*, L.)

La alcachofera o alcachofa, *Cynara scolymus*, Linnaeus (*Cynara scolymus*, L.) es una planta herbácea que alcanza hasta 80 cm de altura, con tallo suave y hojas muy divididas, de aspecto duro, que pertenece a la familia llamada antiguamente Compositae, ahora Asteraceae. Sus flores están agrupadas en cabezuelas grandes y originan frutos de color verdoso. La alcachofa tiene su origen en la Europa mediterránea, si bien, su cultivo se ha extendido hasta el continente americano donde es también muy apreciada. Es cultivada generalmente con fines comerciales y vive en climas semisecos y templados. Crece asociada al matorral xerófilo y bosques de encino y pino. Se dan distintos cultivares de alcachofa, teniendo incluso algunos, denominación de origen. La variedad cultivada en la Región de Murcia es mayoritariamente la "Blanca de Tudela", con la que se produce una alcachofa de calidad que presenta un aspecto exterior muy compacto y apiñado. La alcachofa de la zona presenta unas cualidades propias y un mayor aguante al ennegrecimiento después del corte, factor muy valorado por el comercio, que se refleja en unos precios de mercado superiores.



Figura 1. Flor de alcachofa. Sus flores están agrupadas en cabezuelas grandes y originan frutos de color verdoso.

2. Órgano de consumo de la alcachofa y valores nutricionales

El órgano de consumo lo constituyen una pequeña porción del pedúnculo, el receptáculo carnoso y la base carnosa de las brácteas, del capítulo floral inmaduro. Las flores son lo que se conoce como la pelusa o pelos de la alcachofa y son desechadas al momento de consumir el receptáculo. El capítulo floral debe ser inmaduro pero del máximo tamaño posible (variable según cultivar y uso culinario, desde menos de 50 g a casi 500 g), compacto, de consistencia succulenta, con las brácteas tiernas y sin fibras. Al sobrepasar el momento óptimo de madurez, las cabezuelas se empiezan a abrir y se tornan coriáceas e

inutilizables. En algunas ocasiones, las hojas y los tallos florales inmaduros son usados como productos hortícolas, de manera similar al cardo penquero.



Figura 2. Corte transversal del órgano de consumo de la alcachofa. El órgano de consumo lo constituyen una pequeña porción del pedúnculo, el receptáculo carnoso y la base carnosa de las brácteas.

A la alcachofa se le atribuyen desde tiempos muy antiguos propiedades preventivas contra varias enfermedades, por ejemplo, para los enfermos de hígado, pues ayuda a regular diversas funciones hepáticas. Además, presenta propiedades diuréticas y proporciona inulina, especie de almidón que presenta la particularidad de transformarse en el organismo en levulosa, azúcar natural de fácil asimilación, de gran importancia en dieta de diabéticos.

Tabla 1. Contenido de diversos componentes de la alcachofa por 100 g de tejido		
Componente	Contenido	Unidad
Agua	87.00	%
Carbohidratos	10.00	g
Proteínas	2.50	g
Lípidos	Trazas	
Calcio	39.17	mg
Fósforo	60.00	mg
Hierro	1.33	mg
Potasio	263.33	mg
Sodio	65.83	mg
Manganeso	20	mg
Vitamina A (valor)	141.67	UI
Tiamina	0.06	mg
Riboflavina	0.05	mg
Niacina	0.58	mg
Ácido ascórbico	7.50	mg
Valor energético	45.83	cal

La alcachofa presenta una composición nutritiva que se caracteriza por un elevado contenido en ciertos minerales como fósforo, sodio y sobre todo manganeso (20 mg/100 g de producto comestible), mayor que cualquier hortaliza o legumbre. Su contenido de vitaminas no es particularmente elevado; sin embargo, es un alimento de relativo valor por poseer una menor cantidad de agua y un mayor contenido de carbohidratos y proteínas que la mayoría de las hortalizas, tal como se aprecia en la Tabla 1. El sabor amargo que se

presenta en distintas partes de la planta, incluyendo el capítulo floral, se debe a la presencia de cinaropicrina, un compuesto sesquiterpenoide.

Las partes tiernas de la flor son utilizadas para el consumo humano. Contiene vitaminas A, B1, B2 y C, tienen un contenido en minerales cuyo porcentaje no es igualado por ninguna otra legumbre, fruta o verdura. Además de sus prestaciones alimenticias, la alcachofa se ha usado como agente terapéutico y, lo que es más importante, como preventivo frente a la aparición de enfermedades. La decocción de hojas de alcachofa se ha usado como tónico digestivo y aperitivo para activar las secreciones gástricas antes de las comidas en casos de falta de apetito, saciedad precoz o trastornos digestivos. Los dolores de estómago, náuseas y pesadez gástrica pueden regularse con la toma de éste producto. Las aplicaciones más específicas de este producto son:

- En el sistema digestivo, por su actividad sobre la función hepática y biliar. Su efecto diurético aconseja su recomendación en casos de uricemia y gota.
- La cinarina que contiene ha demostrado acción hipocolesterolemiante, reduciendo de manera significativa las tasas de colesterol en sangre y previniendo la formación de cálculos biliares.
- La alcachofa es apta para el tratamiento de la arteriosclerosis en personas de edad avanzada, como un coadyuvante que puede tomarse de forma continuada, impidiendo la acumulación de colesterol en las arterias y la formación de ateromas.
- Ha proporcionado también buenos resultados en el control de la celulitis localizada. Se halla indicada asimismo, como coadyuvante en el tratamiento de la albuminuria y activadora de la eliminación del ácido úrico.
- El efecto laxante que tiene la alcachofa, facilita la eliminación por la vía intestinal de ácidos biliares, contribuyendo a regular el tránsito intestinal y los problemas digestivos asociados.

Los capítulos se pueden consumir crudos o cocidos, como entrada y en guisos muy variados. Este producto también es usado en la agroindustria, en particular la conservera, para elaboración de fondos y corazones congelados, deshidratados, enlatados, conservas en aceite, etc. La versatilidad de usos de la especie es tal que, como se sabe, también se consumen los pecíolos y tallos jóvenes igual que en el cardo, las hojas se utilizan como forraje en la alimentación de ganado y para la obtención de un licor llamado "Cynar", que se usa como aperitivo amargo o "bitter". Finalmente, debe destacarse que la especie ha sido usada históricamente para fines medicinales, extrayéndose de ella diversos compuestos de uso farmacológico que poseen características aperitivas, antihelmínticas, antiglicémicas, diuréticas y laxativas, entre otras.

3. Importancia socioeconómica de la alcachofa

Italia y España son los principales productores mundiales de alcachofa (36% y 33% de la producción total, respectivamente) (Figura 3). El principal productor nacional es la Región de Murcia. Otra importante contribución es la de la Comunidad Valenciana, que comprende las provincias de Valencia, Alicante y Castellón, mientras que el resto de las provincias españolas aportan contribuciones relativas muy escasas (Figura 4). El diagrama de producción nacional de alcachofa se observa en la Figura 5. Tras un periodo de crisis, se observa una reciente recuperación de la producción de alcachofa y un valor económico

creciente. Además, las exportaciones presentan un alto nivel. Durante la campaña 2004-05 se plantaron en la Región de Murcia, 6.875 hectáreas, con una producción de 117 millones de kilogramos. La mayor parte de la producción de alcachofa (75%) se destina a la industria para su elaboración, mientras que el 25% restante se utiliza para su consumo en fresco. La transformación industrial de la alcachofa en Murcia abarca 46 empresas con más de 7.000 empleados y una facturación anual de más de 480 millones de Euros.

Los problemas y perspectivas de la alcachofa en la Región de Murcia han sido recientemente evaluados por la Federación de Cooperativas Agrarias de Murcia, FECOAM. Entre los problemas cabe destacar aquellos relativos al cultivo, comercialización y transformación industrial de la alcachofa. Dos de los problemas con los que cuenta la transformación industrial de la alcachofa son la precipitación del polisacárido inulina y el pardeamiento enzimático (Muñoz-Palancas *et al.*, 1997). El primero de ellos se encuentra sometido a numerosos estudios, mientras que las investigaciones sobre el segundo son muy escasas. Entre las perspectivas está el aprovechamiento de los desechos industriales generados, hasta un 70% del peso total de la alcachofa transformada industrialmente. La obtención de subproductos de los desechos de la alcachofa repercutiría favorablemente en la recuperación de su producción.

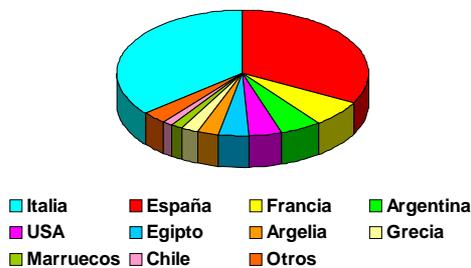


Figura 3. Diagrama de Producción Mundial de Alcachofa

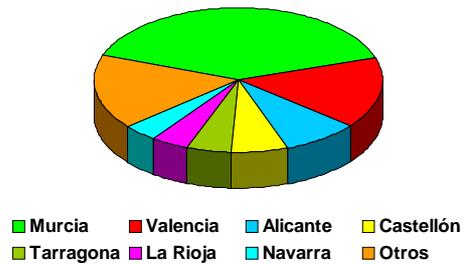


Figura 4. Diagrama de Producción Provincial de Alcachofa

Hasta ahora las acciones de I + D en el sector de la alcachofa han ido encaminadas a la obtención de un mejor producto agrario. Así, se han destinado fondos para lograr que la siembra de alcachofa se haga por medio de semillas en vez de esquejes (zuecas). Por otra parte, estas operaciones de investigación también han abordado la búsqueda de variedades más resistentes a enfermedades. En nuestro laboratorio se ha estudiado la obtención y las aplicaciones catalíticas de un grupo de enzimas abundantes en la alcachofa, las polifenoloxidasas y las peroxidasas, así como del polisacárido inulina. Los resultados potenciarán la producción y la utilización de estas enzimas con alto interés biotecnológico, aportarán una elevada valorización de estos componentes y, contribuirán a la recuperación y reciclado de los residuos agroindustriales de alcachofa.

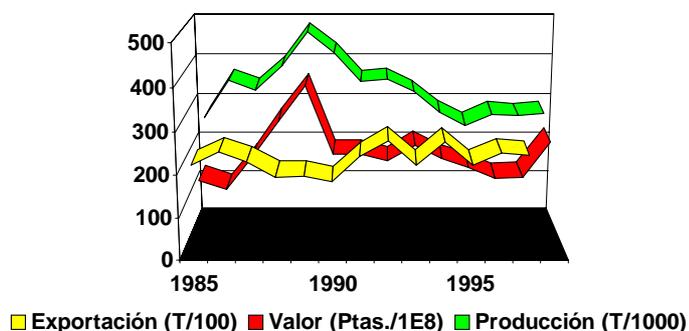


Figura 5. Diagrama de Producción Nacional de Alcachofa

A continuación analizaremos los dos problemas más importantes de la industria conservera de la alcachofa:

Pardeamiento enzimático de la alcachofa: El pardeamiento enzimático se manifiesta como un oscurecimiento gradual de la alcachofa, que se vuelve más intenso tras el corte de las hojas externas o brácteas para obtener el corazón (Lattanzio *et al.*, 2005). Este aspecto, desagradable para el consumidor, refleja una simultánea descomposición de nutrientes de la alcachofa. Las enzimas responsables de este pardeamiento enzimático son enzimas oxidativas como la polifenoloxidasas o tirosinasas (PPO; EC 1.14.18.1), y la peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7). El pardeamiento enzimático de las frutas y hortalizas se debe a una ruta o secuencia de reacciones que convierten a sus fenoles endógenos (simples e incoloros) en los pigmentos heteropoliméricos denominados feomelaninas (color anaranjado-rojizo) y eumelaninas (color marrón a negro). La ruta comienza con dos reacciones acopladas catalizadas por PPO en las que participa el oxígeno molecular. La primera reacción consiste en la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y, la segunda, en la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa) (Rodríguez-López *et al.*, 1992). Estas quinonas reaccionan con numerosas sustancias endógenas a través de etapas de oxidación, adición, transposición y polimerización, originando finalmente melaninas (Tudela *et al.*, 1997). El peróxido de hidrógeno generado puede ser utilizado por las PODs para futuras etapas de oxidación.

El procesamiento industrial para combatir este problema incluye operaciones de lavado, escalde y esterilización con diversos líquidos control. Este tratamiento, inactiva lentamente a las enzimas desencadenantes del proceso, pero no consigue eliminar totalmente el pardeamiento enzimático, ya que durante cierto tiempo se potencia la actuación de estas enzimas sobre sus sustratos, con la formación de productos oxidados (Rodríguez López *et al.*, 1999). La alta temperatura facilita la evolución de las *o*-quinonas hacia melaninas a través de reacciones no enzimáticas acopladas. Además, este proceso provoca importantes pérdidas de la calidad nutritiva (por ejemplo pérdida de vitamina C y material antioxidante) y sensorial (aroma, sabor, textura, etc.) del producto (Devece *et al.*, 1999). En la actualidad se han ensayado diferentes alternativas para el escaldado de frutas y hortalizas (Mencarelli,

1987; Devecce et al., 1999). Una nueva alternativa al escalde convencional de frutas y hortalizas es su irradiación con microondas (Decareau, 1985).



Figura 6. Conservas de alcachofa. La transformación industrial de la alcachofa en Murcia abarca 46 empresas con más de 7.000 empleados y una facturación anual de más de 480 millones de Euros.

Precipitación de la inulina: La precipitación del polisacárido inulina supone un problema para la comercialización de las conservas de alcachofa. Este polímero genera una especie de “tierra” blanca que perjudica las propiedades organolépticas de este producto. Algunas soluciones, como la incorporación de inulina, en el líquido de gobierno resultan caras y hasta el momento inviables.

4. Aprovechamiento de desechos sólidos procedentes de la industria de transformación de vegetales

Las primeras operaciones de los procesos de elaboración de transformados vegetales, son etapas de acondicionamiento de materia prima, en la que se generan las mayores cantidades de residuos sólidos orgánicos. La cantidad total de residuos orgánicos será la suma de residuos sólidos (en seco) y residuos sólidos arrastrados por el agua. El porcentaje de residuos generado en la elaboración de transformados vegetales es muy variable, ya que está determinado por diversos factores. El principal es el tipo de materia prima a procesar; los vegetales destinados a transformación son muy diferentes en tamaño, forma y partes aprovechables, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos en cada caso. El porcentaje de residuos puede oscilar desde valores muy elevados como en el caso del cardo o alcachofa con un 70-65%, hasta valores inferiores como en el tomate con un 15% (el 5% son pieles y pepitas).

Los residuos sólidos orgánicos producidos en la transformación de vegetales, en algunos casos considerados como subproductos, son aprovechables para elaboración de otros productos. En el caso del espárrago y el puerro después de la obtención del producto entero en su proceso principal, se obtienen subproductos destinados a fabricación de tallos en conserva o congelados, productos deshidratados, etc. Los residuos restantes que quedan tras el máximo aprovechamiento en la industria transformadora, también se utilizan con otros fines: alimentación animal, fertilizante y obtención de productos comercializables. Se

puede considerar subproducto, a todo producto no principal obtenido en un determinado proceso y, que tiene o puede tener, determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto, para otra puede constituir la materia prima, obteniendo a su vez un producto principal y otro nuevo subproducto (Hermida, 1993). Actualmente, en la industria de transformados vegetales, el principal destino de los residuos sólidos orgánicos generados en sus procesos es la alimentación animal, especialmente para bovino y ovino. Se utiliza principalmente para vacas, animales jóvenes, y ganadería brava. El transporte de los residuos hasta la explotación ganadera es diario, en remolques y es el ganadero el que se encarga del traslado. Así, estos residuos destinados a alimentación de ganado pueden considerarse no como residuos, sino como subproductos. Los residuos de transformados vegetales tienen un alto contenido en humedad, lo que implica dificultades para el almacenamiento, debiéndose ser su consumo rápido, con el fin de evitar problemas de fermentación. Por otro lado, el transporte del subproducto con niveles de humedad elevados, aumenta el coste del mismo. Para incorporar el subproducto de transformados vegetales en fresco, como un complemento importante en la alimentación animal, es necesaria una correcta planificación, en la que se tenga en cuenta de qué productos se dispone, en qué cantidades al año y en qué periodos de tiempo. Existen estudios en los que se da a conocer el valor nutritivo de los residuos de determinados vegetales procedentes de la industria conservera, para su utilización en dietas de rumiantes. Estos estudios realizados sobre la ingesta, composición analítica y valor nutritivo de los residuos, indican una palatabilidad aceptable, buena calidad alimenticia y la conveniencia, por tanto, de su empleo en las dietas de rumiantes. Únicamente, hay que tener en cuenta, que la excesiva humedad que presenta el material original (92.21%), puede limitar el volumen de la ingesta e impedir el uso exclusivo en las raciones del ganado, por lo que parece conveniente la utilización conjunta de algún alimento concentrado (Fonollá y Boza, 1993). En las zonas donde no existe ganadería, los residuos orgánicos se trasladan al vertedero controlado correspondiente. En este caso, el transporte lo realiza el organismo competente en el municipio o bien, la propia empresa, lo que en cualquiera de los casos supone un coste de fabricación.

Como se ha comentado, la mayor parte de los residuos generados en la transformación de vegetales se destina a alimentación para ganado. Sin embargo, existe una fracción importante que va a vertedero, y contribuye a aumentar el problema existente de falta de espacio. Para contribuir a la sostenibilidad del medio y satisfacer las necesidades de las generaciones actuales, sin comprometer la satisfacción de las necesidades de las generaciones futuras, se hace necesario recuperar, en lo posible, estos residuos.

Producción de compost: El compost, es el producto final obtenido mediante un proceso de descomposición biológica de la materia orgánica, en condiciones controladas de humedad y temperatura, que oscila entre 50 y 70°C, provocando así, la destrucción de elementos patógenos y, por lo tanto, garantizando la total inocuidad del producto. La estrecha relación existente entre el contenido de materia orgánica de un suelo y su fertilidad, es un hecho ampliamente constatado y aceptado universalmente. La materia orgánica mejora la estabilidad del mismo, aumentando su porosidad y capacidad de retención hídrica,

favoreciendo así el intercambio de gases y agua y, la capacidad exploratoria del sistema radicular de las plantas. Asimismo, aumenta su capacidad de cambio catiónico, favoreciendo la fijación de nutrientes, manteniéndolos durante más tiempo a disposición de las plantas. Del mismo modo, aumenta el estado de agregación del suelo y el desarrollo de su flora microbiana. Por todo esto, una de las vías más importantes de regeneración de suelos, sobre todo en la cuenca mediterránea, consiste en la incorporación al mismo de materia orgánica, con objeto de restablecer sus propiedades, por medio de todas las acciones directas o indirectas que ella ejerce (Antón, 1992). Uno de los tipos de compost más conocidos es el producido a partir de residuos sólidos urbanos: se realiza un aprovechamiento de la fracción orgánica fermentable separándola de los materiales no deseables, materiales cuya degradación biológica es difícil (plásticos, vidrio, etc.) y materiales que pueden aportar elementos tóxicos (metales férricos y no férricos, productos químicos, etc.), cuya asimilación por parte del cultivo receptor represente un riesgo potencial para la salud. Esta condición la cumplen los residuos generados en la transformación de vegetales, puesto que se pueden separar totalmente y con facilidad los residuos orgánicos del resto; este tipo de residuos pueden considerarse aptos y deseables para compostar.

Producción de metano: La fracción de residuos de transformados vegetales que se deposita en vertedero, es susceptible de someterse a tratamiento con el resto de residuos urbanos, para la obtención de metano. Se llama metanización de residuos sólidos al proceso de fermentación anaeróbica de los componentes orgánicos de los mismos. Dicha fermentación es producida por bacterias que se desarrollan en ambientes carentes de oxígeno. Durante el proceso de transformación de la materia orgánica (digestión), dichas bacterias producen un gas denominado por su origen "biogas", el cual se compone fundamentalmente de metano (CH₄) y de dióxido de carbono (CO₂). Los porcentajes de producción de estos gases son variables y, dependen, de las condiciones físico-químicas en que se desarrolla la digestión de la materia prima. El metano se puede utilizar en la producción de energía eléctrica y de energía térmica. La tecnología anaerobia aplicada a la biometanización de los residuos sólidos urbanos es una tecnología madura, con posibilidad de ser aplicada a cualquier tipo de fracción orgánica, independientemente de su origen (forma de selección) o de su grado de humedad. La biometanización se aplica, generalmente, seguida de un proceso de compostaje, dado que el residuo una vez digerido, no posee las características idóneas para ser utilizado en agricultura (Mata, 1998).

Obtención de bioalcohol: La obtención de etanol por fermentación alcohólica, ha cobrado interés debido a la posibilidad de utilizar alcohol como combustible. La fermentación alcohólica se lleva a cabo por numerosos microorganismos anaerobios o aerobios facultativos, a partir de azúcares presentes en las distintas formas de biomasa. Estos azúcares se pueden encontrar en forma de polímeros: almidón y celulosa (Jiménez *et al.*, 1989). Los residuos producidos por la industria de conservas vegetales, por su contenido en celulosa, pueden utilizarse como fuente de energía renovable, evitando así su acumulación. La fracción celulósica de los residuos, se transforman mediante hidrólisis en glucosa, que por fermentación se convierte en combustible (etanol) (Lázaro y Arauzo, 1994).

5. Aprovechamiento de los desechos de alcachofa: obtención de enzimas y biomoléculas

El sector de la alcachofa genera dos tipos de desechos. Los más importantes los genera la industria transformadora de este producto. El 70% en peso de la flor de la alcachofa corresponde a las hojas externas o brácteas no destinadas al consumo humano. Sin embargo, estos desechos son útiles para la alimentación animal y están destinados a la elaboración de forrajes ensilados (Megías *et al.*, 1991). Por otra parte, la alcachofa contiene sustancias con aplicabilidad terapéutica como cinarina, cinaropicrina, inulina, flavonoides y sales potásicas (Hammouda y Seif-El-Nars, 1993). Estos productos se utilizan como principios activos en presentaciones simples y compuestas y en fórmulas magistrales para el tratamiento de la anorexia, hepatitis, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, hipertensión arterial, estreñimiento, etc. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto el gran contenido de PPO y POD en las brácteas de la alcachofa. Las PPOs y PODs son enzimas con una alta utilización biotecnológica, por lo que su purificación a partir de una fuente barata, como los desechos de la alcachofa, podría tener un gran impacto económico. El estudio de sus propiedades podría aconsejar su uso en diversos procesos, desplazando a otras PPOs o PODs utilizadas en la actualidad. A continuación, se describen los antecedentes sobre la utilización de estas enzimas en diversos procesos biotecnológicos. Además, estos desechos industriales también son ricos en el polisacarido inulina. El otro desecho generado en el sector de la alcachofa es un residuo agrícola. Las hojas y las flores maduras se acumulan al final de cada periodo productivo. Las hojas contienen una alta concentración de una enzima llamada ascorbato peroxidasa (APX), así como cinarina y otros compuestos fenólicos. Las flores maduras contienen en sus estigmas, una alta concentración de una proteasa coagulante de la leche (Sidrach *et al.*, 2005).



Figura 7. Residuos agrícolas de la alcachofa. Las flores maduras contienen, en sus estigmas, una alta concentración de una proteasa coagulante de la leche.

Aplicaciones de las peroxidases

Las PODs son óxidorreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en toda la escala filogenética y que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. Además de su interés académico y fisiológico, estas enzimas son ampliamente utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. De entre ellas, la extraída de la raíz del rábano picante (HRP) es la más usada. HRP es producida por cuatro grandes compañías: Biozyme (Reino Unido), Boehring Mannheim (Alemania), Sigma (Estados Unidos) y Sevarac & Toyobo (Japón). Sólo

Boehring Mannheim produce anualmente cerca de 8.5×10^{15} unidades de esta enzima, para lo cual se requieren cerca de 1700 toneladas de raíces de rábano picante. Esta cantidad de HRP representa una suma cercana a los 2.5 millones de Euros.

La POD es utilizada ampliamente en bioquímica clínica. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos, usan POD como una enzima acoplada. También se utiliza en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el del SIDA o el Herpes. Las PODs también se utilizan como biocatalizadores para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes (Krell, 1991).



Figura 8. Kit analítico de peroxidasa. Esta enzima es usada ampliamente en bioquímica clínica y en inmunoensayos.

Pero lo que hace realmente interesante a las PODs y, que ha hecho que la Comisión Científica de la Unión Europea las defina como una de las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, es su aplicación para conservar el medio ambiente. En esta línea, las PODs pueden sustituir a algunos catalizadores químicos usados hoy en día en cierto tipo de industrias. Así, pueden sustituir al cloro en el proceso de blanqueamiento del papel durante su reciclaje y también, al formaldehído (mutagénico y cancerígeno), que se utiliza en la fabricación de resinas fenólicas (Wick, 1996). Otra aplicación de las PODs, en este apartado, es su uso para el tratamiento de residuos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y metales pesados (Tatsumi *et al.*, 1996). En estos casos, las PODs actuarían convirtiendo estos compuestos en otros de mayor peso molecular y más fácil de eliminar por procesos físicos como filtración, decantación, etc.

Uno de los problemas asociados al uso de PODs en procesos industriales, es el proceso de inactivación que sufren estas enzimas bien por la temperatura, el pH o inducida por el sustrato (Hiner *et al.*, 1995). Este problema reduce la vida útil de la proteína y encarece el proceso. Todo esto ha dado lugar a la búsqueda de nuevas fuentes de PODs (Wick, 1996; Rodríguez López *et al.*, 2000) que catalicen con mayor eficacia un determinado proceso y que sean más resistentes a la inactivación. Recientemente, una empresa norteamericana, Enzymol International Inc., ha aislado y explotado el uso de POD de soja, para la formación de resinas fenólicas (Wick, 1996). Esta enzima tiene una alta resistencia a la temperatura, lo que permite una gran eficacia en este proceso, siendo un sustituto del formaldehído. El 70%

de la soja producida es destinada a la preparación de piensos compuestos para el alimento de aves. El aislamiento de esta proteína de la soja, supone una primera etapa de extracción mediante una disolución acuosa; después del lavado, el resto sólido puede seguir siendo destinado a la producción de piensos compuestos, por lo que se trata de una fuente económica y que no modifica el destino final del producto. Este proceso es paralelo al planteado en esta Memoria de Investigación, pero usando la POD obtenida de las brácteas de la alcachofa. El estudio de las propiedades de la POD de alcachofa, podría hacer aconsejable su uso en distintos procesos tecnológicos como sustituto de HRP u otras PODs disponibles en el mercado.

Aplicaciones de las polifenoloxidasas

Aplicaciones sanitarias: La PPO se utiliza como marcador en el vitiligo, enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la hipopigmentación total o parcial de la membrana basal de la epidermis. Se ha comprobado que anticuerpos anti-PPO no reaccionan con otros autoantígenos ni con el sitio activo de la enzima, indicando que actúa como autoantígeno y pudiendo utilizarse como marcador de la enfermedad (Baharav *et al.*, 1996). La administración oral de PPO de *Agaricus bisporus* en animales modelo supone una disminución de la respuesta autoinmunitaria.

Otras posibles funciones de PPO en procesos tumorales son en la actualidad objeto de estudio. Existen resultados contradictorios sobre el papel de esta enzima en cáncer, algunos autores sugieren que tiene un efecto supresor tumoral mientras que otros predicen un posible papel en la mutagenicidad, debido a la producción de compuestos fenólicos y quinonas. El melanoma maligno sigue siendo un serio problema clínico con una alta mortalidad debido al fallo en la respuesta de las células del melanoma al tratamiento con radiación o quimioterapia. Por esta razón, se intenta encontrar una vía de tratamiento selectivo que interfiera en la conversión de tirosina en melanina, usando profármacos inactivos análogos de tirosina, las cuales tras su conversión por PPO pasen a productos tóxicos para las células del melanoma.

Industria cosmética: Los inhibidores de la PPO son utilizados en la industria cosmética debido a sus efectos despigmentantes de la piel. Se conocen un gran número de inhibidores de fuentes sintéticas y naturales, pero solamente algunos de ellos se utilizan como agentes despigmentantes, debido a sus posibles efectos secundarios. En la actualidad, como inhibidores de la enzima se utilizan arbutina y aloesina aislados de *Prunus domestica* y *Aloe vera*, respectivamente. La arbutina es un glucósido hidroquinona que inhibe competitivamente a la enzima, mientras que la aloesina presenta una inhibición no-competitiva. El uso de ambos inhibidores conjuntamente, reduce los posibles efectos secundarios del tratamiento.

Industria de la alimentación: El pardeamiento de frutas y verduras es un problema importante en la industria de la alimentación, ya que además de aportar características físicas desagradables, supone un cambio en las propiedades organolépticas de los productos. La velocidad de pardeamiento enzimático depende de la concentración de PPO activa, de compuestos fenólicos, de la disponibilidad de oxígeno, pH, temperatura y condiciones del

tejido. El uso de inhibidores de la enzima que impidan su actuación sobre los fenoles, resulta una aplicación cada vez más utilizada en la industria alimentaria.

Aplicaciones biocatalíticas: La inmovilización de PPOs se ha descrito para la detección de compuestos fenólicos en aguas residuales y suelos, así como de clorofenoles de desecho en la manufactura del cuero y polifenoles del procesado del petróleo (Svitel y Miertus, 1998). La mayoría de los biosensores enzimáticos con PPO son amperométricos, mostrando elevada sensibilidad y selectividad (Seo *et al.*, 2003). La biodegradación de contaminantes fenólicos ha sido estudiada con PPOs solubles e inmovilizadas sobre múltiples soportes (Seo *et al.*, 2003). Un enfoque particularmente eficaz, ha abarcado la oxidación enzimática de fenoles a quinonas y la absorción no enzimática de éstas sobre quitosanos (Edwards *et al.*, 1999). La síntesis enzimática de difenoles también ha sido abordada en PPOs solubles e inmovilizadas (Seo *et al.*, 2003). Destacan las prometedoras síntesis con PPO de L-dopa, hidroxitirosol y 3-hidroxiaminofeno.

Aplicaciones de las proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos de otras proteínas. Además de su participación en importantes procesos fisiológicos, las proteasas tienen un gran número de usos industriales. Se considera que el 60% de la venta mundial de enzimas corresponden a las proteasas. Algunos de los campos de aplicación de las proteasas son:

- Industria alimentaria.
- Industria cárnica.
- Curtidos.
- Industrias cerveceras.
- Industria farmacéutica.
- Industria láctea.
- Panificación.
- Productos de limpieza.
- Reactivos de diagnóstico.
- Industria textil.

Usos de las proteasas en el sector alimenticio: Ciertas proteasas se han utilizado en la transformación de los alimentos desde hace siglos. El cuajo obtenido del estómago del ternero contiene una alta concentración de quimosina, una proteasa que permite el cuajado de la leche para la elaboración de queso. Otras proteasas como la papaína, obtenida de la papaya, se han utilizado comercialmente para ablandar las carnes. Otro uso alimentario de las proteasas es el clarificado de la sangre. La única aplicación de la sangre procedente de los mataderos es la elaboración de morcillas; el uso de la sangre, no destinada a este fin, podría ser utilizada como fuente de proteínas con otros usos alimenticios. Sin embargo, y debido a su color, este producto no resulta bien aceptado. El tratamiento de la sangre con proteasas específicas permite el aclarado de la sangre, liberando el color rojizo debido a la

presencia del grupo hemo de la hemoglobina. Las proteasas también se utilizan en la industria panadera. La masa del pan se puede preparar más rápidamente si su gluten se hidroliza parcialmente. Se han utilizado proteasas de varias procedencias para este fin.

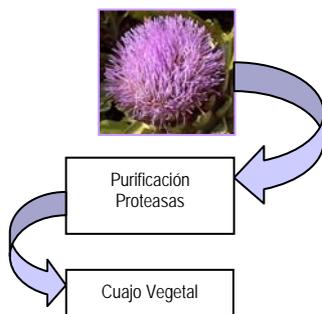


Figura 9. Aprovechamiento de las flores de alcachofa para la obtención de cuajo vegetal.

Usos de las proteasas en la industria del cuero: La industria del cuero consume una proporción significativa de la producción enzimática mundial. Las proteasas alcalinas se utilizan para eliminar el pelo de las pieles. Este método resulta más seguro y ecológico que los métodos tradicionales que implican el uso de sulfuro de sodio.

Usos de las proteasas en productos de limpieza: Múltiples productos de limpieza, como detergentes o desatascadores de tuberías, incluyen proteasas en su formulación. Las proteasas presentes en estos productos permiten la hidrólisis de proteínas adheridas, facilitando la limpieza de las manchas o el desatasque de tuberías.

Otros usos de las proteasas: Además de los usos ya comentados, las proteasas también son utilizadas en el sector papero. En este sentido, las proteasas son útiles en la prevención de la acumulación rápida de biofilms en sus dispersiones. Se ha demostrado la utilidad de fórmulas enzimáticas, que contienen proteasas, para mantener los circuitos cortos de máquinas de papel de prensa y papeles alcalinos finos, tanto o más limpios que con productos convencionales, reduciendo además la toxicidad del efluente general. Otros usos bioquímicos de las proteasas son su incorporación como reactivo de diagnóstico o para la secuenciación de proteínas.

Aplicaciones de la inulina

Aplicaciones alimentarias: La inulina es considerada ingrediente en muchos productos alimenticios, sobre todo, por sus efectos beneficiosos sobre la salud. Es un oligosacárido derivado de la sacarosa que se aísla de fuentes vegetales, siendo la raíz de achicoria, una de las principales fuentes, aunque también puede encontrarse en otras frutas y verduras, como la cebolla, el plátano, el ajo, los espárragos o la alcachofa, entre otros. Se describe como un fructooligosacárido (FOS) con un grado de polimerización de 20 a 60 monómeros de fructosa; pero los llamados realmente FOS, con un grado de polimerización de 9, son los obtenidos de la hidrólisis enzimática de la inulina. Una vez extraída la inulina, puede añadirse a la dieta incorporándola a cualquier comida o bebida.

Este ingrediente, además de tener las propiedades clásicas de la fibra alimentaria para regular el tránsito intestinal, contribuye a la mejor absorción de calcio, a la estimulación de

las defensas naturales de la flora intestinal (efecto bífido) y, a reducir el colesterol y los niveles de azúcar en sangre.

Tanto los FOS como la inulina, no son digeribles por las enzimas intestinales presentes en la superficie luminal del intestino delgado, α -amilasa, sacarasa y α -glucosidasas, por lo tanto, alcanzan el tracto final del intestino que, a partir del íleon inferior contiene bacterias. La microflora intestinal presente, es capaz de metabolizar, preferentemente de forma anaerobia, los FOS y, se ha demostrado en estudios *in vitro*, que son metabolizados selectivamente por las bifidobacterias, dando lugar a productos de degradación tales como ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono, aminoácidos de cadena corta y otros metabolitos. Esta fermentación selectiva induce una disminución del pH del medio, debido a la producción de grandes cantidades de lactato y acetato, que inhiben el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium*, y otras bacterias patógenas como *Shigella* o *Salmonella*. Estudios *in vivo* con voluntarios tomando inulina, indican que produce un aumento de las bifidobacterias y una disminución de *E. coli* y *Clostridium*.

Se ha demostrado la inocuidad de la inulina y los FOS, siendo considerados en los Estados Unidos como GRAS y, en la mayor parte de Europa, son reconocidos oficialmente como ingredientes alimentarios naturales. Están, incluido hoy día, en numerosos productos alimentarios humanos y animales por su efecto positivo como prebiótico estimulante de la flora intestinal no patógena. Ha encontrado aplicación en nutracéuticos y dietética, productos lácteos, alimentos para pequeños animales (petfoods) y, en menor medida, en animales de producción. Además, se emplea en alimentación como sustitutos de grasas y modificante de la textura.

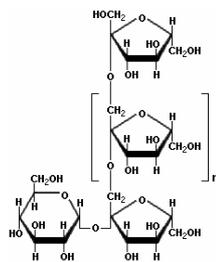


Figura 10. Las flores de alcachofa inmaduras son una fuente rica en inulina.

Diagnóstico y reactivo de análisis: La inulina se utiliza como reactivo de análisis para la evaluación fiable de la función renal y en concreto, de la velocidad de filtración glomerular. La única vía de eliminación de la inulina es la filtración glomerular. Inyectando inulina vía intravenosa, ésta pasa completamente a la orina; si se mide entonces inulina en sangre e inulina en orina, se puede determinar si el riñón funciona correctamente; la dosis de inulina será diferente para cada paciente dependiendo de su talla y peso y, se toman varias muestras de sangre y orina para un resultado más fiable. Para la determinación de la inulina en las muestras de orina, se utiliza un procedimiento espectrofotométrico basado en la medición del color que aparece en las muestras tras reaccionar el polisacárido con antrona en medio ácido.

Excipiente y portador de drogas: El interés de la liberación de drogas a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Las razones son obvias, si el portador o vector tiene el potencial de ser degradado en el lugar donde tiene que actuar, o el potencial para dirigir la droga a su sitio de acción, un efecto farmacológico óptimo podría obtenerse y al mismo tiempo, los efectos adversos de la droga podrían disminuir (Edman, 1985). Los sistemas de liberación de fármacos consistentes de polímeros biodegradables permiten controlar la liberación de fármacos, efectivamente dentro del rango terapéutico deseado, evitando las consecuencias de un exceso o un déficit, que podrían comprometer su eficacia antes de la administración de la siguiente dosis. Se han investigado si inulinas acetiladas y metiladas pueden ser degradadas por inulinasa y por bifidobacterias en orden de ser utilizadas como portadoras de drogas colónicas, aunque los resultados arrojados no fueron los esperados, quizás por la conformación que adquirirían las inulinas modificadas que impedía que actuara correctamente la enzima encargada de degradar la inulina. Por ello, sería interesante buscar nuevas técnicas de modificar la inulina para formar microsferas que encapsulen la droga o fármaco a emplear y se liberen adecuadamente en el lugar a actuar.

7. La empresa Artbiochem

El gran interés del aprovechamiento de residuos agroindustriales de alcachofa lo pone de manifiesto la generación de una empresa para valorizar estos subproductos, basada en algunos de los resultados obtenidos por nuestro Grupo de Investigación (GENZ). Artbiochem, S.L. es una empresa constituida en marzo de 2002 con capital exclusivamente de la Región de Murcia. Se trata de una empresa de concepción biotecnológica y con vocación innovadora, que tiene como objetivos la investigación de sustancias bioquímicas de origen vegetal, así como el desarrollo de la tecnología necesaria para producirlos y situarlos en el mercado. Es una spin-off en la que participa la Universidad de Murcia y, su vocación innovadora se pone de manifiesto en que en su primera fase (desde su constitución hasta la actualidad), ha implantado un Departamento de I+D+i con la contratación de dos Doctores y ha invertido una importante cantidad de su capital en el desarrollo de proyectos de I+D+i en colaboración con la Universidad de Murcia, así como en la adquisición de patentes.

Actualmente, la empresa se encuentra en su segunda fase, que consiste en el desarrollo industrial para la obtención de tres productos enzimáticos (POD, PPO y proteasas) y, dos biomoléculas, denominadas inulina y cinarina. Estos productos son obtenidos de residuos agroindustriales de alcachofa, por lo que supone la obtención de productos de mercado con un alto valor añadido y con importantes repercusiones socioeconómicas. Todos estos productos se obtienen mediante un proceso desarrollado por Artbiochem en colaboración con el GENZ y abarca una serie de etapas de obtención y purificación aplicando innovaciones tecnológicas ya existentes y desarrollando tecnologías nuevas en algunas de las fases de producción. Este nuevo proceso supone una mayor simplificación y un mayor rendimiento productivo, a partir de residuos de alcachofa procedentes de la industria conservera y del cultivo. Todo esto conduce a una gran ventaja competitiva, dado que los

productos similares que actualmente se comercializan, se obtienen de otras materias primas que suponen costos superiores de producción.



Figura 11. La empresa Artbiochem. Esta empresa ubicada en Archena (Murcia) es una empresa de concepción biotecnológica y con vocación innovadora, que tiene como objetivos la investigación de sustancias bioquímicas de origen vegetal, así como el desarrollo de la tecnología necesaria para producirlos y situarlos en el mercado.

8. Bibliografía

- Antón, F. A. (1992). Compostaje de los residuos orgánicos: Urbanos y Agrarios. Problemática de los residuos orgánicos. *Cuadernos de Fitopatología* **1**, 113-121.
- Baharav, E., Merimski, O., Shoenfeld, Y., Zigelman, R., Gilbrud, B., Yechezkel, G., Youinou, P. y Fishman, P. (1996). Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 84-88.
- Decareau, R.V. (1985). Microwaves in the food processing industry. Academic Press Inc. Londres.
- Devece, C., Rodríguez-López, J. N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Catalá, M., de los Reyes, E. y García-Cánovas, F. (1999). Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: Comparison of microwave, conventional and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4506-4511.
- Edman, P. (1985). Solid microspheres as drug delivery systems. En: Sartoreli AC, ed. *Methods of drug delivery*. New York: Pergamon Press, 23.
- Edwards, W., Leukes, W.D., Rose, P.D. y Burton, S.G. (1999) Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 769-773.
- Fonollá, J. y Boza, J. A. (1993). Utilización de los residuos del espárrago, procedentes de la industria conservera en la alimentación de rumiantes. *Avances en la alimentación y mejora animal* **33**, 163-165.
- Hammouda, F. y Seif-El-Nasr, M. (1993). Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. *Plant Foods Hum. Nutr.* **44**, 163-169.
- Hermida, J. R. (1993). Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. *Tecnologías complementarias en la industria alimentaria*, 137-148.
- Híner, A. N. P., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Smith, A. T., Arnao, M. B. y Acosta, M. (1995). A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and *m*-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* **234**, 506-512.
- Jiménez, L., Chica, A. y Cabello de los Cobos, R. (1989). Procesos de conversión de biomasa residual en energía. Procesos de obtención de bioalcohol en energía II. *Energía* **15**, 99-108.

-
- Krell, H.W (1991). Peroxidase: an important enzyme for diagnostic test kits. In: Lobarzewski J, Greppin H, Penel C y Gaspar Th, eds, Biochemical, Molecular and Physiological aspects of plant peroxidases, University of Geneva, pp 469-478
- Lattanzio, V., Cicco, N. y Linsalata, V. (2005). Antioxidant activities of artichoke phenolics. *Acta Hort. (ISHS)* 681, 421-428.
- Lázaro, L. y Arauzo, J. (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. *Hidrólisis enzimática* **12**, 227-240.
- Mata, J. (1998). Plantas de biometanización para la fracción orgánica de los RSU: II Tecnologías. *Residuos* **42**, 72-75.
- Megías, M., Martínez, A. y Gallego, J. (1991). Estudio de la evolución de los componentes nutritivos en el ensilado del subproducto de alcachofa. p 423-426. En: Actas de la XXXI Reunión Científica de la SEEP. Murcia.
- Mencarelli, F. (1987). Effect of high carbon dioxide atmospheres on stored zucchini squash. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112, 985-988.
- Muñoz-Palancas, J.A., Almela, L., Puerta, F., Nieto-Sandoval, J.M. y Fernández-López, J.A. (1997) Indices bioquímicos en el cultivo e industrialización de alcachofa. *Actas de Horticultura* **20**, 998-1005.
- Rodríguez-López, J. N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Devece, C., Sánchez-Hernández, D., de los Reyes, E. y García-Cánovas, F. (1999). Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz microwave radiation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3028-3035.
- Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., Varón, R., García-Cánovas, F. y García-Carmona, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 3801-3810.
- Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., y García-Cánovas, F. (2000) Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminos aromáticos, haluros orgánicos y/o metales pesados. Patente N° P200002544(7).
- Seo, S. Y., Sharma, V. K. y Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2837-2853.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J. y Rodríguez-López, J.N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry* **66**, 41-49.
- Svitel, J. y Miertus, S. (1998). Development of tyrosinase based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. *Env. Sci. Technol.* **32**, 828-832.
- Tatsumi, K., Wada, S. y Ichikawa, H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnol. Bioengin.* **51**, 126-130.
- Tudela, J., Espín, J. C., Rodríguez-López, J. N., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1997). Caracterización bioquímica del pardeamiento enzimático del champiñón en Casasimaro. II Jornadas técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha, CIES-Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha, Diputación Provincial de Cuenca.
- Wick, C.B. (1996). Enzymol International shows promise of novel peroxidase. *Genetic Engineering News* **1**: 18.