

Obtención de azúcar invertido por hidrólisis enzimática

Sara Mendoza-Ferrer*, Libán Alba-Gutiérrez, Yeider Rodríguez-Molina, Jorge García-González, Vivian León-Fernández, Indira Álvarez-Quesada

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.

* sara.mendoza@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La sacarosa, azúcar común o azúcar de mesa es un disacárido de glucosa y fructosa que se descompone en estas sustancias, mediante una reacción de hidrólisis, ya sea por vía ácida o enzimática, para obtener como producto el azúcar invertido.

Para la obtención de azúcar invertido, a escala de laboratorio, a partir de hidrólisis enzimática, se analizó cómo influyen la actividad enzimática (U/mL) y la temperatura (°C) en el tiempo de inversión total. Para ello se evaluó la enzima invertasa a actividades de 80 U/mL y 180 U/mL respectivamente, y se trabajó a temperaturas de 60 y 75 °C para lograr la inversión en el menor tiempo posible.

Tanto la actividad enzimática como la temperatura tienen un efecto estadísticamente significativo, sobre el tiempo de inversión y, afectan directamente, la cinética de la reacción; se observa que a menores temperaturas y actividad enzimática, el tiempo de inversión aumenta, por tanto, los mejores resultados fueron obtenidos para una actividad de 180 U/mL y una temperatura de 75 °C.

Palabras clave: inversión, hidrólisis, sacarosa, actividad enzimática, temperatura.

ABSTRACT

Sucrose, common sugar or table sugar is a disaccharide of glucose and fructose that is broken down into these substances through a reaction of hydrolysis either through acid or enzymatic route, to obtain as a product the inverted sugar.

To obtain invert sugar on a laboratory scale, from enzymatic hydrolysis, it was analyzed how enzymatic activity (U/mL) and temperature (°C) influence the total inversion time. To do this, the enzyme was evaluated at activities of 80 U/mL and 180 U/mL respectively, and at temperatures of 60 and 75 °C to achieve the inversion in the shortest time possible.

Both enzymatic activity and temperature have a statistically significant effect on the inversion time and directly affect the kinetics of the reaction. It was observed that at lower temperatures and enzymatic activity, the inversion time increases; therefore the best results were obtained for an activity of 180 U/mL and a temperature of 75 °C.

Key words: inversion, hydrolysis, sucrose, enzyme activity, temperature.

INTRODUCCIÓN

El sorbitol se utiliza en la fabricación de dentífricos, como agente humectante y en lociones para el cutis. Sus propiedades como inhibidor son valiosas, para blanquear y desengrasar y para grabar sobre aluminio. Las resinas de sorbitol se emplean en barnices y lacas por sus buenas cualidades de adhesividad, flexibilidad y durabilidad.

Aunque existen tecnologías patentadas a partir de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos a alta temperatura y presión, el proceso mundial establecido, sin presentar hasta el momento competencia, está basado en la hidrogenación catalítica de la glucosa (1, 2).

En Cuba, para la producción de glucosa, a partir de azúcar refino, materia prima para la obtención de sorbitol, se emplea la tecnología propuesta por el ICINAZ, la cual se fundamenta en realizar la inversión ácida de la sacarosa. En el país existen dos plantas de este tipo, la UEB Chiquitico Fabregat, de la provincia de Villa Clara, y la UEB Argentina, de la provincia de Camagüey.

El proceso de obtención de glucosa en la UEB Chiquitico Fabregat presenta dificultades en su tecnología, debido al elevado consumo de materia prima, la baja conversión en la hidrólisis, bajo rendimiento en cristales, por no alcanzar el enfriamiento necesario, formación de productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados, debido al empleo de ácido fosfórico a elevadas temperaturas, que afecta el rendimiento y calidad de la glucosa (3).

La obtención de glucosa por vía enzimática proporciona una herramienta adecuada para superar los problemas de caramelización, producción de sabores indeseados y colores en el azúcar invertido, generados por la oxidación, ya que el proceso se realiza en condiciones moderadas de pH y temperatura, en comparación con las utilizadas en la hidrólisis ácida (4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Invertasa

Se trabajó con la enzima invertasa GS115BfrA4X de *Pichia pastoris*, producida en la UEB Bioprocesos Cuba 10, a partir del clon del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), modificada genéticamente, a diferentes valores de actividad enzimática.

Sacarosa

Para la preparación de las diferentes soluciones de sacarosase utilizó azúcar refino, procedente de la UEB 30 de Noviembre.

Métodos de análisis

- Determinación espectrofotométrica del color del azúcar refino.
- Determinación conductimétrica de ceniza en azúcar refino.
- Método de Lane y Eynon, a volumen constante, para determinar azúcares reductores en materias primas y productos intermedios.
- Determinación gravimétrica de la humedad en azúcares blancos.
- Determinación potenciométrica del pH en productos azucareros.
- Determinación de Pol en azúcares blancos.

Procesamiento de información

Los resultados estadísticos fueron obtenidos y analizados con ayuda del STATGRAPHICS Centurion XV.

Materiales

Para la evaluación de la enzima se utilizó un reactor de 1.5 L de capacidad, con recirculación de agua, acoplado a un agitador mecánico (IKA) y un criostato (WiseCircu), como se observa en la figura 1, al que se ajusta y se mantiene la temperatura deseada.

La temperatura en el interior del reactor es controlada por un termómetro, con intervalos de temperatura desde -10 °C hasta 100 °C, debidamente calibrado.



Figura 1. Instalación experimental para la obtención de azúcar invertido por hidrólisis enzimática.

Para controlar los parámetros de Brix y pH se empleó un refractómetro digital (XS) y un equipo medidor de pH de marca METTLER TOLEDO.

El avance de la reacción de inversión enzimática de sacarosa fue seguido y se utilizó el método polarimétrico, con un polarímetro AntonPaar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Procedimiento evaluativo

Se realizó la evaluación de la enzima invertasa, a diferentes temperaturas, y actividades enzimáticas, con el propósito de obtener sirope invertido en el menor tiempo posible. Para ello se realizaron pruebas a escala de laboratorio. Todas las cantidades utilizadas fueron calculadas sobre la base de 1 kg de azúcar refino. Los pasos fueron los siguientes:

1. Caracterizar el azúcar refino. Se caracterizó en cuanto a: Pol, humedad, color fotocolorimétrico, azúcares reductoras y cenizas.
2. Preparar la solución de 75 a 80 °Bx (1000 g de azúcar refino en 250 mL de agua) para trabajar en condiciones similares a la industria.
3. Medir pH una vez disuelta la solución.
4. Medir el pH de la enzima.
5. Adicionar la enzima a la solución (100 mL/1 kg azúcar refino) una vez alcanzada la temperatura a evaluar.
6. Medir Brix, pH y Pol.
7. Determinar el Pol cada tres horas, hasta lograr la máxima inversión detectada por polarimetría.
8. Medir el pH final.

Análisis descriptivo de los resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del azúcar refino utilizado para la realización de la evaluación de la enzima. El azúcar refino utilizado alcanza las especificaciones para azúcares blancos de la Norma Cubana 377:2013.

En la tabla 2 se muestran los valores de Brix y pH inicial, pH final y tiempo de inversión correspondiente a cada corrida experimental.

Tabla 1. Caracterización del azúcar refino

Pol	Humedad	Azúcares reductores	Cenizas	Color fotocolorimétrico
99.834ºZ	0.062 %	0.0340 %	0.030 %	172 UI

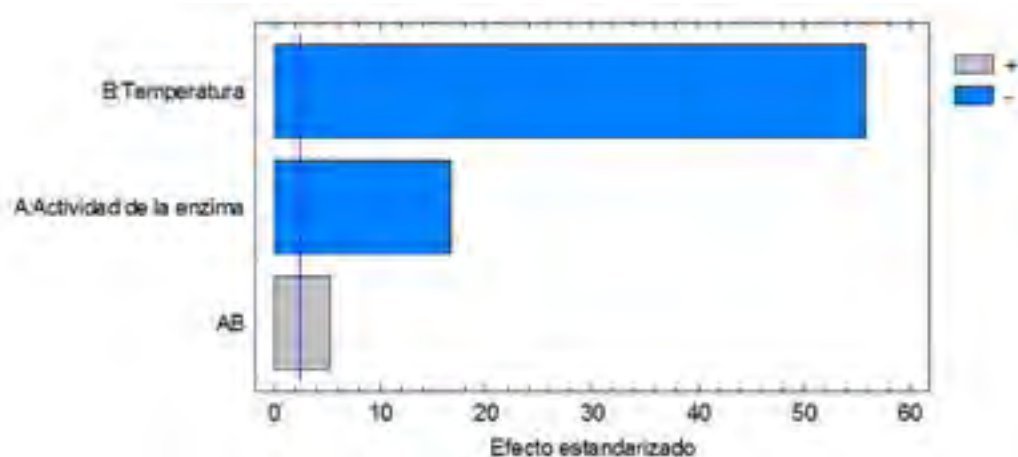
Tabla 2. Resultados obtenidos en corridas experimentales

Actividad de la enzima (U/mL)	Temperatura (°C)	Brix inicial	pH inicial	pH final	Tiempo de inversión (h)
80.0	60.0	76.8	6.0	5.4	12.3
80.0	75.0	78.9	6.1	5.4	6.1
80.0	60.0	77.9	6.3	5.6	12.0
80.0	75.0	78.2	6.3	5.4	6.2
80.0	60.0	76.3	6.1	5.4	12.1
80.0	75.0	77.2	6.1	5.4	6.5
180.0	60.0	75.9	6.00	5.4	10.2
180.0	75.0	76.2	6.2	5.5	5.2
180.0	60.0	76.8	6.00	5.4	9.9
180.0	75.0	77.2	6.00	5.4	5.0
180.0	60.0	76.8	6.1	5.4	10.0
180.0	75.0	78.1	6.2	5.5	5.3

En la tabla 3 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el tiempo de inversión.

Tabla 3. Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Actividad de la enzima	7.6	1	7.6	276.4	0.0000
B: Temperatura	86.4	1	86.4	3110.5	0.0000
AB	0.7	1	0.7	27.0	0.0020
Error total	0.16	5	0.02		

**Figura 2.** Diagrama de Pareto.

R-cuadrada = 99.8247 porciento

Estadístico Durbin-Watson = 2.27 (P=0.4835)

El diagrama de Pareto, figura 2, muestra que la temperatura, la actividad de la enzima y la interacción entre ambas modifican el tiempo de inversión.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Tiempo de inversión} = 8.4 + 0.8*A + 2.68333*T + 0.25*A*T$$

En el modelo se puede apreciar que la variable que mayor influencia ejerce sobre el tiempo de inversión es la temperatura; luego la interacción entre la temperatura y la actividad de la enzima y, por último, la actividad de la enzima. Además de que la dirección del óptimo se mueve hacia la mayor temperatura y mayor actividad enzimática.

En la figura 3 se muestra el gráfico correspondiente a la superficie de respuesta, demuestra los máximos y mínimos del diseño experimental en la que se puede observar que existe un mínimo de tiempo alcanzado, con la mayor temperatura y actividad enzimática.

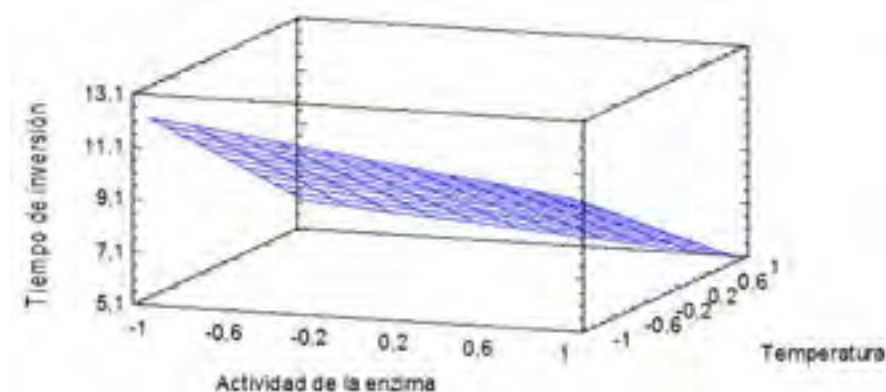


Figura 3. Superficie de respuesta.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El criterio óptimo de temperatura de trabajo reportado para la enzima termostable invertasa es de 60-90 °C. La temperatura máxima de 75 °C se tomó a partir de criterios experimentales, pues a mayores valores se obtuvo un sirope coloreado y una disminución de pH.

Los resultados reflejados en la tabla 2 muestran que el tiempo de inversión de la sacarosa se reduce significativamente, cuando se trabaja a la temperatura de 75 °C, tanto para el caso de la enzima con actividad 80 U/mL como para la de 180 U/mL con una diferencia alrededor de las seis horas respecto al experimento realizado a 60 °C.

La actividad enzimática que condujo a mejores resultados en cuanto al tiempo de inversión fue de 180 U/mL, un resultado lógico si se tiene en cuenta que a mayor actividad enzimática mayor velocidad de reacción.

Los tiempos de inversión obtenidos para las diferentes actividades de la enzima (de una a dos horas), no difieren notablemente, en comparación con las 100U/mL que existen de diferencia entre ambas actividades enzimáticas.

La cantidad de licor de enzima utilizado para todos los ensayos fue de 10 mL de solución, por cada 100 g de sacarosa, independientemente de la actividad reportada para la enzima. Por lo cual, la relación obtenida para la solución con actividad de 80 U/mL fue de 8 U/g de sacarosa y para la solución de 180 U/mL de 18 U/ g de sacarosa.

El valor de pH varió entre 5.4 y 5.5 para la mezcla final de todos los sustratos, no fue necesario realizar ajustes en esta variable por encontrarse dentro del intervalo óptimo de trabajo para la

enzima (de 4.0 hasta 6.0) (5). Por lo cual puede concluirse que los cambios en las velocidades de inversión, para estos experimentos, pueden relacionarse con las diferencias entre las temperaturas de trabajo y con la actividad enzimática utilizada en cada experimento.

CONCLUSIONES

- La temperatura óptima de trabajo obtenida fue de 75 °C para ambas enzimas.
- Se logró el menor tiempo de inversión con la enzima de actividad 180 U/mL.
- Los resultados muestran que la actividad enzimática y la temperatura son estadísticamente significativos y disminuye el tiempo de inversión del azúcar refino cuando se aumentan ambas variables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michelena Alvarez, G., Santiesteban Garlobo, C.M. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. Tercera Edición ed2000.
2. Gonzaga Andrade, B.; Silva, J., Delgado-Arcaño. Y.; *et al.* Aspectos económicos y tecnológicos de la producción de sorbitol por vía química. Revista Cubana de Química. 2019.
3. Paret González, A. Propuesta tecnológica para la etapa de hidrólisis enzimática en la producción de glucosa a partir de azúcar refino [Tesis de Diploma]: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2018.
4. Rodríguez Hernández, R.A. Propuesta tecnológica para la obtención de glucosa por hidrólisis enzimática a partir del azúcar refino [Tesis de Diploma]: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2016.
5. León, V.; Ortega, J.C. Biosíntesis de invertasa recombinante en *Pichia pastoris*. Diversificación 2019.