

**Artículo Original**

**OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INVERSIÓN EN LA  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA SACAROSA**

**OPTIMIZATION OF INVERSION TIME IN SUCROSE  
ENZYMATIC HYDROLYSIS**

Sara Mendoza Ferrer <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4468-9052>  
Yeider Rodríguez Molina <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4557-7300>  
Mauricio Ribas García <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5869-4680>

<sup>1</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca No 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

Recibido: Febrero 9, 2021; Revisado: Marzo 2, 2021; Aceptado: Marzo 19, 2021

**RESUMEN**

**Introducción:**

En la actualidad, el grupo azucarero cubano AZCUBA tiene como prioridad producir glucosa a partir de azúcar refinado, ya que es una materia prima fundamental en la producción de sorbitol, componente que se utiliza para elaborar la pasta dental. La glucosa puede ser obtenida mediante inversión (hidrólisis) ácida o enzimática, esta última presenta algunas ventajas relacionadas con la disminución del nivel de corrosión del equipamiento industrial y mejor calidad del producto final.

**Objetivo:**

Encontrar la mejor combinación de niveles de temperatura de reacción, concentración de enzima y brix de la solución, que minimicen el tiempo de inversión de la sacarosa utilizando como catalizador de la hidrólisis la enzima GS115BfrA4X *Pichia Pastoris*, modificada genéticamente para expresar la invertasa de *Thermotoga marítima*, con un pH óptimo de 5,5 y temperatura óptima de 80-90°C.

**Materiales y Métodos:**

Para obtener las mejores condiciones de hidrólisis enzimática se estudió el efecto de variar la temperatura de reacción, concentración de enzima y brix de la solución sobre el tiempo de inversión, utilizando el *Statgraphics Centurion XVI*, partiendo de un diseño de Box-Behnken de superficie respuesta, a tres niveles para cada uno de los factores.



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

\* Autor para la correspondencia: Sara Mendoza, email: [sara.mendoza@icidca.azcuba.cu](mailto:sara.mendoza@icidca.azcuba.cu)



### **Resultados y Discusión:**

Se identificó una combinación óptima de los factores (Temp = 85°C, Brix= 80 % y Enzima = 23 U/g<sub>sacarosa</sub>).

### **Conclusiones:**

La temperatura de reacción y la concentración de enzima tienen un efecto significativo con un 95 % de confianza sobre el tiempo de inversión de la sacarosa.

**Palabras clave:** glucosa; hidrólisis enzimática; sacarosa; tiempo de inversión.

### **ABSTRACT**

#### **Introduction:**

Currently, the Cuban sugar group AZCUBA's priority is to produce glucose from refined sugar, as it is a fundamental raw material in sorbitol production. Sorbitol is a component used in toothpaste elaboration. Glucose can be obtained by acidic or enzymatic inversion (hydrolysis). Enzymatic hydrolysis has some advantages related to reducing corrosion level of industrial equipment and obtaining better final product quality.

#### **Objective:**

To find the best combination of reaction temperature, enzyme concentration and solution brix levels that minimize sucrose inversion time using genetically modified GS115BfrA4X Pichia Pastoris enzyme as a hydrolysis catalyst, to express the invertase from *Thermotoga maritima*, with an optimal pH of 5.5 and an optimal temperature of 80-90°C.

#### **Materials and Methods:**

To obtain the best conditions for enzymatic inversion, the effect of varying the reaction temperature, enzyme concentration and solution brix on the inversion time was studied, using the Statgraphics Centurion XVI, starting from a Box-Behnken design of surface response at three levels for each factor.

#### **Results and Discussion:**

It was possible to identify an optimal combination of factors (Temp. = 85 °C, Brix = 80% and Enzyme = 23 U/g<sub>sucrose</sub>).

#### **Conclusions:**

Reaction temperature and enzyme concentration have a significant effect, with 95% confidence, on the sucrose inversion time.

**Keywords:** glucose; enzymatic hydrolysis; sucrose; inversion time.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El país tiene la necesidad de incrementar la producción nacional de sorbitol para ser utilizado en la formulación de pasta dental. La materia prima fundamental para esta producción es la glucosa.

En Cuba existen dos industrias que producen glucosa a partir de azúcar refino, utilizando la inversión ácida de la sacarosa (UEB “*Chiquitico Fabregat*” de la provincia de Villa Clara y la UEB “*Argentina*” de la provincia de Camagüey).

En la UEB “*Chiquitico Fabregat*” la hidrólisis ácida se lleva a cabo en un tanque cilíndrico horizontal de 28 m<sup>3</sup> de volumen, con temperatura entre 87-90 °C. Se le

adicionan 22,5 t de azúcar refino por cada hidrólisis para lograr una disolución entre 77-78 °brix. Para obtener el sirope invertido en 4h, se añaden 600 mL de ácido fosfórico al 85% por cada tonelada de refino disuelta.

Según estudios realizados por Brizuela (2015), Hernández (2016), Paret (2019), Ruíz (2018) y (Cortés y col., 2020) la inversión de la sacarosa en medio ácido presenta un elevado consumo de materia prima, baja conversión de sacarosa, formación de productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados como los derivados cíclicos de los monosacáridos que se producen a pH bajo y elevada temperatura (León y col., 2019).

La hidrólisis ácida de la sacarosa se considera un proceso más económico en comparación con la enzimática, debido al alto costo de producción de la enzima invertasa. Sin embargo, obtener glucosa por vía enzimática garantiza productos con bajo contenido de cenizas, elimina el mal sabor el producto final (Santana y col., 2005) además de minimizar la formación de productos colaterales, el deterioro ambiental y del equipamiento (León y col., 2019).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo encontrar la mejor combinación de niveles de temperatura de reacción, concentración de enzima y brix de la solución, que minimicen el tiempo de inversión de la sacarosa utilizando como catalizador de la hidrólisis la enzima GS115BfrA4X *Pichia Pastoris*, modificada genéticamente para expresar la invertasa de *Thermotoga marítima*, con un pH óptimo de 5,5 y temperatura óptima de 80-90<sup>0</sup>C.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Equipamiento y materias primas

Los experimentos se desarrollaron en un reactor de 1,5 L de capacidad con recirculación de agua acoplado a un agitador mecánico (IKA), un criostato (WiseCircu) y control de temperatura en el interior del reactor mediante un termómetro debidamente calibrado (figura 1).



**Figura 1.** Instalación experimental

Se empleó la enzima invertasa, producida en la *UEB Bioprocesos Cuba 10* y concentrada a 424 U/mL en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (*CIGB*). Para preparar las diferentes soluciones de sacarosa se empleó azúcar refino, procedente de la *UEB 30 de noviembre*, a la que se le realizó las siguientes determinaciones:

- Color por vía espectrofotométrica (NC 382:2005)
- Ceniza conductimétrica (NC 380:2005)
- Azúcares reductores (NC 383:2005)
- Humedad mediante el método gravimétrico (NC 81:2017)
- Pol (NC 379:2005)

El brix de la solución se determinó mediante un refractómetro digital (XS) y se utilizó un equipo medidor de pH de marca METTLER TOLEDO. El avance de la inversión enzimática fue seguido por polarimetría, en un polarímetro de marca *Anton Par*, realizando mediciones cada dos horas hasta lograr la máxima inversión.

## 2.2 Diseño experimental

Se decidió ejecutar un diseño de *Box-Behnken* de superficie de respuesta, a tres niveles (escogidos de manera aleatoria ya que solo se había trabajado a 18 U/g sacarosa) para cada uno de los siguientes factores:

$X_1$ : Temperatura de la reacción (65 °C, 75 °C, 85 °C)

$X_2$ : Brix de la solución (70 %, 75 %, 80 %)

$X_3$ : Concentración de enzima (15, 19, 23 U/g sacarosa)

Variable de respuesta:

Y: Tiempo de inversión de la sacarosa (h)

Se empleó el software estadístico *Statgraphics Centurion XVI* para el procesamiento de los datos experimentales.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran las especificaciones para azúcares blancos de la (NC 377:2013) y la repetibilidad y reproducibilidad de los métodos utilizados.

**Tabla 1.** Especificaciones para azúcares blancos

<i>Métodos</i>	<i>Repetibilidad</i>	<i>Reproducibilidad</i>	<i>Especificaciones para azúcares blancos</i>
Pol	Máximo 0,066 °Z	Máximo 0,094 °Z	Mínimo 99,65 °Z
Humedad	Máximo 0,005 % m/m	Máximo 0,10 % m/m	Máximo 0,10% m/M
Reductores	0,007 --- 0,022 %	0,015 --- 0,029 %	Máximo 0,10 % m/m
Cenizas	0,00115 % m/m	0,00177 % m/m	Máximo 0,10 % m/m
Color Foto Colorimétrico	Máximo 3UI	Máximo 7UI	Máximo 300 UI

En la tabla 2 se muestran los promedios de los resultados obtenidos en la caracterización del azúcar refino empleado en la experimentación.

**Tabla 2.** Caracterización del azúcar refino

	<i>Pol</i>	<i>Humedad</i>	<i>Reductores</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Color Foto colorimétrico</i>
Resultados promedios	99,82 °Z	0,06 %	0,03 %	0,04 %	290 UI
Repetibilidad	0,050 °Z	0.004	0,014 %	0,00100 % m/m	2 U
Reproducibilidad	0,030 °Z	0.072	0,025 %	0,00100 % m/m	5 U

En la tabla 3 se muestra la matriz experimental correspondiente al diseño *Box-Behnken* y los resultados del tiempo de inversión de la sacarosa, expresados en horas, para cada condición experimental evaluada.

Un análisis inicial de la tabla 3 revela que, para las condiciones experimentales con mayor temperatura (85°C) y mayor concentración de enzima (23 U/g<sub>sacarosa</sub>) se obtiene menor tiempo de inversión.

**Tabla 3.** Matriz experimental del diseño *Box-Behnken*

No.	Temp (°C)	Brix (%)	Enzima (U/g <sub>sacarosa</sub> )	Tiempo Inv (h)
1	85	75	23	4,15
2	75	80	15	13,00
3	75	75	19	8,00
4	75	70	15	9,23
5	75	75	19	8,00
6	85	80	19	5,13
7	65	75	23	9,17
8	85	75	15	7,55
9	65	75	15	9,00
10	75	80	23	5,28
11	65	70	19	10,08
12	85	70	19	5,50
13	65	80	19	12,00
14	75	75	19	8,00
15	75	70	23	4,50

### 3.1 Modelo estadístico

El modelo estadístico en el que se basa el análisis del diseño de superficie de respuesta de *Box-Behnken*, expresa la variable respuesta  $Y$  como una función lineal de los factores experimentales, interacciones entre los factores, términos cuadráticos y el término del error.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \varepsilon \quad (1)$$

Donde:

$X_1$ : Temperatura de la reacción (°C)

$X_2$ : Brix de la solución (<sup>0</sup>Brix)

$X_3$ : Concentración de enzima (U/g<sub>sacarosa</sub>)

$Y$ : Tiempo de inversión de la sacarosa (h)

$\beta_0, \beta_1, \beta_3$ : Coeficientes constantes

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ : Coeficientes de interacción lineal

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ : Coeficientes de interacción cuadráticos

$\varepsilon$ : Error experimental

El error experimental  $\varepsilon$  se asume que es aleatorio y proviene de una distribución normal con media cero y desviación estándar igual a  $\sigma$ .

Las magnitudes de los efectos de los factores aparecen en el gráfico de Pareto (figura 2). Se destacan dos efectos significativos con un 95 % de confianza, temperatura y concentración de enzima. También se puede identificar a la interacción entre el brix y la concentración de enzima como la de mayor magnitud.

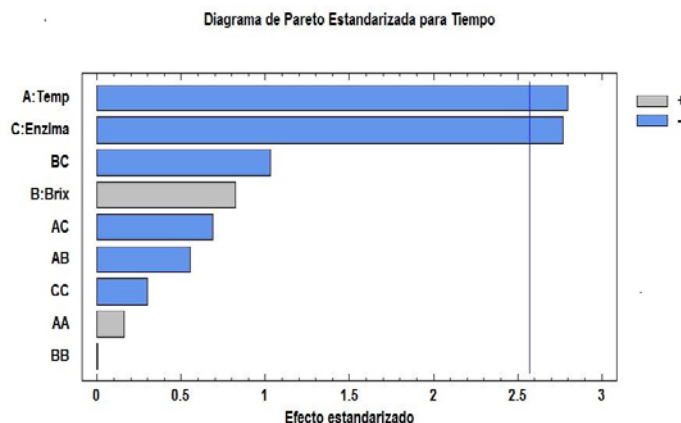


Figura 2. Diagrama de Pareto para el tiempo de inversión

### 3.2 Análisis de los efectos principales y las interacciones

La figura 3 corresponde al gráfico de los efectos principales. En la misma se aprecia que mientras mayor es la temperatura de reacción, menor va a ser el tiempo de inversión. Un comportamiento similar se obtiene cuando se incrementa la concentración de enzima. El efecto independiente del aumento del brix no es tan marcado como los dos anteriores. Al analizar el gráfico de interacciones (figura 4). Se observa que:

- Para un nivel bajo de brix (70 %), el efecto que tiene aumentar la concentración de enzima sobre la disminución del tiempo de inversión de la sacarosa es mucho menor que si se trabaja a alto niveles de brix (80 %), Interacción (BC: Brix\*Enzima).
- El análisis de la interacción AC (Temp\*Enzima) muestra que, independientemente del nivel de concentración de enzima, un aumento de la temperatura disminuye el tiempo de inversión.
- La interacción AB (Temp\*Brix) se interpreta como, a mayor temperatura se obtiene menor tiempo de inversión independientemente del brix.

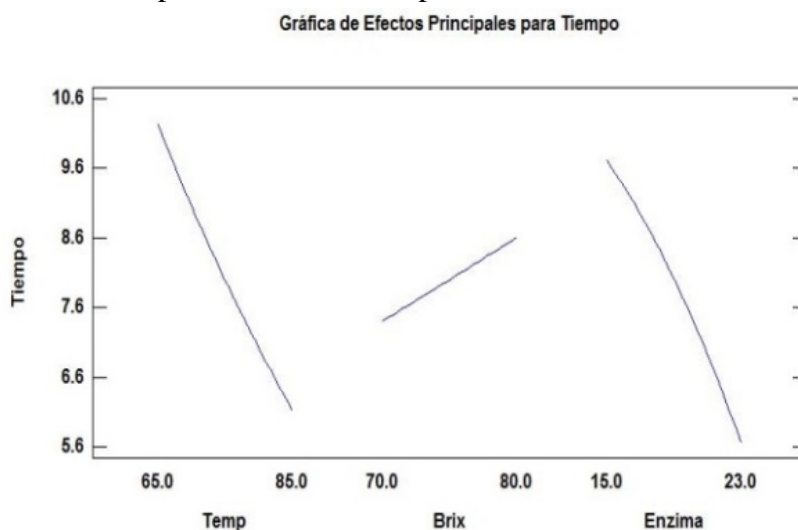
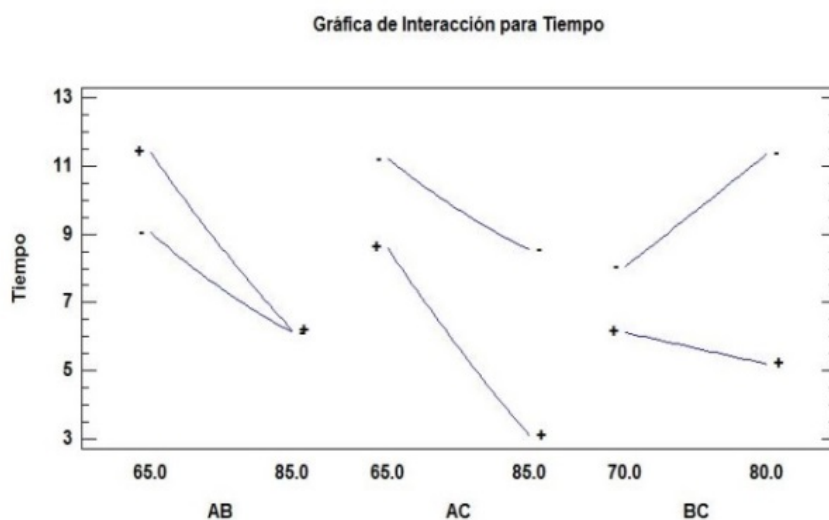


Figura 3. Gráfico de efectos principales



**Figura 4.** Gráfico de interacciones entre los efectos

### 3.3 Análisis de varianza

La prueba de análisis de varianza (tabla 4) evaluó la significación de los factores con un 95 % de confianza y 5 grados de libertad para estimar el error experimental. Siendo la temperatura y concentración de enzima los factores significativos sobre el tiempo de inversión de la sacarosa.

El modelo ajustado explica alrededor del 78,4 % de la variabilidad del tiempo de inversión de la sacarosa y tiene la siguiente estructura:

$$Y = -138,243 + 0,732 * Temp + 1,963 * Brix + 5,593 * Enz + 0,001 * Temp^2 - 0,011 * Temp * Brix - 0,018 * Temp * Enz + 0,0002 * Brix^2 - 0,0534 * Brix * Enz - 0,0201 * Enz^2 \quad (2)$$

Donde:

Temp: Temperatura de la reacción (°C)

Brix: Brix de la solución (°Brix)

Enz: Concentración de enzima (U/g<sub>sacarosa</sub>)

Y: Tiempo de inversión de la sacarosa (h)

**Tabla 4.** Análisis de varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temp	33,579	1	33,579	7,83	0,0380
B:Brix	2,904	1	2,904	0,68	0,4479
C:Enzima	32,927	1	32,927	7,68	0,0393
AA	0,110	1	0,110	0,03	0,8791
AB	1,311	1	1,311	0,31	0,6040
AC	2,016	1	2,016	0,47	0,5233
BB	0,00009	1	0,00009	0,00	0,9965
BC	4,558	1	4,558	1,06	0,3497
CC	0,384	1	0,384	0,09	0,7767
Error total	21,431	5	4,286	-	-
Total (corr.)	99,256	14	-	-	-

R-cuadrada = 78,408 %

Error estándar del est. = 2,07033

Error absoluto medio = 0,965667

Estadístico Durbin-Watson = 1,2394 (P=0,0911)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,204443

### 3.4 Condiciones óptimas de la variable respuesta

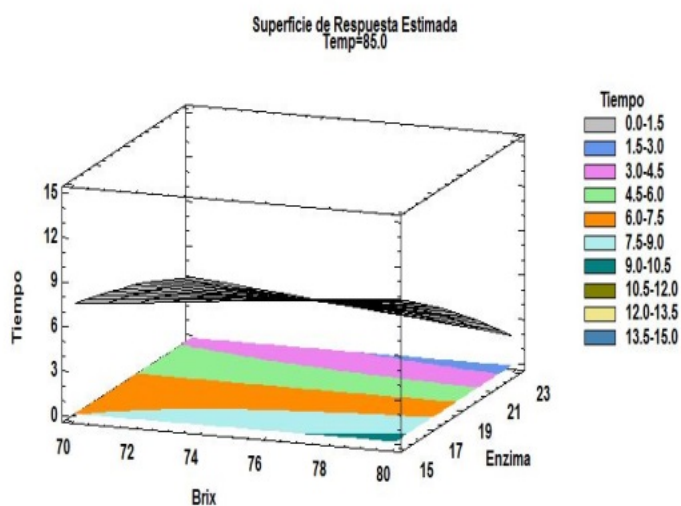
Para minimizar el tiempo de inversión de la sacarosa se calculó un mínimo local del modelo de superficie de respuesta (Ecuación 2) sujeto a las restricciones impuestas por los límites de las variables del diseño. Se utilizó un método numérico de optimización no lineal con restricciones del tipo Newton para encontrar el mínimo local.

Como resultado (tabla 5) se obtuvo que el menor tiempo de inversión se alcanza alrededor de las 2 horas, cuando los valores de temperatura, brix y concentración de enzima se encuentren en los niveles máximos (85 °C, 80 %, 23 U/g sacarosa).

**Tabla 5.** Valores óptimos de la respuesta

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temp	65,0	85,0	84,8
Brix	70,0	80,0	80,0
Enzima	15,0	23,0	23,0

En el gráfico de superficie de respuesta, generado para un nivel alto de temperatura (85 °C), muestra cómo, a medida que aumenta la concentración de enzima y el brix, disminuye el tiempo de inversión de la sacarosa (figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de superficie de respuesta estimada

#### 3.4.1 Validación de los resultados

Con el objetivo de validar el modelo obtenido, se decidió planificar una nueva etapa experimental, consistente en realizar cinco réplicas de las condiciones experimentales óptimas (tabla 6). En esta etapa los resultados indican que la sacarosa se invierte



alrededor de las 4h, sin embargo del modelo de superficie respuesta (Ecuación 2), se obtuvo como variable óptima un tiempo de inversión de 2h. Esta diferencia se debe a que además de los parámetros analizados en el diseño, existen otros que influyen en el tiempo de inversión de la sacarosa, como es el caso de la acción hidrolítica de la enzima invertasa debido a la inhibición por exceso de sustrato (Solís y col., 2010) y la caramelización del sirope causada por la elevada temperatura a la que se trabaja.

**Tabla 6.** Réplicas de las condiciones experimentales óptimas

<i>No.</i>	<i>Temp</i> (°C)	<i>Brix</i> (%)	<i>Enzima</i> (U/g)	<i>Tiempo</i> <i>Inv (h)</i>
1	85	80	23	4,10
2	85	80	23	4,00
3	85	80	23	4,00
4	85	80	23	4,00
5	85	80	23	4,15

#### 4. CONCLUSIONES

1. La temperatura y la concentración de enzima manifiestan una influencia significativa sobre la velocidad de reacción, siendo estos los factores más importantes desde el punto de vista de control del proceso.
2. Mientras mayor son los niveles de brix se necesita mayor cantidad de enzima para disminuir el tiempo de inversión de la sacarosa.
3. El modelo de superficie de respuesta resulta adecuado para determinar las condiciones óptimas del proceso ya que explica más del 78 % de la variabilidad del tiempo de inversión de la sacarosa.
4. Las condiciones óptimas de reacción para minimizar el tiempo de inversión de la sacarosa son: Temp=85°C, Brix=80 % y Enzima=23 U/g<sub>sacarosa</sub>.

#### REFERENCIAS

- Brizuela, L.G., Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial., Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Cuba, 2015.
- Cortés, M.F., Ruíz, I., Alomá, I., González., L.E., Diseño de intercambiadores de calor para intensificar el proceso de obtención de glucosa en la UEB “Chiquitico Fabregat”., Centro Azúcar, Vol. 47, No. 1, 2020, pp. 10-21.
- Hernández, R., Propuesta tecnológica para la obtención de glucosa por hidrólisis enzimática a partir del azúcar refino., Tesis en opción al título de Ingeniero Químico, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Cuba, 2016.
- León, V., Ortega, J.C., Acosta, R., Oliva, N., Hernández, R., Martínez, D., Dopico, D., San Juan, A.N., Cámara, A., Díaz, D., Luzardo, L., Hernández, T., Peña, E., Biosíntesis de invertasa recombinante en *Pichia pastoris*., Memorias del XV Congreso Internacional sobre azúcar y derivados, DIVERSIFICACIÓN 2019, Hotel

- Nacional de Cuba, La Habana, Junio 2019, pp. 1-4.
- NC 379:2005., Determinación del Pol en azúcares blancos. Método gravimétrico de la masa normal., 2005, pp. 4-8.
- NC 380:2005., Determinación de cenizas en Azúcares Blancos. Método Conductimétrico., 2005, pp. 4-7.
- NC 382:2005., Determinación del color en una solución de azúcar blanco. Método Fotocolorimétrico., 2005, pp. 4-8.
- NC 383:2005., Determinación de azúcares reductores en azúcares blancos. Método volumétrico de Ofner modificado., 2005, pp. 4-7.
- NC 377:2013., Azúcares blancos\_\_especificaciones., 2013, pp. 4-7.
- NC 81:2017., Determinación de la humedad del azúcar por pérdida en el secado., 2017, pp. 4-7.
- Paret, A., Propuesta tecnológica para la etapa de hidrólisis enzimática en la producción de glucosa a partir de azúcar refino., Tesis presentada en opción del título de Ingeniero Químico, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2019.
- Ruíz, I., Propuesta de modificaciones a la producción de glucosa por vía enzimática en la UEB “Chiquitico Fabregat”., Tesis en opción al título de Ingeniero Químico, Facultad Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Cuba, 2018.
- Santana, A.C., Costa, L., Mendes, A., Moraes, C.A., Gomes de Andrade, C.A., Perez Fernandez, M de los A., Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*., Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 8, No. 1, 2005, pp. 55-62.
- Solís, J.A., Calleja, K., Durán de Bazúa, M del C., Desarrollo de jarabes fructosados de caña de azúcar a partir del guarapo., Revista Tecnología, Ciencia, Educación, Vol. 25, No. 1., 2010, pp. 53-62.

## **CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

## **CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES**

- Ing. Sara Mendoza Ferrer. Realizó el estudio, análisis de los resultados y escritura del artículo.
- Tec. Yeider Rodríguez Molina. Colaboró con los experimentos realizados en el laboratorio y la escritura del artículo.
- Dr.C. Mauricio Ribas García. Diseñó la matriz experimental ejecutada y realizó el análisis estadístico del diseño de experimento.