



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

IIQB - CIDEM

**INVERSIÓN DE SACAROSA DE JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR POR ACCIÓN
DE UNA INVERTASA TERMOESTABLE DE *Thermotoga maritima***

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

HUGO MERLOS ARITZMENDI

ASESORES

**D.C. CARLOS R. SOSA AGUIRRE
M.C. ARIOSTO AGUILAR MANDUJANO**

Morelia, Mich., México. Mayo del 2007



Centro de Investigación y Desarrollo
del Estado de Michoacán

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL **Dr. CARLOS R. SOSA AGUIRRE**, EN COLABORACIÓN CON EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO DEL ESTADO DE MICHOCÁN Y CO-ASESORADO POR EL **M.C. ARIOSTO AGUILAR MANDUJANO**.

QUIEN NO CONOCE NADA, NO AMA NADA. QUIEN NO PUEDE HACER NADA, NO COMPRENDE NADA. QUIEN NADA COMPRENDE, NADA VALE. PERO QUIEN COMPRENDE TAMBIÉN AMA, OBSERVA, VE... CUANTO MAYOR ES EL CONOCIMIENTO INHERENTE A UNA COSA, MÁS GRANDE ES EL AMOR... QUIEN CREE QUE TODAS LAS FRUTAS MADURAN AL MISMO TIEMPO QUE LAS FRUTILLAS NADA SABE ACERCA DE LAS UVAS.

PARACELSO

PARA MI MAMÁ
Y MI ABUELITA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR PERMITIRME CONCLUIR ESTE CICLO TAN IMPORTANTE EN MI VIDA, A TODA MI FAMILIA POR SU APOYO: LOS **MERLOS-QUINTERO** Y LOS **ARITZMENDI-HERNÁNDEZ**. A LA FAMILIA **ORDAZ-MARTÍNEZ**, EN ESPECIAL A **MAGDALENA ORDAZ MARTÍNEZ** Y **RICARDO MARTÍNEZ MOLINA**. PERO PRINCIPALMENTE A QUIENES CON SU CARIÑO, CONFIANZA Y APOYO INCONDICIONAL LOGRARON QUE LLEGARA A ESTE DÍA:

MI PAPÁ

MI ABUELITO LALO

MI TÍO SERGIO

AL **Dr. CARLOS R. SOSA AGUIRRE**, POR ACEPTARME COMO TESISISTA Y BRINDARME EL APOYO Y LAS HERRAMIENTAS NECESARIAS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, PERO PRINCIPALMENTE POR BRINDARME SU AMISTAD.

AL **M.C. ARIOSTO AGUILAR MANDUJANO** POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE PARTICIPAR EN EL "*Proyecto alternativo de la caña de azúcar, procesos y derivados*", DEL CUAL SURGIÓ LA PRESENTE TESIS Y DE LA CUAL ES CO-ASESOR.

AL **CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DEL ESTADO DE MICHOACÁN**, POR EL FINANCIAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y LA BECA OTORGADA.

A MIS REVISORES DE TESIS: **Dr. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES, QFB. ROSA MARÍA GARCÍA MARTÍNEZ** Y AL **QFB. JUAN CARLOS CARRILLO AMEZCUA** POR DARSE EL TIEMPO DE REVISAR Y ANALIZAR ESTE TRABAJO, POR SU APOYO Y SUS CONSEJOS.

AL **Dr. JUAN MANUEL SÁNCHEZ-YÁÑEZ** POR SU APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

A MIS CUATES: **ABRIL SANTOS, DIANA CONTRERAS, ISIS BRACHO, LORENA MARTÍNEZ, SALVADOR Y EMMANUEL OLIVARES** (GORDO Y HENRU), **HÉCTOR SAMANIEGO** (TABASCO), **SAMUEL ANGUIANO** (CHAM'S), **IVÁN CARDOSO** (CARNOSO), **ARMANDO MANDUJANO** (MACARIO), **ALEJANDRO SORIA** (CONEJO), **IVÁN NOVOA** (REYES), **EFRAÍN COLÍN, M. C. DAVID GARCÍA** Y **GERARDO RUIZ** (JERRY). GRACIAS POR BRINDARME SU AMISTAD Y APOYO.

A TODOS NO ME QUEDA MÁS QUE DECIRLES... ¡¡GRACIAS!!

INDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. BIOLOGÍA DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	3
1.1.1. Síntesis de la sacarosa.....	4
1.1.2. Regulación enzimática de la concentración de sacarosa.....	5
1.2. EDULCORANTES.....	6
1.2.1. Clasificación.....	6
1.3. COMPONENTES DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR.....	8
1.3.1. Azúcares.....	8
1.3.1.1. <u>Sacarosa</u>	8
1.3.1.2. <u>Glucosa (Dextrosa)</u>	9
1.3.1.3. <u>Fructosa (Levulosa)</u>	10
1.3.2. No azúcares.....	11
1.3.2.1. <u>Componentes minerales</u>	11
1.3.2.2. <u>Colorantes, precursores de color y otros componentes</u>	12
1.3.2.3. <u>Proteínas</u>	14
1.4. INVERSIÓN DE LA SACAROSA.....	15
1.4.1. pH y acidez natural del jugo de caña.....	16
1.5. LA ENZIMA INVERTASA.....	17
1.5.1. Aplicaciones de la invertasa.....	19
1.5.2. Inhibición de la actividad enzimática.....	19
1.6. PURIFICACIÓN DEL JUGO DE CAÑA.....	20
1.6.1. Tecnología de filtración por membranas.....	21
1.6.2. Tipos de filtración.....	22
1.6.3. Selectividad de los procesos de filtración.....	23
1.6.3.1. <u>Ósmosis Inversa (RO)</u>	23
1.6.3.2. <u>Nanofiltración (NF)</u>	23
1.6.3.3. <u>Ultrafiltración (UF)</u>	23
1.6.3.4. <u>Microfiltración (MF)</u>	24
1.6.4. Tipos de membranas.....	24
1.6.4.1. <u>Membranas poliméricas</u>	24
1.6.4.2. <u>Membranas inorgánicas minerales</u>	25
1.6.5. Intercambio iónico.....	26
1.6.5.1. <u>Uso del intercambio iónico en la industria azucarera</u>	26
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	29
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Medios de cultivo.....	30
5.2. Cepas bacterianas empleadas.....	30
5.3. Plásmidos empleados.....	30
5.4. Aislamiento del DNA plasmídico.....	31
5.5. Tratamiento enzimático del DNA.....	31
5.6. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	31
5.6.1. Preparación de células competentes.....	31
5.6.2. Transformación por choque térmico.....	32

5.7. Producción de la invertasa <i>Inu</i>	32
5.8. Cuantificación de Proteína Total.....	32
5.9. Caracterización de la enzima.....	33
5.10. Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-DNS.....	33
5.11. Procesamiento del jugo de caña de azúcar.....	33
5.12. Clarificación del jugo de caña.....	34
5.13. Desmineralización del jugo de caña.....	35
6. RESULTADOS	36
6.1. Expresión de la invertasa.....	36
6.2. Cuantificación de la proteína total.....	37
6.3. Caracterización de la invertasa.....	37
6.4. Purificación del jugo.....	40
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	43
9. ANEXOS	44
10. BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Página

CUADROS

Cuadro 1. Carbohidratos presentes en las diferentes partes de la caña de azúcar.....	4
Cuadro 2. Edulcorantes alternativos a la sacarosa.....	7
Cuadro 3. Composición de la caña de azúcar y de los sólidos del jugo crudo.....	8
Cuadro 4. Componentes minerales del jugo de caña.....	12
Cuadro 5. Colorantes, precursores del color y otros componentes de la caña y sus derivados.....	13
Cuadro 6. Ácidos fenólicos en el jugo de la caña determinados mediante HPLC.....	14
Cuadro 7. Aminoácidos del jugo crudo (J) y las melazas (M).....	14
Cuadro 8. Propiedades y condiciones de operación sugeridas para las resinas Dowex® 88 y 66.....	28

FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la glucosa, fructosa y sacarosa.....	11
Figura 2. Hidrólisis de la sacarosa.....	15
Figura 3. Estructura de la invertasa.....	17
Figura 4. Mecanismo de acción de la invertasa.....	18
Figura 5. Principio de la filtración por membranas.....	21
Figura 6. Selectividad de los procesos de filtración.....	24
Figura 7. Principio del intercambio iónico.....	27
Figura 8. Esquema del plásmido pTrcHis2 A.....	30
Figura 9. Membrana de microfiltración Vivaflow 200 de Vivascience®.....	34
Figura 10. Resinas de intercambio iónico Dowex®.....	35
Figura 11. Gel de agarosa del plásmido portador del inserto <i>Inu</i>	36
Figura 12. Gel de poliacrilamida de la invertasa.....	37
Figura 13. Efecto del pH en la actividad enzimática.....	47
Figura 14. Efecto del tiempo en la actividad enzimática.....	47
Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	48
Figura 16. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática.....	48
Figura 17. Purificación del jugo de caña de azúcar.....	49
Figura 18. Saturación de la resinas Dowex® 88 y Dowex® 66.....	50
Figura 19. Curva patrón de BSA.....	55
Figura 20. Curva patrón de Glucosa y Fructosa al 1 %.....	56

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue la expresión de una invertasa recombinante en *Escherichia coli* y su caracterización bioquímica (condiciones óptimas de operación y los parámetros cinéticos K_M y V_{max}) para la hidrólisis de sacarosa.

La enzima invertasa (EC 3.2.1.26), una *exo*- β -D-fructofuranosidasa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa produce una mezcla equimolar de glucosa y fructosa que se conoce como azúcar invertido. El gen *brfA* de la bacteria *Thermotoga maritima* codifica una invertasa cuya secuencia consta de 432 aminoácidos y tiene un peso molecular de 50 kDa, y pertenece a la familia GH32. Una característica interesante de esta invertasa es que no requiere de metales como cofactores. El gen *brfA* se amplificó mediante la técnica de PCR usando los oligonucleótidos TRC-BRF-F1 (5'CGA-TGA-GCT-CAT-GTT-CAA-GCC-GAA-TTA-TCA-C3') y TRC-BRF-R1 (5'GCT-AAG-ATC-TAG-TGT-TGG-TAT-ACA-AGA-G3'). El fragmento generado se subclonó en el plásmido pTrcHis2 A entre los sitios de restricción BamH I y Hind III. El plásmido resultante pTrcHis2AInu se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 y expresar la enzima invertasa. La concentración de invertasa obtenida de la purificación del extracto celular purificado fue de 223.173 $\mu\text{g/mL}$.

La concentración de azúcares reductores se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. El ensayo enzimático fue efectuado en sacarosa comercial y jugo de caña de azúcar crudo y desmineralizado. El ensayo en jugo de caña crudo mostró una disminución en la hidrólisis debido al efecto inhibitorio de algunos compuestos presentes en el sustrato. La invertasa mostró un notable incremento en su actividad en el jugo desmineralizado.

Palabras clave: *sacarosa, hidrólisis, invertasa, azúcar invertido, inhibidores.*

1. INTRODUCCIÓN

Sin duda alguna, una de las áreas donde mayor impacto ha tenido la Biotecnología, no sólo desde un punto de vista tecnológico sino económico y social también, es la de los edulcorantes. A partir de los años 60s se han venido implementado procesos industriales, para la elaboración de edulcorantes calóricos y no calóricos, que han modificado la estructura de este mercado [1].

Hasta 1976, la sacarosa extraída de la remolacha y de la caña de azúcar era el principal edulcorante a nivel mundial. La producción de jarabes de maíz de alta fructosa (JMAF), como un sustituto del azúcar de caña mediante el uso de la enzima glucosa isomerasa (GI) fue desarrollado por primera vez en Japón en 1957. La GI ganó importancia comercial en los Estados Unidos de América, debido a la falta de suministro de azúcar después de la Revolución Cubana en 1958, y continúa siendo una de las enzimas de mayor importancia industrial hoy en día [2].

Esta situación ha traído graves consecuencias a los países para los cuales las exportaciones de azúcar de caña constituyen una importante fuente de divisas y ha sido un factor determinante en las fluctuaciones del precio internacional del azúcar de caña. La producción de azúcar es uno de los factores más importantes en la economía agrícola de México. De todas las industrias derivadas del campo, la industria azucarera, que combina características y problemas agrícolas e industriales, presenta las mayores dificultades para sostener una producción económica equilibrada, y es a la vez de gran importancia alcanzar la mayor estabilidad posible en la producción, por las grandes inversiones en capital fijo que se requieren para transformar la caña de azúcar en productos comerciales. A nivel mundial, el mercado del azúcar de caña está sujeto a las mayores protecciones económicas por parte de los gobiernos [3].

En la definición contemporánea de estrategias de desarrollo agroindustrial, no puede dejarse a un lado el avance de la Biotecnología y el caso de los edulcorantes es el mejor para demostrar la necesidad de buscar su diversificación. Un ejemplo es la industria azucarera brasileña, aunque su producción es la más grande a nivel mundial, debido a la baja cotización del azúcar en el mercado mundial ha intensificado la investigación acerca de los métodos para la producción de azúcar invertido [4].

1.1. BIOLOGÍA DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar es una planta tropical y subtropical cultivada en una franja alrededor del Ecuador que llega a los 30° latitud sur y norte; Linneo la clasificó en 1753 [5] como *Saccharum officinarum* L., que fue la primer especie del género que se cultivó comercialmente. Después de esa clasificación ha habido otras que han tomado en cuenta aspectos morfológicos y anatómicos, y en fechas recientes bioquímicos, citológicos y citogenéticos. Una clasificación aceptable es la propuesta por Botta en 1978 [5-6]:

Reino: Plantae
División: Tracheophyta
Sección: Fanerogamae
Clase: Monocotyledonae
Orden: Poale
Familia: Gramineae
Tribu: Andropogonoidea
Género: *Saccharum*
Especie: *Saccharum officinarum* L.

El tallo de la caña de azúcar llega a medir de 2.0 a 4.0 m de altura, con un diámetro en la parte baja de 25.0 a 35.0 mm; en su base se acumula la mayor cantidad de sacarosa y en la parte superior se concentran los azúcares reductores y celulosa. En el corte transversal de un entrenudo (canuto) se observan, desde la periferia hacia el centro, la epidermis, cáscara o corteza, haces fibrovasculares y el tejido parenquimatoso. La epidermis es una capa fina que protege y recubre al tallo, contiene ceras y taninos; sus células son alargadas y rectangulares, alternándose con células cortas. La corteza se compone de fibras agrupadas en capas concéntricas lignificadas cuyas características principales son el ancho de la pared celular, longitud y rigidez. Los haces fibrovasculares se encuentran inmersos en el tejido parenquimatoso, el cual se compone de células de paredes delgadas que aumentan de tamaño hacia el centro del entrenudo, alcanzando hasta 40.0 μm [7].

Las variedades comerciales de caña de azúcar son híbridos interespecíficos, principalmente de *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L. y *S. robustum* [8-9]. La concentración de sacarosa en el jugo del tallo es mayor del 21 % en *S. officinarum*, menor del 6 % en *S. spontaneum* y 10 % en *S. robustum* [8]. Estas diferencias se han correlacionado con factores morfológicos, enzimáticos, ambientales, disponibilidad de agua y enfermedades. Los tallos de las variedades con alta concentración de sacarosa tienen mayor contenido de humedad y menos fibra que aquellos que presentan menor concentración de sacarosa (Cuadro 1) [8].

Cuadro 1. Carbohidratos presentes en las diferentes partes de la caña de azúcar [10]

Parte	Porción del total (%)	Extracción del jugo (%)	Análisis del jugo de caña crudo ^a (mg/ml)				
			Almidón	Polisacáridos solubles	Sacarosa	Fructosa	Glucosa
Lámina foliar	11.1	40.0	0.32	5.40	7.72	3.75	6.76
Vaina de la hoja	4.3	38.6	0.05	4.03	14.20	3.33	5.92
Envoltura foliar	2.0	48.2	0.09	5.58	6.85	7.56	13.60
Punta del tallo	1.6	47.6	0.08	5.90	14.82	12.94	17.52
Caña triturable							
Primeros 60 cm	14.0	69.3	0.07	1.81	130.46	6.88	9.84
Segundos 60 cm	14.8	71.3	0.06	1.45	154.88	5.38	6.08
Terceros 60 cm	17.8	73.6	0.04	1.47	181.85	3.63	4.04
Cuartos 60 cm	19.5	71.1	0.03	1.30	185.10	3.06	2.80
Cepa	9.3	65.3	0.07	2.01	152.50	3.01	5.94
Raíces ^b	1.3	27.2	0.00	1.28	8.76	1.25	2.50
Hojas muertas	4.3	37.1	0.00	5.42	0.00	0.00	0.00

^a El almidón se determinó mediante el método del yodo; los polisacáridos solubles se midieron como las sustancias insolubles en alcohol que reaccionan con el ácido fenolsulfúrico, y los azúcares se separaron y midieron mediante la cromatografía líquida de alta presión.

^b No se utilizó todo el sistema radicular, sólo se analizó la parte adherida a la cepa arrancada del suelo.

1.1.1. Síntesis de la sacarosa

En las plantas, los carbohidratos se forman por un proceso fotosintético de asimilación. Este proceso es catalizado mediante la clorofila. El CO₂ tomado del aire es equivalente al O₂ dado al aire. La energía necesaria por molécula de O₂ formado, corresponde por lo menos al 75 % de la luz anaranjada absorbida por la clorofila; sin embargo, Warburg encontró que únicamente se toma un cuanto por cada molécula de O₂ formado, mientras que la energía restante necesaria para la síntesis, es tomada del proceso químico de reoxidación. En primer

lugar se forman los ácidos fosfoglicéricos, fosfatos triosos y fosfatos hexosos, y la sacarosa es el primer carbohidrato libre en la planta, formada anteriormente a la glucosa y fructosa libres. Esta formación ocurre en las partes verdes de la planta, pero la sacarosa se encuentra también en los tallos, en las raíces y en los frutos. La sacarosa es el más abundante de los carbohidratos presentes en la savia de las plantas. En la savia de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, etc.) se encuentra más de 17 % de sacarosa, lo mismo que en la savia de la remolacha (*Beta vulgaris*) [11].

1.1.2. Regulación enzimática de la concentración de sacarosa

La invertasa es una enzima clave en el metabolismo de carbohidratos en plantas [12]. La invertasa regula la acumulación de sacarosa en el tallo de la caña de azúcar [8]. La actividad de la invertasa se encuentra en función de la edad del entrenudo y del genotipo, aumentando en los entrenudos jóvenes [8]. Esta característica genética puede disminuirse mediante la selección de variedades [8,10] y mediante la regulación de la expresión de la invertasa.

1.2. EDULCORANTES

El Codex Alimentarius define a los edulcorantes como *sustancias diferentes del azúcar que confieren a un alimento un sabor dulce* [13-14].

Los carbohidratos representan la forma más común y conocida de los edulcorantes. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; en frutas, vegetales, miel y leche. Aparecen igualmente en moléculas orgánicas simples y complejas como el DNA, RNA, y las glucoproteínas. La glucosa o *dextrosa* es la principal forma a la cual otros azúcares son transformados en el cuerpo, por lo que es el principal carbohidrato encontrado en la sangre. La glucosa está presente en numerosos frutos y es la unidad base del almidón, el glucógeno y la celulosa. La fructosa o *levulosa* es el más dulce de todos los carbohidratos, encontrándose principalmente en frutas y miel. Por ejemplo, las manzanas contienen 4 % de su peso de sacarosa, 6 % de fructosa y 1 % de glucosa. La sacarosa o azúcar de mesa es el carbohidrato más conocido en la industria y el hogar. Se trata de un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, extraído de la caña de azúcar y de la remolacha. La melaza, el piloncillo y el "azúcar morena" sólo representan diversas presentaciones de la sacarosa o subproductos de su procesamiento. La lactosa es otro disacárido compuesto de glucosa y galactosa, encontrado en la leche. Existen algunas aplicaciones industriales de este azúcar, pero dado su reducido poder edulcorante (un 40 % del correspondiente a la sacarosa), no es utilizado como tal. Así también, el suero de leche a través de un proceso enzimático se emplea para la producción de edulcorantes. Estos son los principales carbohidratos, algunos ampliamente utilizados como edulcorantes, sin embargo, existen muchos otros que no son carbohidratos, como son algunas proteínas y alcoholes [1].

1.2.1. Clasificación

En general se ubica a los edulcorantes en dos clasificaciones: 1) En función de su origen: *naturales o nutritivos y artificiales o no nutritivos* y 2) En función de su aporte energético: *calóricos y no calóricos* [1, 13-15].

Otra clasificación es en términos de requerimientos de insulina: 1) insulina-dependientes (sacarosa, glucosa, lactosa, jarabes fructosados...) y 2) sin requerimientos de insulina (sorbitol, manitol, xilitol, maltitol...) [1].

Dado el aporte de la Biotecnología en este sector, es necesario distinguir los edulcorantes en función de su origen [1]:

- **Naturales:** simplemente extraídos de una materia prima.
- **Químicos:** obtenidos mediante un proceso de síntesis química.
- **Biotecnológicos:** obtenidos mediante un proceso enzimático o fermentativo.

Cuadro 2. Edulcorantes alternativos a la sacarosa [1]

<i>Producto</i>	<i>Poder edulcorante (Sacarosa = 1)</i>	<i>Origen</i>
<i>a. Edulcorantes calóricos</i>		
Azúcar invertido	1	Q, E
Fructosa	1.4	E
Jarabes fructosados (55%)	1	E
Jarabes fructosados (90%)	1.5	E
Jarabes maltosados (45-60%)	0.4	E
Jarabes maltosados (70-85%)	0.6	E
Sorbitol	0.6	Q
Manitol	0.5	Q
Xilitol	1	Q, E
Isomaltulosa	0.4	E
Palatinita	0.5	EQ
Jarabes de suero de leche	0.85	E
Neozúcares	varios	E
<i>b. Edulcorantes no calóricos</i>		
Aspartame	180	QFE, FE
Alitamo	2160	QE, E
L-azúcares	1	Q
Acesulfame de potasio	200	Q
Sacarina	300	Q
Sucralosa	600	QE
Ciclamatos	30	Q
Dihidrochalconas	1800	Q
Maltitol*	0.9	EQ
Isomaltitol	0.9	EQ
Monelina (proteína)	2500	N
Taumatina (proteína)	3000	N, F
Esteviosido	300	N
Filodulcina	700	N
Glicirrizina	50	N
Lao Han Kuo (mogrosido)	400	N
Osladina	3000	N
Dulcina	200	Q
Perillartina	2000	N, Q
Miraculina (proteína)	1500	N
6-metil-6-cloro D-triptofano	1300	Q
Hernandulcina	1000	N

N= natural, Q=sintético vía química, E= enzimático, F= fermentativo o combinaciones de estos.

*Absorbido en 50%

1.3. COMPONENTES DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR

Los componentes del jugo de caña de azúcar se pueden dividir de manera general en dos grupos para su estudio: a) Azúcares y b) No azúcares (Cuadro 3) [10-11].

Cuadro 3. Composición de la caña de azúcar y de los sólidos del jugo de caña crudo [10]

Caña triturada	Caña (%)
Agua	73-76
Sólidos	24-27
Sólidos solubles	10-16
Fibra (seca)	11-16
Componentes del jugo crudo	Sólidos solubles (%)
Azúcares	75-92
Sacarosa	70-88
Glucosa	2-4
Fructosa	2-4
No azúcares	
Sales	3.0-4.5
Ácidos inorgánicos	1.5-4.5
Ácidos orgánicos	1.0-3.0
Ácidos orgánicos	1.5-5.5
Ácidos carboxílicos	1.1-3.0
Aminoácidos	0.5-2.5
Otros no azúcares orgánicos	
Proteínas	0.5-0.6
Almidón	0.001-0.050
Gomas	0.30-0.60
Ceras, grasas, fosfátidos	0.05-0.15
Otros	3.0-5.0

1.3.1. Azúcares

1.3.1.1. Sacarosa

La sacarosa se encuentra en todas las partes de la planta de la caña de azúcar, pero abunda más en los tallos, donde se encuentra en las vacuolas de almacenamiento de la célula (parénquima). La sacarosa es menos abundante en las regiones que se encuentran en crecimiento activo, especialmente las porciones blandas del extremo del tallo y las hojas enrolladas [8, 10]. Los monosacáridos glucosa (dextrosa) y fructosa (levulosa), se condensan para formar sacarosa y agua (Figura 1). Por lo tanto, la sacarosa tiene la fórmula empírica $C_{12}H_{22}O_{11}$ y un peso molecular de 342.3. Los cristales de sacarosa son prismas monocíclicos que tienen una

densidad de 1.588 g/cm³; una solución al 26 % (p/p) tiene una densidad de 1.18175 g/cm³ a 20° C. La sacarosa es ópticamente activa con la rotación específica $[\alpha]^{20} + 66.53^\circ$. Su punto de fusión es de 188° C y se descompone al fundirse. El índice de refracción es de 1.3740 para una solución al 26 % (p/p). La sacarosa es soluble tanto en agua como en etanol; las soluciones saturadas a 20° C contienen 67.09 % y 0.9 % por peso, respectivamente. Es ligeramente soluble en metanol e insoluble en éter o cloroformo. Cuando se hidroliza, ya sea mediante un ácido o una invertasa, la sacarosa produce cantidades equimolares de glucosa y fructosa y la mezcla se conoce como azúcar invertido. Sin embargo, estos azúcares no se presentan en cantidades iguales en el jugo crudo. A pesar de que la sacarosa es dextrógira, y esta característica se utiliza para medir la concentración de sacarosa en solución, la rotación específica del azúcar invertido es $[\alpha]^{20} - 39.7^\circ$ debido a que la actividad levógira de la fructosa es mayor que la actividad dextrógira de la glucosa [10].

1.3.1.2. Glucosa (Dextrosa)

La glucosa es el azúcar más importante en el metabolismo de plantas y animales. Tan sólo en la porción en crecimiento activo de la planta el contenido de glucosa excede el de la sacarosa. Al comienzo de la zafra el contenido de glucosa del jugo crudo es alto y disminuye con la madurez. A pesar de que cantidades equimolares de glucosa y fructosa están implicadas en la hidrólisis y condensación de la sacarosa, la relación dextrosa-levulosa (D/L) pocas veces es igual a la del jugo crudo [10]. La fórmula empírica de la glucosa es C₆H₁₂O₆ y su peso molecular es 180.2. Los cristales anhidros de glucosa son rómbicos, funden a 146° C y tienen una densidad de 1.544 g/cm³; una solución al 26 % (p/p) tiene una densidad de 1.10643 g/cm³. El monohidrato de glucosa (C₆H₁₂O₆ · H₂O) produce un cristal monocíclico esfenoidal, un extremo del cual se disuelve con mucha mayor rapidez que el otro, se funde a 83° C. La glucosa es menos soluble en agua que la sacarosa; aún a 30° C, una solución saturada contiene sólo un 57.6 % por peso. Es soluble en etanol e insoluble en éter. Las moléculas de glucosa se condensan de diferentes maneras para formar almidón, dextranas y celulosa. La glucosa se presenta en solución en 3 formas y todas pueden aparecer simultáneamente (Figura 1). La forma de cadena presenta el grupo aldehído libre y reduce una solución alcalina de sales cúpricas, dando positiva la prueba para los azúcares reductores. La forma anillada existe en las configuraciones α y β , que en solución están en equilibrio. Las soluciones de glucosa muestran

mutarrotación, lo que quiere decir que la rotación específica cambia cuando la solución queda en reposo durante algún tiempo. Una solución recién preparada de α -D-glucosa tiene una rotación específica de $[\alpha]^{20}+112.2^\circ$ mientras que la de la β -D-glucosa es de $[\alpha]^{20}+18.7^\circ$. Debido a que las formas α y β son interconvertibles, dichas soluciones tienen una rotación específica de $[\alpha]^{20}+52.7^\circ$ cuando alcanzan el equilibrio. Es usual efectuar la determinación de la glucosa mediante diversos métodos basados en las reacciones reductoras de su grupo aldehído. Si se desean realizar determinaciones más específicas de la glucosa mezclada con otros azúcares, se utilizan técnicas basadas en la cromatografía líquida o en métodos enzimáticos [10].

1.3.1.3. Fructosa (Levulosa)

Llamada también azúcar de frutas, la fructosa es más dulce que la sacarosa y la glucosa; de estos tres es la menos abundante en la caña. A semejanza de la glucosa, es más abundante en las partes en crecimiento de la planta y menos abundante en la parte inferior del tallo y las raíces. La fructosa disminuye con la maduración y puede ser imposible de detectar en algunas variedades en la madurez. Las moléculas de fructosa se polimerizan para formar leván e inulina. La fórmula empírica de la fructosa es la misma que la de la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y el peso molecular es de 180.2. Los cristales ortorrómbicos de fructosa tienen una densidad de 1.598 g/cm^3 y una solución al 26 % (p/p) tiene una densidad de 1.1088 g/cm^3 . Los cristales funden a 105° C . La fructosa es muy soluble en agua y ligeramente en etanol; una solución saturada en agua a 20° C contiene 78.94 % por peso. Al igual que la glucosa, es un azúcar reductor, pero posee un grupo cetona (Figura 1). Además, se presenta en las formas α y β , pero también se encuentra en forma de anillos tanto de 5 como de 6 miembros (furanosa y piranosa). En la forma sólida existe principalmente como piranosa, pero en solución se establece el equilibrio entre los 4 tipos. La rotación específica inicial de $[\alpha]^{20}-132.2^\circ$ cambia a $[\alpha]^{20}-92.4^\circ$ en el equilibrio. Los métodos de detección de la fructosa en las mezclas son similares a los de la glucosa [10]. La fructosa es uno de los componentes del azúcar invertido y de los JMAF. Los tres tipos de JMAF que se producen comercialmente contienen 42 %, 55 % y 90 % de fructosa. El uso de los jarabes actualmente disponibles (42 % y 55 %) para la producción de fructosa pura, requiere una reducción substancial en su contenido de glucosa. Considerando que la glucosa y la fructosa son isómeros, su separación es relativamente difícil.

Los métodos industriales existentes emplean costosas técnicas cromatográficas para producir JMAF-90 a partir de JMAF-42 [16-19]. En cuanto a dulzura, los JMAF-55 tienen el mismo poder edulcorante que la sacarosa, mientras que los JMAF-90 son entre un 20-60 % más dulces que ésta [17-18].

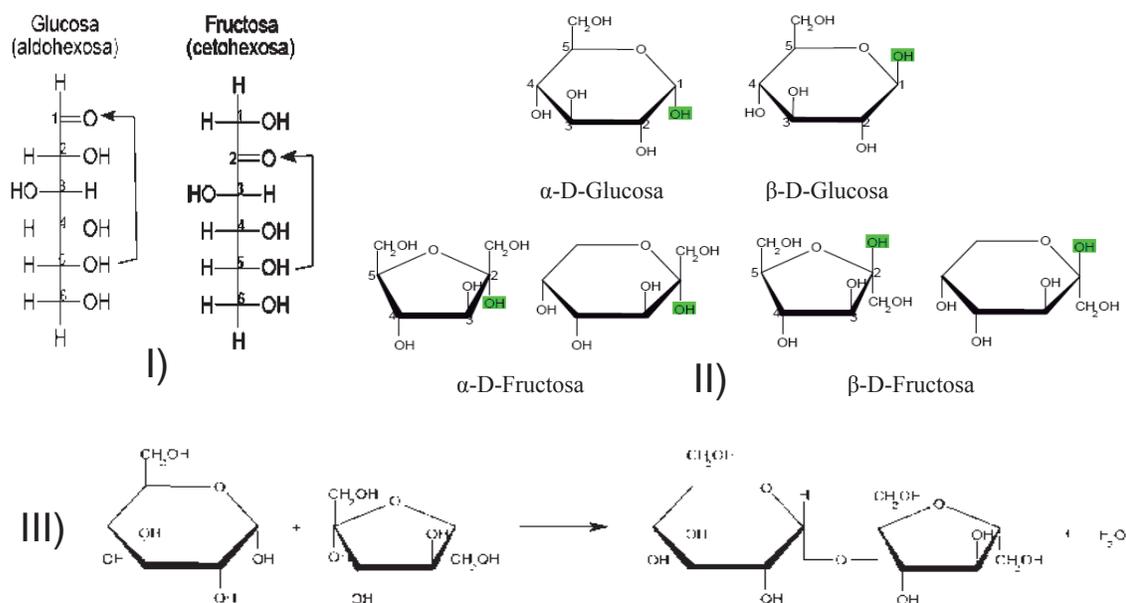


Figura 1. Estructura química de la glucosa, fructosa y sacarosa; I) *Forma lineal o de cadena*. Presenta el grupo aldehído libre de la glucosa en C1 y el grupo cetona de la fructosa en C2. La flecha indica los carbonos que se unen para la ciclización de la cadena; II) *Forma anillada*. La glucosa en solución cuando alcanza el equilibrio existe en las configuraciones α y β . Nótese que el radical $-OH$ del C1 es el que determina la configuración. La fructosa se presenta en las formas α y β y se encuentra en forma de anillos tanto de 5 como de 6 miembros (furanosa y piranosa). En la forma sólida existe principalmente como piranosa, pero en solución se establece el equilibrio entre los 4 tipos. III) *Síntesis de la sacarosa*. La condensación de los monómeros glucosa y fructosa mediante el enlace covalente en la posición β -(2 \rightarrow 1) da como producto la sacarosa.

1.3.2. No azúcares

1.3.2.1. Componentes minerales

Los componentes inorgánicos de la caña de azúcar incluyen: agua, iones, sales, constituyentes de moléculas orgánicas complejas, o compuestos insolubles. A pesar de que algunos minerales como el Si^{4+} se presentan bajo la forma de sólidos semejantes al ópalo, los constituyentes inorgánicos de mayor interés son los que se encuentran disueltos en el jugo crudo (Cuadro 4). Los fosfatos, el Si^{4+} y el Mg^{2+} se eliminan parcialmente por medio de la clarificación. No obstante, el K^+ , los cloruros, el Na^+ y las bajas concentraciones de sulfatos no son removidos, y tienden a concentrarse con el procesamiento. El K^+ es el mineral más abundante en el jugo

crudo (hasta un 60 % de la ceniza); es más abundante en las partes más jóvenes de la planta, y disminuye en las partes más viejas del tallo. El contenido mineral de la caña varía de acuerdo a las variedades y los tipos de suelos [10].

Cuadro 4. Componentes minerales del jugo de caña de azúcar [10]

Componente	Concentración (% de sólidos)	
	Jugo sin refinar	Clarificado
Potasio (K ₂ O)	0.4-1.4	0.3-1.0
Sodio (Na ₂ O)	0.03-0.10	0.03-0.09
Sulfato (SO ₃)	0.11-0.52	0.16-0.44
Cloruro (Cl)	0.10-0.29	0.10-0.26
Calcio (CaO)	0.17-0.32	0.27-0.55
Magnesio (MgO)	0.20-0.33	0.20-0.40
Silicio (SiO ₂)	0.06-0.71	0.07-0.33
Fosfato (P ₂ O ₅)	0.01-0.40	0.02-0.08
Hierro (Fe ₂ O ₃)	0.06-0.14	0.01-0.03
Ceniza sulfatada	3.6-4.4	2.8-3.9
Ceniza determinada por conductividad	3.4-4.4	3.7-4.5

1.3.2.2. Colorantes, precursores de color y otros componentes

En las partes verdes de la caña, están presentes los pigmentos verdes y amarillos de las plantas: las clorofilas A y B, los carotenos y las xantofilas. La mayor parte de dichos pigmentos son destruidos o separados durante la clarificación y la ebullición [10]. En la literatura han sido descritos numerosos compuestos orgánicos incoloros que se encuentran en la caña (Cuadros 6 y 7), los que, por subsecuente reacción o combinación con otras sustancias, forman compuestos coloreados. Probablemente los compuestos más significativos pueden clasificarse en cuatro grupos generales [10-11]:

(1) *Compuestos derivados de la planta.* Los compuestos fenólicos (taninos), polifenólicos (sacaretina) y flavonoides (antocianinas) son los principales contribuyentes al color del azúcar. Muchos de ellos presentan colores que varían del amarillo al café y existen en la planta como compuestos incoloros que son oxidados a un estado coloreado en el guarapo, ya sea por acción enzimática (oxidasa, peroxidasa y tirosinasa) u oxidación química (presencia de hierro y oxígeno). En los azúcares se hallan cantidades apenas detectables (expresadas en partes por millón [ppm]) de algunos pigmentos del tipo de la antocianina, aunque estos compuestos rojo, púrpura o café, contribuyen poco al color del azúcar.

(2) *Compuestos del caramelo*. Estos compuestos se forman por la descomposición de la sacarosa y del azúcar invertido por la acción del calor. Por el calentamiento de la sacarosa se obtienen varios productos volátiles, tales como monóxido y dióxido de carbono, ácido fórmico, aldehído, acetona, furfural, etc.; de la glucosa se forman de igual manera productos de destilación semejantes a los precedentes, siendo el color castaño el residuo de la caramelización.

(3) *Compuestos del tipo de la melanoidina*. Formados por reacción de los azúcares principalmente reductores con compuestos aminados, suministran el color oscuro y café, y a menudo proceden de compuestos con un peso molecular elevado. Esta reacción se conoce con el nombre de Maillard. En dicha reacción influyen la temperatura, humedad, pH y tiempo. Además, cuando se calienta el azúcar a un pH ácido se forma hidroximetil furfural (HMF), que es incoloro, pero que se descompone rápidamente para formar un compuesto polimérico de color oscuro.

(4) *Degradación de la fructosa*. Tiene lugar en condiciones básicas y por encima del punto de ebullición de ésta, como las existentes en las refinerías, formando una masa amorfa de color amarillo.

Cuadro 5. Colorantes, precursores del color y otros componentes de la caña de azúcar y sus derivados presentes en cantidades traza [10]

Ácido acético	Ácido málico	Hidroxibenzaldehído
Ácido aconítico	Ácido mesacónico	Hidroximetilfurfural
Ácido cafeico	Ácido oleico	Isomaltol
Ácido clorogénico	Ácido oxálico	Kaempferol
Ácido cítrico	Ácido palmítico	Maltol
Ácido p-cumárico	Ácido propiónico	Rutina
Á. 2,3dihidroxibenzoico	Ácido quínico	Umbeliferona
Á. 3,4-dihidroxibenzoico	Acetol	Vainillina
Ácido ferúlico	Butirolactona	Ácido salicílico
Ácido fumárico	Coniferina	Ácido shikímico
Ácido gentísico	Cumarina	Ácido sinápico
Ácido glicólico	Dihidroxibenzaldehído	Ácido succínico
Ácido p-hidroxibenzoico	Dimetoximetano	Ácido siríngico
Ácido isobutírico	Dimetilformamida	Ácido vainílico
Ácido láctico	Esculina	
Ácido levulínico	Alcohol furfurílico	

Cuadro 6. Ácidos fenólicos en el jugo y azúcares de la caña, determinados mediante HPLC [10]

Ácidos fenólicos	Jugo (ppm)	Azúcar crudo (ppm)	Azúcar refinado (ppm)
Ácido cafeico	15.0	2.0-15.0	Trazas-0.1
3,4-Dihidroxibenzaldehído	0.8	Trazas-2.5	Trazas-0.6
Ácido p-cumárico	0.6	2.6-15.0	Trazas-0.1
Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	60	1.0-12.0	0.8-2.0
Ácido 2,3- Dihidroxibenzoico	0.1	0.1-0.2	Trazas
Ácido ferúlico	0.3	Trazas-0.2	Trazas-0.2
Ácido p-hidroxibenzoico	0.2	2.0-6.0	0.5-2.0
Ácido vainílico	0.3	3.0-6.4	0.2-0.3

1.3.2.3. Proteínas

Los aminoácidos libres se acumulan en las melazas y contribuyen a la pérdida de sacarosa, pero cuando se enlazan para formar proteínas éstas resultan benéficas. La proteína que se encuentra en el jugo crudo, a pesar de estar presente en pequeñas cantidades, se coagula por el calor y la cal y ayuda a la clarificación. Los jugos crudos contienen más proteína que el jugo de la desmenuzadora debido a que ésta rompe las vacuolas de las células, ricas en azúcar. Las primeras estimaciones de la proteína en la caña eran elevadas; las determinaciones subsiguientes, utilizando proteína dializada demostraron que los sólidos secos del jugo contenían sólo un 0.49 % de proteína (Cuadro 5) [10].

Cuadro 7. Aminoácidos del jugo crudo (J) y las melazas (M) [10]

Aminoácidos	Sólidos secos (%)	
	Libres	Proteínas
Aspártico (J)	0.11	0.06
Glutámico (J)	0.05	0.08
Alanina (J)	0.06	0.05
Valina (J)	0.03	0.04
Treonina (J)	0.02	0.04
Isoleucina (J)	0.01	0.03
Glicina (J)	0.01	0.04
Leucina (J)	Trazas	0.05
Lisina (J)	Trazas	0.04
Serina (J)	Trazas	0.03
Arginina (J)	Trazas	0.02
Fenilalanina (J)	Trazas	0.02
Tirosina (J, M)	Trazas	0.02
Histidina (J)	Trazas	0.01
Prolina (J)	Trazas	0.01
Hidroxiprolina (M)	Trazas	---
Metionina (J, M)	Trazas	---
Triptófano (J)	Trazas	---
Total de proteínas	---	0.49

1.4. INVERSIÓN DE LA SACAROSA

En sentido químico, *inversión* quiere decir el cambio de la actividad óptica dextrógira a levógira, o viceversa. El término se ha utilizado para describir el cambio en la rotación específica como resultado de la hidrólisis ácida de una solución de sacarosa y en el que la pronunciada rotación dextrógira de la sacarosa se invierte a la rotación levógira de la mezcla equimolar resultante glucosa y fructosa. El término *inversión* se usa ampliamente, aunque en forma errónea, refiriéndose a la reducción del contenido de sacarosa de la caña que tiene lugar después de la recolección, la quema o las heladas [10].

El uso de la inversión en la tecnología del azúcar ha ampliado su significado; es decir, la hidrólisis ácida y enzimática se han identificado como las vías química y bioquímica respectivamente para producir azúcar invertido (Figura 3) [4,10].

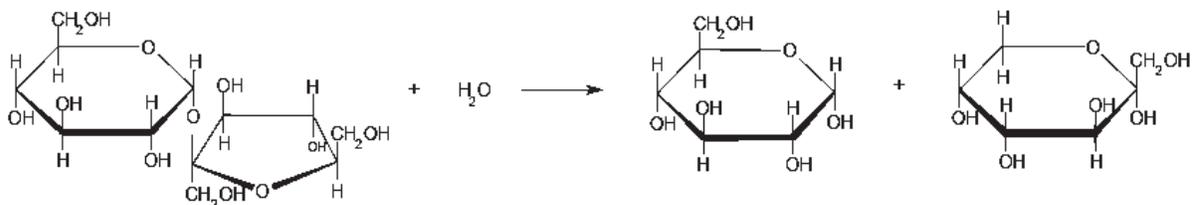


Figura 2. Hidrólisis de la sacarosa

El procedimiento más antiguo y mejor conocido para producir azúcar invertido es la utilización de la hidrólisis ácida. El ácido más utilizado para este procedimiento es el ácido sulfúrico (H_2SO_4); en general la hidrólisis generada mediante este ácido puede clasificarse como hidrólisis ácida diluida o hidrólisis ácida concentrada [20]. Los procedimientos ácidos diluidos suponen en general la utilización de ácido sulfúrico del 0.5 al 15 % a temperaturas entre 75-80° C [20-21]. Los jarabes obtenidos mediante hidrólisis ácida son altamente coloridos debido a las condiciones extremas de la reacción (pH y temperatura) [22]. A altas temperaturas, los azúcares se degradan para formar furfural y otros subproductos indeseables [20-21]. La hidrólisis ácida se reduce al mínimo por la adición de cal ($Ca(OH)_2$) a fin de mantener el pH a un valor de 7 o ligeramente mayor [10].

Por otra parte, los procesos enzimáticos producen menos desechos tóxicos, baja formación de subproductos y ahorro energético en comparación con los procesos químicos

tradicionales [21]. La hidrólisis catalizada mediante la enzima invertasa genera un producto de buena calidad con bajo contenido de cenizas, color y de HMF [23]. Claramente la hidrólisis enzimática presenta mayores ventajas que la hidrólisis ácida, además de que el proceso enzimático puede ser reutilizable mediante la inmovilización de la enzima reduciendo los costos de producción y logrando que el proceso sea continuo [21].

1.4.1. pH y Acidez natural del jugo de caña

La concentración del ión H^+ (pH) en el jugo de una planta madura de caña de azúcar varía entre 4.73 y 5.63, pero el valor corriente oscila entre 5.2 y 5.4. Realizando mediciones precisas y analizando numerosas muestras, se pueden establecer pequeñas diferencias entre las diferentes variedades de caña y áreas de procedencia. Para que la diferencia sea significativa cuando se utilizan pocas muestras, son necesarios grandes cambios en los valores de pH. Los valores de la acidez titulable varían con mayor amplitud que los del pH y se utilizan comúnmente como indicadores de calidad [10].

1.5. LA ENZIMA INVERTASA

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias, hongos y plantas [24]. La invertasa es una β -D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), que cataliza la hidrólisis de la sacarosa produciendo una mezcla equimolar de glucosa y fructosa [4, 25].

El gen *brfA* de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* MSB8 codifica un polipéptido de 432 residuos y un peso molecular de aproximadamente 50 kDa (Figura 3). De acuerdo a las bases de su estructura primaria, la enzima fue designada dentro de la familia GH32 [26]. En 1954 Koshland y Stein demostraron que la invertasa es una β -fructofuranosidasa llevando a cabo la reacción en agua con ^{18}O marcado y determinando el contenido de ^{18}O en el producto [25].

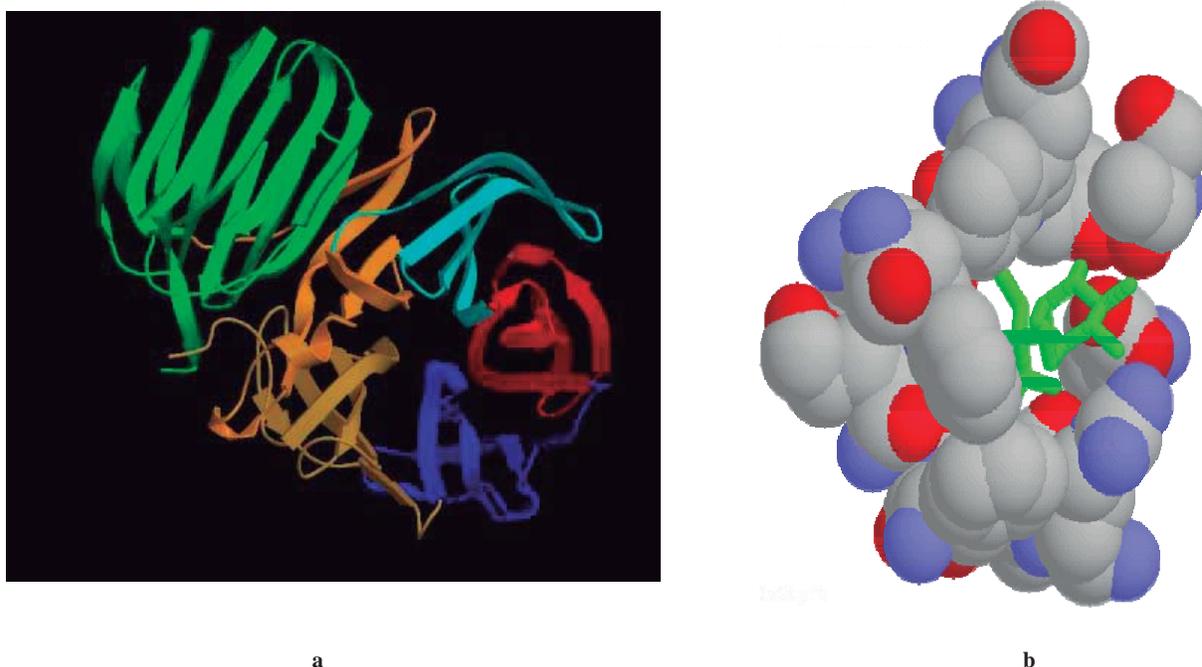


Figura 3. Estructura de la invertasa. a) Estructura trimidimensional de la invertasa. b) Sitio activo de la invertasa [25,27]

Existen dos tipos de enzimas que hidrolizan la sacarosa: (i) las típicas invertasas, que son β -fructosidasas (β -D-fructofuranosil fructohidrolasa, EC 3.2.1.26) y (ii) ciertas α -1,4-glucosidasas (α -D-glucosil glucohidrolasa, EC 3.2.1.20) y oligo- α -1,6-glucosidasas (EC 3.2.1.10) con una alta especificidad por el sustrato [26].

En 1998 Liebl *et al.*, estudió la enzima codificada por el gen *brfA* y obtuvo eficiencias catalíticas similares para la hidrólisis de la sacarosa y la inulina con valores para k_{cat}/K_m (@ 75 °C, pH=5.5) de aproximadamente $4.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Aparentemente la enzima no requiere metales como cofactores para su actividad. Un análisis por medio de cromatografía de capa fina (TLC), demostró que la enzima libera fructosa únicamente a partir de la sacarosa, rafinosa, inulina y levan. Los sustratos tienen en común la molécula de fructosa unida en la posición β -(2→1) o β -(2→6) del enlace glucosídico (Figura 4) [26].

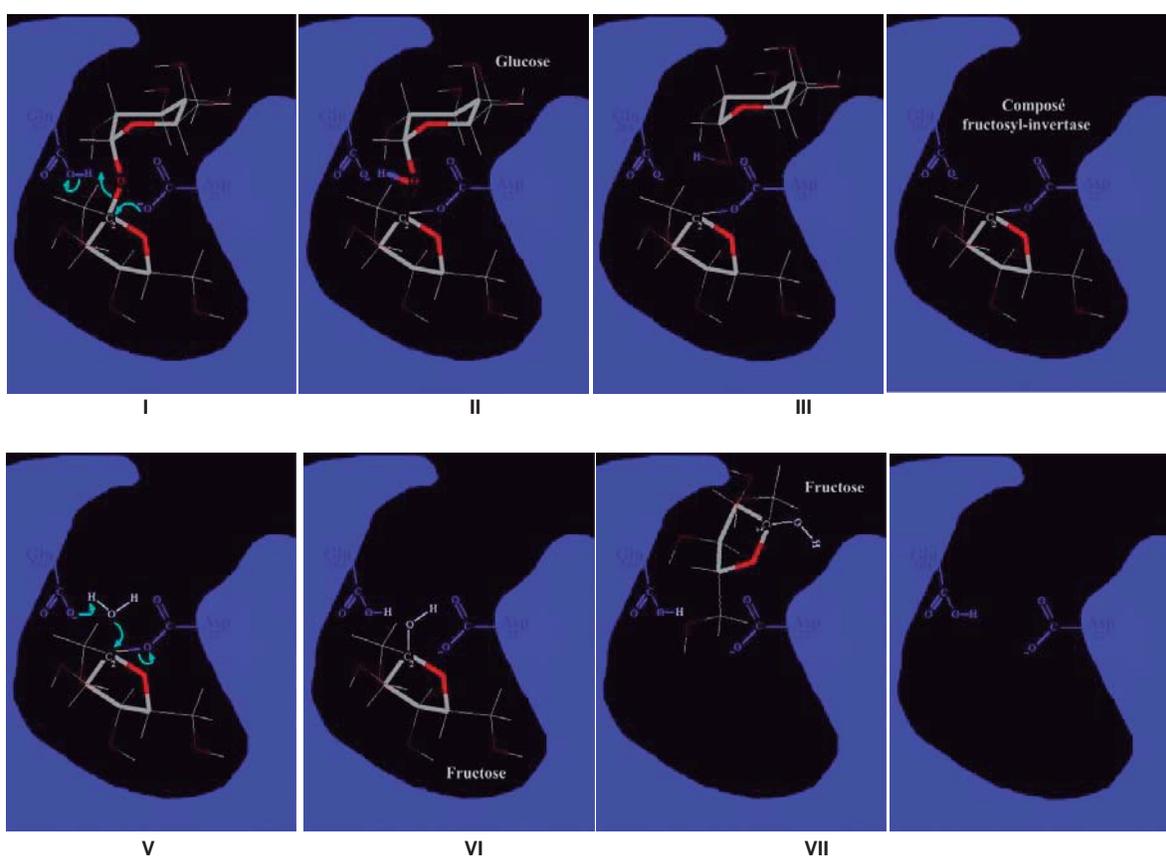


Figura 4. Mecanismo de acción de la invertasa. I-IV) En la reacción de hidrólisis catalizada por la invertasa, el hidrógeno del grupo carboxilo del Glu-204 se une a la molécula de glucosa rompiendo el enlace β -(2-1) y un oxígeno del Asp-23 se une al C2 de la molécula de fructosa reteniéndola, para de esta forma liberar a la glucosa. V-VIII) En esta etapa de la reacción, un hidrógeno de la molécula de agua se une al oxígeno libre del Glu-204 para regenerar el grupo carboxilo y el radical OH^- de la molécula de agua se une a la fructosa en el C2 sustituyendo al oxígeno del Asp-23 [27].

1.5.1. Aplicaciones de la invertasa

La enzima invertasa es utilizada principalmente en la industria alimenticia para la producción de jarabes de alta fructosa (JAF), debido a que la fructosa tiene un mayor poder edulcorante que la sacarosa y es menos propensa a la cristalización, ya que actúa como un agente de reblandecimiento en alimentos azucarados con tendencia a cristalizar la sacarosa y evaporar agua, lo que afecta su aspecto y consistencia [25, 28]. Además, los JAF son más atractivos que los jarabes azucarados debido a sus propiedades funcionales como la elevada presión osmótica y una alta solubilidad [29-30].

Estas propiedades contribuyen al incremento del valor agregado de estos jarabes para su uso en diversos productos, ya que la fructosa resultante tiene una propiedad humectante y da sensación de frescura al producto. Productos de confitería, como bombones con relleno, productos de jaleas, fondants, mazapanes y pasteles, adquieren entonces una consistencia suave, cremosa y blanda, aún después de un almacenamiento prolongado [28,30].

Sus propiedades catalíticas (como invertasa e inulinasa), la termoestabilidad, además del ahorro energético y la baja formación de subproductos, son las ventajas más claras del uso de la invertasa sobre la hidrólisis ácida que la convierten en una enzima adecuada para usos biotecnológicos [21,26].

1.5.2. Inhibición de la actividad enzimática

Uno de los principales inconvenientes en la utilización de enzimas en procesos industriales, es el decremento de la vida media debido a la posible inactivación causada por contaminantes del sustrato [31]. El jugo de caña crudo, en particular, contiene cantidades significativas de inhibidores de la invertasa como son los compuestos proteínicos y otros compuestos nitrogenados solubles e insolubles [32-33], fenoles, polifenoles, flavonoides, antocianinas, ceras y minerales como Ag (I), Cd (II), Cu (II), Hg (I), Hg (II), Pb (II) y Zn (II) [32,34-38].

Liebl *et al.*, demostró que mediante la adición de CuSO_4 , ZnCl_2 , MoCl_2 , o FeCl_2 a una concentración de 1 mM, había una reducción significativa en la actividad enzimática de la invertasa, y que los metales Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , adicionados como sales de cloruro en concentraciones de 1-10 mM, no presentaban ningún efecto sobre ésta [26]. En un estudio similar publicado en 1999 por Vorster y Botha, se demostró que el HgCl_2 , AgNO_3 y el CoCl_2 también inhiben significativamente la actividad de la invertasa [39].

1.6. PURIFICACIÓN DEL JUGO DE CAÑA

La purificación es una operación importante en el procesamiento de alimentos líquidos. En el caso concreto de los JAF estos deben ser incoloros, sin sabores extraños, olores indeseables y no deben presentar turbidez. La purificación industrial de JAF normalmente incluye las etapas de clarificación y desmineralización. La clarificación de JAF se realiza generalmente utilizando carbón activado, el cual tiene como función remover coloides además de precursores y productos de degradación. La desmineralización es comúnmente llevada a cabo utilizando resinas de intercambio iónico, las cuales eliminan principalmente iones de los jarabes [19].

De manera general se clasifican en tres categorías a los compuestos de una solución acuosa: a) *sólidos suspendidos* (SS), b) *partículas coloidales* (entre 1 μm -1 nm) y c) *sustancias disueltas* (< 1 nm) [40-41]. Los procesos de coagulación-floculación facilitan el retiro de los SS y de las partículas coloidales. Esta es usada en la etapa final de la separación de los sólidos-líquidos: deposición, flotación o filtración [40].

La *coagulación* es la formación de agregados compactos, en una solución coloidalmente inestable, que lleva a su separación macroscópica; es decir, la formación de un coágulo. Un *floculante* es una sustancia añadida a una dispersión de un sólido en un líquido, que provoca la agregación de las partículas finas o coloides originando flóculos [42]. Los factores que pueden promover la coagulación-floculación son: el gradiente de velocidad, el tiempo y el pH. El tiempo y el gradiente de velocidad son importantes al aumentar la probabilidad de que las partículas se unan. Por otra parte el pH es un factor determinante en el retiro de coloides [40].

Las industrias del azúcar de caña y de remolacha han usado métodos antiguos, como adicionar cal y flocular para clarificar el jugo natural y remover impurezas como ceras, dextrinas y gomas, previo al refinamiento del jugo para su evaporación y cristalización. La filtración por membranas puede ser utilizada para clarificar el jugo natural, o como reemplazo de los clarificadores más comunes, eliminando en consecuencia numerosos problemas ambientales y mejorando la calidad y el rendimiento del jugo. En los procesos de producción, las membranas también pueden ser empleadas para decolorar, fraccionar y concentrar diversas soluciones azucaradas [43].

1.6.1. Tecnología de filtración por membranas

La tecnología de filtración por membranas ha logrado una rápida aceptación mundial como una importante etapa de producción en numerosas líneas de procesos en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica [43]. La tecnología de membranas es un término genérico para una serie de procesos de separación, diferentes y muy característicos [44]. La filtración por membranas es una tecnología basada en la permeabilidad selectiva a través de la membrana y en el gradiente de presión hidrostática [45].

Una membrana se considera como una barrera o película permeo-selectiva entre dos medios fluidos, que permiten la transferencia de determinados componentes de un medio al otro a través de ella y evita o restringe el paso de otros componentes (Figura 5) [45-46].

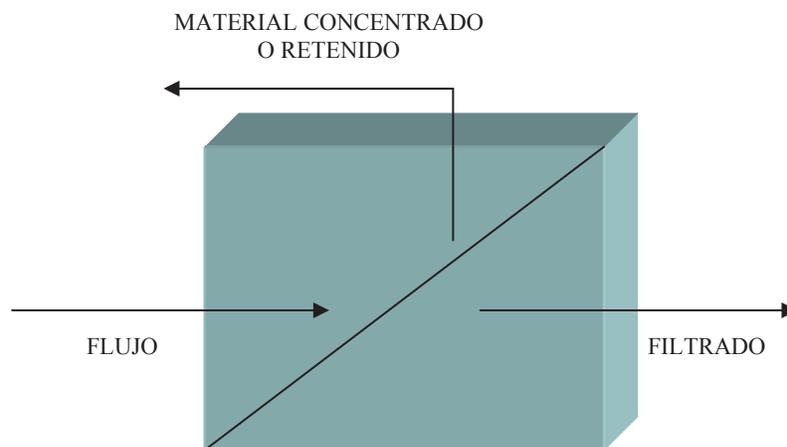


Figura 5. Principio de la filtración por membranas [46]

El transporte de componentes a través de la membrana se realiza siempre aplicando una fuerza impulsora. Esta fuerza impulsora puede ser debida a gradientes de concentración, presión, temperatura o potencial eléctrico [44-45]. La permeabilidad selectiva esta determinada por la medida de la partícula, la afinidad química con el material de la membrana y/o la movilidad de los componentes a través de la membrana (movimiento difusivo o convectivo) [45].

La capacidad para producir separaciones muy específicas a baja o a temperatura ambiente, sin experimentar alteraciones químicas ni físicas y sin cambio de fase, en muchas aplicaciones, hace que la filtración por membranas sea superior a los métodos convencionales,

tales como la filtración rotativa al vacío o filtros prensa, siendo la solución más eficiente basada en una mejor relación costo/eficiencia [43,46].

Además, el diseño compacto y modular hacen del sistema de separación por membranas fácil de instalar y que requiera poco espacio. A este procedimiento también se le conoce como proceso de esterilización en frío debido a la porosidad selectiva capaz de separar partículas de hasta $0.0001 \mu\text{m}$, por lo que el material que pasa a través de las membranas queda libre de microorganismos [46]. La separación por membranas es una tecnología que contribuye de manera favorable a optimizar el consumo de energía, además de reducir o eliminar la clarificación química y mejorar la calidad del producto final [47].

1.6.2. Tipos de filtración

Los sistemas de membrana pueden ser de dos tipos:

i) *Membrana de extremo cerrado o flujo frontal*. Es uno de los métodos más sencillos y comunes de filtración [46]. Cuando se realiza una filtración frontal, toda el agua que entra en la superficie de la membrana es presionada a través de la membrana. Algunos sólidos y componentes (torta) permanecerán en la membrana mientras que el agua fluye a través de ésta. Esto depende del tamaño de poro de la membrana. En consecuencia, el agua experimentará una mayor resistencia a pasar a través de la membrana. Cuando la presión del agua entrante es continua, esto resultará en un decrecimiento del flujo. Después de un tiempo el flujo habrá decrecido tanto que la membrana necesitará ser limpiada. La filtración frontal se aplica porque la pérdida energética es menor que cuando se aplica la filtración tangencial. Esto es porque toda la energía entra en el agua que realmente ha pasado la membrana. La presión necesaria para presionar el agua a través de la membrana es llamada Presión Transmembranal (PTM) [44]. En este tipo de configuración de la membrana, el aumento del espesor de la torta es directamente proporcional a la disminución del flujo en función del tiempo.

ii) *Membrana de flujo cruzado o tangencial*. En este proceso, la alimentación fluye tangencialmente sobre la superficie de la membrana. Las partículas que se depositan en el medio filtrante son arrastradas por la alimentación; una velocidad de la alimentación acompañada de mucha turbulencia resulta muy eficaz para mantener una superficie limpia.

Este tipo de configuración es muy deseable porque mantiene un espesor constante de la torta y, de esta manera, una velocidad de flujo constante a través de la membrana [46]. El sistema de flujo tangencial se aplica para ósmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración, dependiendo del tamaño de poro de la membrana [44].

1.6.3. Selectividad de los procesos de filtración

En general, existen tres principales tecnologías de membranas; Ósmosis Inversa, Ultrafiltración y Microfiltración, mismas que se distinguen por el peso molecular de las partículas que son capaces de retener (Figura 3) [46,48].

1.6.3.1. Ósmosis Inversa (RO)

Proceso de alta presión comúnmente utilizado como un método energéticamente eficiente para eliminar agua, concentrar compuestos de bajo peso molecular o purificar efluentes. Entre sus aplicaciones comunes podemos mencionar la preconcentración de lácteos o de alimentos líquidos previo a una evaporación, pulido de condensado de evaporador y purificación de agua de proceso [43]. El tamaño del poro es el más pequeño: de 0.0001-0.001 μm [46].

1.6.3.2. Nanofiltración (NF)

Considerada como un proceso único entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, está especialmente diseñada para conseguir separaciones específicas de compuestos de bajo peso molecular como azúcares, minerales disueltos y sales. Aplicaciones típicas incluyen desalinización de productos lácteos, recuperación de proteínas hidrolizadas, concentración de azúcares y purificación de tinturas y pigmentos solubles [43].

1.6.3.3. Ultrafiltración (UF)

El tamaño del poro de las membranas que se utilizan en la UF varía entre 0.001-0.1 μm [46]. Es un paso de separación selectiva usada tanto para concentrar como para purificar compuestos de medio y alto peso molecular, tales como proteínas lácteas, carbohidratos, y enzimas. Algunas de sus aplicaciones comunes incluyen la concentración de proteínas de suero, de-salinización de gelatinas y concentración y clarificación de jugos frutales [43].

1.6.3.4. Microfiltración (MF)

Con un tamaño de poro de 0.1-10 μm [46], este tipo de filtración trabaja a baja presión para separar partículas de alto peso molecular, coloides en suspensión o bien sólidos disueltos. Aplicaciones frecuentes incluyen la separación de células de extractos fermentados, fraccionamiento de proteínas de leche, clarificación de jarabe de maíz y la recuperación de químicos de lavado [43].

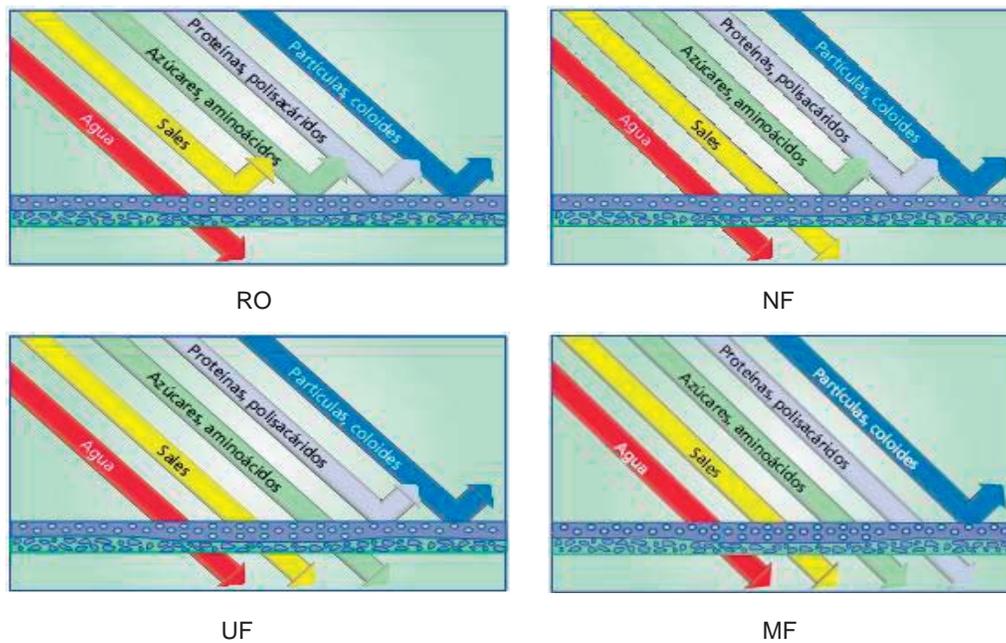


Figura 6. Selectividad de los procesos de filtración. Se muestra la selectividad y el tipo de partículas que son capaces de retener los diferentes tipos de membranas [44].

1.6.4. Tipos de membranas

1.6.4.1. Membranas poliméricas

Las membranas orgánicas por lo general son fabricadas a partir de celulosa por acetilación. El uso del acetato de celulosa tiene varias ventajas; por ejemplo, un flux alto y propiedades elevadas de rechazo de sales; de igual manera, son fáciles de fabricar. Las membranas sintéticas se fabrican a base de polímeros como el nylon, fluoruro de polivinilideno, poliuretano, polisulfona, poliéster, etcétera. La polisulfona presenta una resistencia bastante buena al cloro, aunque se recomiendan otros desinfectantes. Las limitaciones más notables de las membranas poliméricas, particularmente las de origen orgánico, es que presentan una

biodegradabilidad alta bajo condiciones ácidas y la baja resistencia a la oxidación por el efecto del cloro por lo que su tiempo de vida útil es corto [46]. Las membranas poliméricas están disponibles para toda la gama de procesos de filtración: RO, NF, UF y MF. Las características especiales de diseño permiten trabajar a altas temperaturas (hasta 95° C) y un amplio rango de pH (1-13) [49].

- a) **Espiral.** Debido a su diseño compacto y a la gran área de membrana relativa por elemento, son una buena solución costo-eficiencia para aplicaciones de gran volumen con sólidos mínimos o no suspendidos, con la ventaja de tener en ambos casos una baja inversión de capital y de costos de energía [43].
- b) **Tubular.** Altamente resistentes a los bloqueos. Las membranas tubulares se utilizan cuando la corriente de alimentación contiene gran cantidad de sólidos en suspensión o compuestos fibrosos [43].
- c) **Filtro de placa y marco.** Su diseño de canal abierto permite que se lo utilice para productos con muy alta viscosidad, adecuado especialmente para aplicaciones con alto contenido de sólidos en la industria farmacéutica y alimenticia [43].

1.6.4.2. Membranas inorgánicas minerales

Estas membranas se elaboran a partir de materiales inorgánicos minerales como la α -alúmina (cerámica), sílice, acero inoxidable, carbono, circonio, etcétera. Sus usos son extremadamente versátiles y no presentan ninguna de las desventajas de las membranas poliméricas; poseen un alto grado de resistencia a la degradación química y a la abrasión [46]. Debido a su estructura, este tipo de membranas son tolerantes a temperaturas elevadas (0-300° C), pH extremo (0-14) y los solventes. Su diseño resistente las hace recomendables para aplicaciones que implican condiciones extremas de operación. Normalmente presentan un tiempo de vida más largo comparado con las membranas orgánicas y aunque frecuentemente representan una mayor inversión, son ideales para economizar a largo plazo [49].

- a) **Cerámica.** Especialmente usadas para aplicaciones sanitarias tales como leche o extractos fermentados, también lo son para productos que requieren separaciones

selectivas a partir de caudales fluidos con valores elevados de pH, temperaturas extremas o la presencia de solventes [43].

- b) **Acero inoxidable.** Su diseño es rugoso, son especialmente efectivas para aplicaciones que requieren condiciones de proceso agresivas, o caudales de alimentación con alto contenido de sólidos o muy alta viscosidad [43].

1.6.5. Intercambio iónico

El intercambio iónico *es el proceso mediante el cual se da un intercambio reversible de iones entre un sólido* (material de intercambio iónico en el cual no hay un cambio permanente en la estructura) *y un líquido*. Este proceso es utilizado principalmente en áreas como la síntesis química, investigación médica, procesamiento de alimentos, minería y agricultura entre otras [50]. En la industria alimenticia las resinas de intercambio iónico son utilizadas para el control de la acidez, la eliminación de color, olor, sabor, sales minerales, o una combinación de estas características [51]. La funcionalidad del intercambio iónico reside en la capacidad de regeneración del material de intercambio. Las resinas de intercambio iónico convencionales consisten en una matriz de polímero entrecruzada con una distribución relativamente uniforme de los sitios iónicos activos por toda la estructura [50]. Las resinas funcionan mediante el intercambio de un tipo de ión por otro que presenta mayor atracción hacia los sitios activos de la matriz de polímero. Por ejemplo, una resina del tipo catiónica ácida fuerte, inicialmente es cargada con iones H^+ . Cuando el jugo o jarabe se hace fluir a través de una cama de resina, inmediatamente se inicia el intercambio de los iones H^+ por otros cationes menos deseables como el Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} y K^+ (Figura 4). Debido a que las resinas son porosas, el intercambio iónico tiene lugar dentro de las esferas. La capacidad de intercambio total de cada tipo de resina en específico, está relacionado con el número de sitios activos en la matriz y las propiedades y especificaciones de las resinas (Cuadro 8) [51].

1.6.5.1. Uso del intercambio iónico en la industria azucarera

En 1896 Harm expuso que el rendimiento de azúcar de remolacha podía aumentarse por medio de la zeolita natural, reemplazando los iones K^+ y Na^+ del jugo por iones de Ca^{2+} . Sin embargo, este procedimiento no obtuvo éxito industrial debido a la poca eficacia del intercambio y a la indeseabilidad del calcio en el jugo [52]. El descubrimiento de los

intercambiadores iónicos orgánicos, obtenidos por síntesis, abrió el camino para la fructosa y su diversificada aplicación. En 1935 Adams y Holmes, al condensar fenoles con formaldehído obtuvieron resinas insolubles, del tipo de la "bakelita", que poseían actividad como intercambiadores de bases; de igual forma, al condensar poliaminas con formaldehído prepararon resinas que tenían características convenientes para el intercambio aniónico [53]. El potencial del intercambio iónico en el tratamiento de los jugos azucarados fue inmediatamente reconocido. En una solicitud de patente en 1939, Smit dio a conocer el uso combinado de un intercambiador de cationes y de aniones, para eliminar de las soluciones de azúcar no solamente los iones sino también gran parte de su color [54]. La Isabella Sugar Company, de Mount Pleasant, Michigan, con base en el trabajo de Vallez estableció una instalación industrial para el azúcar de remolacha [55].

Hasta la fecha, se siguen desarrollando tecnologías como la electrodiálisis que, combinada con el intercambio iónico, han logrado reducir al mínimo los problemas técnicos que impiden la implementación de estos sistemas en la industria azucarera [56].

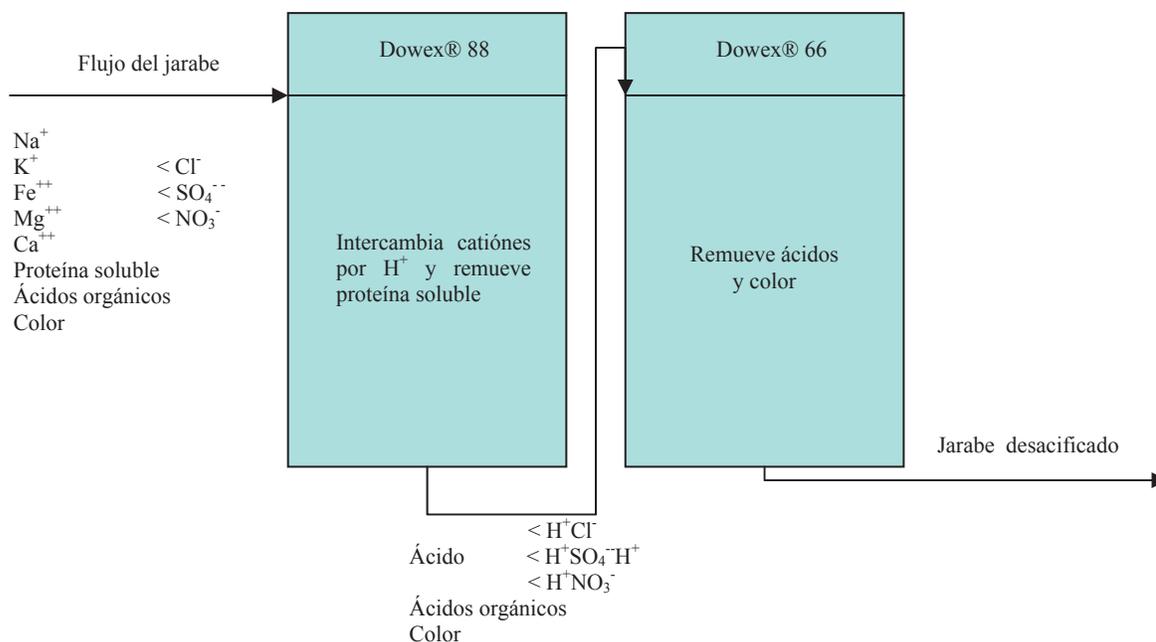


Figura 7. Principio del intercambio iónico. Resinas Dowex® 88 y Dowex® 66 funcionando conjuntamente (en camas separadas) para la remoción de sales, proteínas, ácidos y otras impurezas [51].

Cuadro 8. Propiedades y condiciones de operación sugeridas para las resinas *Dowex 88* y *Dowex 66* [57].

<i>Propiedades de las Resinas</i>	<i>DOWEX 88</i>	<i>DOWEX 66</i>	<i>Condiciones de operación sugeridas</i>	<i>DOWEX 88</i>	<i>DOWEX 66</i>
<i>Tipo</i>	Catiónica ácida fuerte	Aniónica débil	<i>Temperatura máxima del jarabe</i>	200° F 93°C (Form H ⁺)	140° F 60° C (Base libre)
<i>Grupo activo</i>	Sulfonato	Amina terciaria	<i>Llenado de cama, (mínimo)</i>	36 inches 91 cm	36 inches 91 cm
<i>Forma iónica (producida)</i>	Sodio	Base libre	<i>Nivel de Regenerante (100% base)</i>	6-7 lbs/cu. ft. 96-112 kg/m ³	5-6 lbs/cu. ft. 80-96 kg/m ³
<i>Estructura</i>	Macroporos de estireno- divinylbenzeno	Macroporos de estireno- divinylbenzeno	<i>Concentración de regenerante</i>	7% HCl	4% NaOH
<i>Forma física</i>	Esferas	Esferas	<i>Temperatura de regenerante (max.)</i>	200°F 93°C	140° F 60° C
<i>U.S. Standar mesh (típico)</i>	16-40	16-50	<i>Regenerantes sustitutos</i>		5% Na ₂ CO ₃ @ 7-8 lbs/ft ³ (112-128 kg/m ³)
<i>Capacidad Total</i>	1.8 meq/ml, min	1.60 meq/ml, min	<i>Regenerantes sustitutos</i>		5% NH ₄ OH @ 5-6 lbs/ft ³ (80-96 kg/m ³)
<i>Capacidad de base débil</i>		1.35 meq/ml, min			
<i>Capacidad de retención de agua</i>	42-48%	40-50%			

2. JUSTIFICACIÓN

La rentabilidad del cultivo de caña de azúcar depende de su aprovechamiento integral, la modernización de los procesos de industrialización que logren abatir los costos de producción y la diversificación de productos con un mayor valor.

La alternativa propuesta en este trabajo pretende aprovechar la sacarosa contenida del jugo de caña de azúcar mediante la obtención de azúcar invertido.

3. HIPÓTESIS

La invertasa codificada por el gen *brfA* procedente de la bacteria *Thermotoga maritima* por sus propiedades catalíticas y alta termoestabilidad, puede ser utilizada en procesos de producción de azúcar invertido de jugo de caña.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- ⌘ Obtener azúcar invertido de jugo de caña mediante la hidrólisis catalizada por la invertasa *Inu*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ⌘ Expresar el gen *brfA* que codifica la enzima invertasa en *Escherichia coli*
- ⌘ Caracterizar bioquímicamente la enzima recombinante invertasa
- ⌘ Obtener azúcar invertido de jugo de caña mediante la hidrólisis catalizada por la invertasa *Inu*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de cultivo

Agar *Luria-Bertoni* (LB); triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1 % y agar bacteriológico 1.5 %. Para preparar caldo LB, descartar el agar bacteriológico. Para selección de transformantes se utilizó ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

5.2. Cepas bacterianas empleadas

La cepa *Escherichia coli* TOP10 fue empleada como receptora en la transformación.

5.3. Plásmidos empleados

El plásmido empleado como vector del producto de PCR del gen *brfA* fue pTrcHis2 A (Invitrogen™) (Figura 8). El plásmido fue subclonado y proporcionado como una colaboración entre el Laboratorio de Biotecnología Microbiana a cargo del Dr. Jesús Campos García y el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos a cargo del Dr. Carlos R. Sosa Aguirre del IIQB-UMSNH.

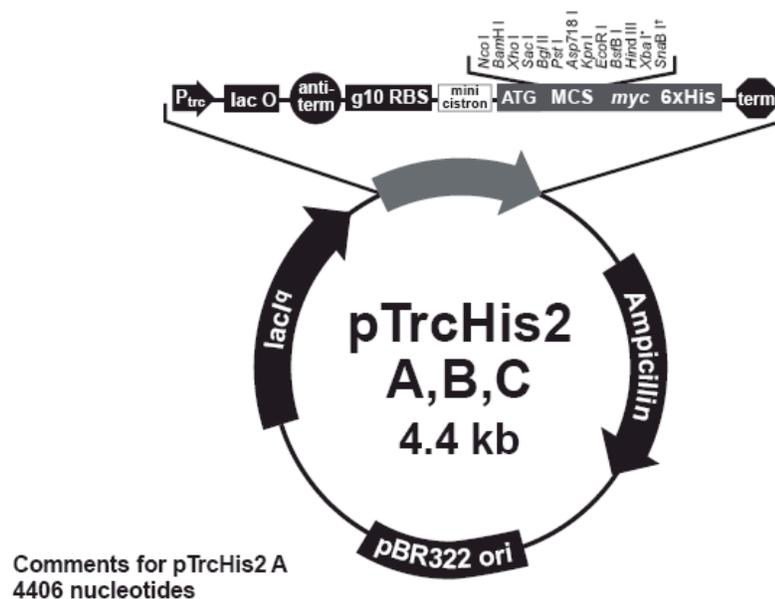


Figura 8. Esquema del plásmido pTrcHis2 A. Este plásmido cuenta con el gen de la resistencia a ampicilina y sitios múltiples de clonación (MCS). Estos sitios están determinados por enzimas de restricción (endonucleasas), como BamH I y Hind III que fueron empleadas en este estudio.

5.4. Aislamiento del DNA plasmídico

Para el aislamiento del plásmido proporcionado, se realizó un cultivo nocturno (overnight culture) de la cepa *E. coli* TOP10 - pTrcHis2AInu en 10 mL de caldo LB + Amp a 37° C/200 rpm. Transcurrido el crecimiento, el plásmido fue purificado con el kit Rapid Plasmid purification systems (Marligen Bioscience, Inc.) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

5.5. Tratamiento enzimático del DNA

La digestión del plásmido se efectuó con las enzimas de restricción BamH I y Hind III (Promega® o Invitrogen®). Se utilizó una unidad de enzima de restricción por microgramo de DNA. Las mezclas se incubaron 4 h/37° C. Las muestras se sometieron a un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % (adicionando 2 µL de bromuro de etidio) en amortiguador TAE (Tris-Acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M) para verificar la presencia del inserto y determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos. Las muestras de DNA se mezclaron con 2 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5 %, sacarosa 40 %). La cámara de electrofóresis se conectó a una fuente de poder (Bio-Rad®) y se sometió a un voltaje de 120 voltios/1 hr.

5.6. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

5.6.1. Preparación de células competentes

Se preparó un preinóculo de la cepa *E. coli* TOP10 en 3 mL de caldo LB y se incubó toda la noche a 37° C/200 rpm. Con el preinóculo, se inocularon 500 mL de caldo LB y se incubó bajo las condiciones descritas hasta $DO_{560\text{ nm}} = 0.5$. El crecimiento se detuvo incubando en hielo por 5 min, se centrifugó a 6000 rpm/5 min/4° C. La pastilla se resuspendió en 15 mL de TFb1 frío (acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15%), se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y se esterilizó por filtración en un filtro de 0.22 µm, se incubó en hielo por 20 minutos y posteriormente se centrifugó a 10 min/6000 rpm/4° C. La pastilla se resuspendió en 2 ml de TFb2 frío (MOPS 75mM [ácido 4-morfolino propano sulfónico], KCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM y glicerol 15%), se ajustó el pH a 6.5 con KOH y se esterilizó en un filtro de 0.22 µm. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -80° C.

5.6.2. Transformación por choque térmico

Se mezcló el DNA plasmídico (3-5 μ L de la mezcla inserto:vector) obtenido del aislamiento con 100 μ L de la suspensión de las células bacterianas competentes y se incubó en el hielo 20 minutos. Después de este tiempo se incubaron a 42° C en un baño de agua por 45 segundos y los tubos se transfirieron al hielo incubándose por 3 minutos. Se les adicionó 1 mL de caldo LB precalentado, se incubaron a 37° C por un máximo de 1 hora, se concentró el cultivo resuspendido en 100 μ L y se plaqueó en cajas de LB + Amp.

5.7. Producción de la invertasa *Inu*

Se inocularon dos tubos Falcon de 10 ml de caldo LB + Amp con la cepa *E. coli* TOP10-pTrcHis2A*Inu* y se incubaron a 37° C/200 rpm hasta alcanzar una $DO_{560nm} = 0.6$. Inmediatamente se adicionó IPTG (isopropil β -thiogalactosidasa) hasta alcanzar una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación por 4 hrs. Las células fueron cosechadas a 6000 rpm/10 min/4° C. La pastilla se resuspendió en agua desionizada y se repitió el tratamiento. La pastilla se volvió a resuspender en buffer TRIS/HCl 20 mM a pH 8. El extracto celular se obtuvo mediante sonicación, durante cuatro ciclos de 15 segundos con intervalos de 30 segundos, y todo el proceso se mantuvo en baño de hielo. El extracto obtenido se centrifugó a 8000 rpm/4° C/5 min. Se recuperó la enzima (sobrenadante) y se incubó a 70° C/5 min para desnaturalizar y precipitar el contenido celular y se adicionó glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final 15 % (p/v). La solución se refrigeró a -4° C para su posterior uso.

5.8. Cuantificación de Proteína Total

Para la cuantificación de proteína total del extracto, se efectuó el ensayo bajo las condiciones descritas en el método propuesto por Sedmak y Grossberg en 1977 [58]. El reactivo para esta prueba se preparó de la siguiente manera: a una solución de ácido perclórico (PCA) al 3 % (p/v) se le añadieron 0.06 % (p/v) de azul brillante de Coomassie (Sigma Aldrich®). Una vez preparada la solución, se dejó reposar por 5 minutos y después fue filtrada a través de papel Whatman No. 1, para remover las partículas no solubles. Hecho lo anterior, se procedió a leer la absorbencia de la solución a 465 nm y se ajustó entre 1.3-1.5. Para el ensayo estándar se realizó un curva patrón de albúmina de plasma bovino (BSA) (Sigma Aldrich®) a 620 nm. El

ensayo con el extracto enzimático consistió en la dilución 1:10 de éste y se tomaron alícuotas de 500 µL de la dilución y se añadieron 500 µL de la solución de azul de Coomassie. Todas las lecturas fueron realizadas a 620 nm por triplicado.

5.9. Caracterización de la enzima

Los sustratos utilizados para el ensayo enzimático fueron sacarosa comercial y jugo de caña de azúcar. La mezcla de reacción para el ensayo estándar se preparó con sacarosa al 20 % (p/v), buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.5 y 17 µL de extracto enzimático hasta un volumen final de 500 µL y se incubó a 75° C/15 min. Se hicieron variaciones a la mezcla de reacción de acuerdo a los parámetros determinados (en las tablas anexas se muestra el contenido y variación de los componentes de la mezcla).

5.10. Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-DNS

Para determinar la concentración de azúcares reductores, se elaboró una curva patrón usando una mezcla equimolar de glucosa y fructosa. La hidrólisis de la sacarosa se determinó midiendo el incremento de los azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico [59] (Solución A: mezclar 150 g de tartrato doble de sodio y potasio y 8 g de metabisulfito de sodio en 250 mL de agua destilada, Solución B: a una solución de NaOH 8 % agregar 5 g de ácido 3,5-DNS. Las dos soluciones se diluyen con calor. Mezclar ambas soluciones y aforar a 500 mL). El método consistió en la adición de 0.5 mL del reactivo DNS a la mezcla de reacción del ensayo estándar (posterior a la incubación del ensayo) y se mezcló en vortex. Inmediatamente se colocó la mezcla en baño maría a ebullición por 10 min. Transcurrido ese lapso, se enfrió la mezcla bajo el chorro de agua o en hielo. Se agregaron 2 mL de agua destilada a cada tubo y se mezcló en vortex. Se tomó 1 mL de cada tubo y se leyó la absorbencia a 575 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

5.11. Procesamiento del jugo de caña de azúcar

La caña de azúcar se obtuvo en la central de abasto de la ciudad de Morelia, Michoacán. El procesamiento de la caña de azúcar se efectuó en un extractor de jugos de uso rudo Turmix®. Entre el recipiente contenedor y el extractor se colocó una malla o sedaso con la finalidad de retener la mayor cantidad de fibra o bagazo para obtener un producto ligeramente libre de

sólidos. Inmediatamente se determinaron los valores de pH y °Bx para determinar la calidad del jugo. Posteriormente se pasteurizó a 60° C/10 min., para inactivar la invertasa natural contenida en la caña y los microorganismos fermentadores de la sacarosa y se refrigeró a -20° C para su uso posterior.

5.12. Clarificación del jugo de caña

La primera etapa de la purificación consistió en la clarificación del jugo mediante el uso de las membranas de microfiltración Vivaflow 200 de Vivascience® (Figura). El poro nominal de las membranas es de 0.2 µm, lo que garantizó la esterilización del producto. Para el ensamble de los módulos se siguieron las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante. La velocidad de flujo a la cual se hizo pasar el jugo fue de 50 mL/min a una presión de 2 bar. La limpieza de los módulos consistió en hacer pasar 200 mL de agua desionizada para remover el material de desecho atrapado en las membranas. A continuación se recircularon 250 mL de NaOH 0.5 M con 1 mL de hipoclorito de sodio por 30 minutos a un flujo de 50 mL/min. Después, se recircularon 250 mL de agua desionizada durante 5 minutos. Para el almacenamiento de las membranas, se realizaron los lavados anteriores y se guardaron con una solución de etanol al 10 % y se refrigeraron a 4° C.

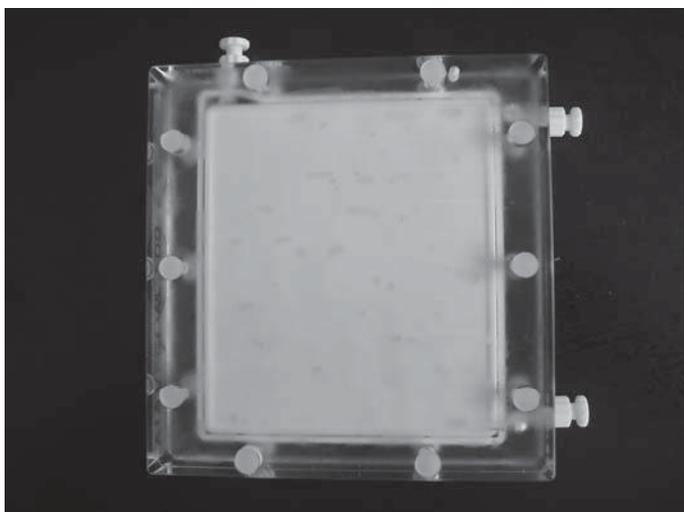


Figura 9. Membrana de microfiltración Vivaflow 200 de Vivascience® con un área de 200 cm². Es una membrana polimérica fabricada de poliéstersulfona de flujo tangencial. Las condiciones de presión y temperatura máximas de operación son 4 bar (60 psi) y 60° C respectivamente.

5.13. Desmineralización del jugo de caña

El volumen de resinas catiónica y aniónica empacada que se utilizó fue de 200 mL cada una. Para regenerar las resinas por primera vez, se hicieron pasar 5 volúmenes de cama de NaCl al 8 % a través de cada resina y posteriormente 2 volúmenes de agua desionizada. El flujo al que se hizo pasar el jugo de caña fue de 2 mL/min. Una vez procesado el jugo, la limpieza de las resinas se hizo utilizando 5 volúmenes de cama de HCl al 7 % y NaOH al 4% para la resina catiónica y aniónica respectivamente. Un volumen de cama se hizo recircular por 10 minutos a través de las resinas y posteriormente 4 volúmenes de agua desionizada.

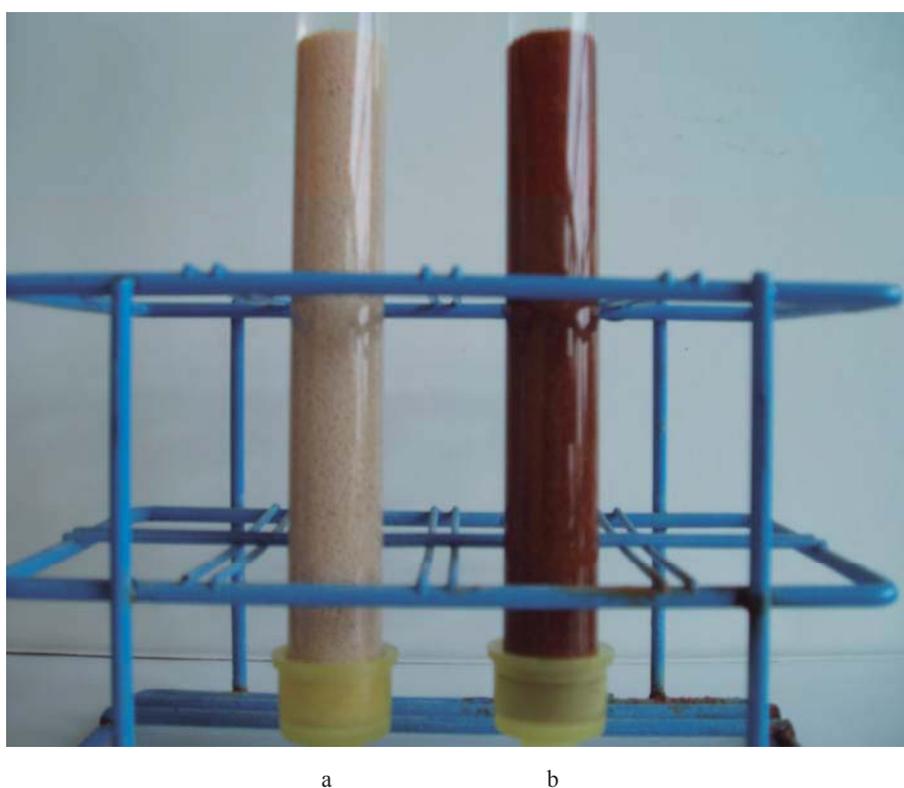


Figura 10. Resinas de intercambio iónico Dowex®. a) La resina Dowex® 88 intercambia cationes por H^+ y remueve proteína soluble. La regeneración de esta resina se lleva a cabo utilizando HCl al 7 %. b) La resina Dowex® 66 remueve ácidos y color. La regeneración se realiza utilizando NaOH al 4 %.

6. RESULTADOS

6.1. Expresión de la invertasa

A partir del plásmido proporcionado, se realizó una electrofóresis en gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia del inserto *Inu* (Figura 11). Se pueden observar las digestiones del plásmido realizadas con las enzimas de restricción BamH I y Hind III. En el carril 1 se colocó un marcador de peso molecular conocido (λ Hind III) para determinar el peso de los fragmentos generados. En el carril 2 se colocó el plásmido pTrcHis2 C como control, ya que presenta el mismo peso molecular que el plásmido pTrcHis2 A que es de 4.4 kb. En el carril 3 se colocó el plásmido pTrcHis2A*Inu* digerido únicamente con la enzima Hind III, lo que generó un solo fragmento de peso molecular de 5.7 kb (4.4 kb del plásmido + 1.3 kb del inserto). El carril 4 corresponde a la digestión del plásmido pTrcHis2A*Inu* con la enzima BamH I, lo que generó dos fragmentos: el inserto *Inu* (peso molecular de 1.3 kb) y el plásmido (4.4 kb). En el carril 5 se colocó la doble digestión hecha al plásmido pTrcHis2A*Inu* con las enzimas BamH I y Hind III, generándose dos fragmentos del mismo peso molecular como en el caso del carril 4. En el carril 6 solamente se hizo el corrimiento del inserto *Inu* que presentó un peso molecular de 1.3 kb y finalmente en el carril 7 se hizo el corrimiento del plásmido pTrcHis2 A como control, el cual presentó un peso molecular de 4.4 kb. De esta forma se determinó la presencia del inserto *Inu* en el plásmido pTrcHis2 A y se corroboró el peso molecular reportado proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del IIQB-UMSNH.

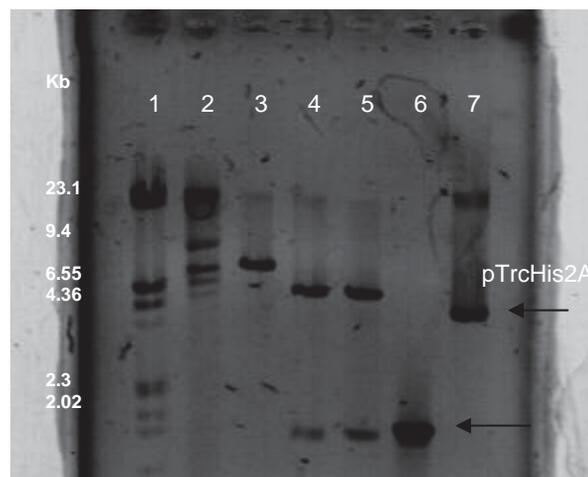


Figura 11. Gel de agarosa de la digestión del plásmido pTrcHis2a*Inu*

Con el extracto enzimático se realizó una electrofóresis de proteínas en gel de poliacrilamida para determinar la presencia de la invertasa y determinar su peso molecular (Figura 12). La flecha indica la banda que corresponde a la invertasa. La invertasa presentó un peso molecular de 50 kDa reportado en 1998 por Liebl *et al.*

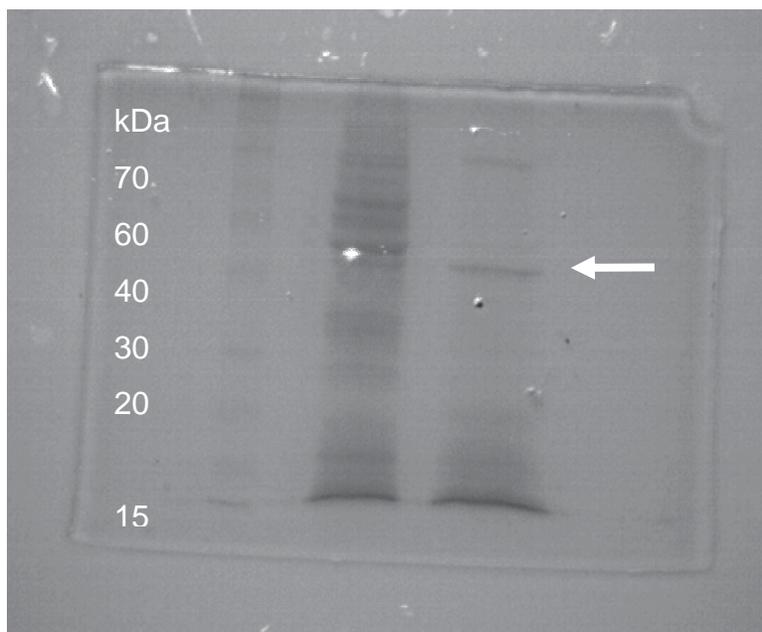


Figura 12. Gel de poliacrilamida de la invertasa. ss

6.2. Cuantificación de la proteína total

Después de realizar una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (Anexos), se determinó la concentración de proteína total contenida en el extracto enzimático mediante la interpolación de las absorbencias obtenidas para las muestras en el ensayo y hechas las conversiones se determinó que la concentración total de proteína fue de **223.173 µg/mL**.

6.3. Caracterización de la invertasa

Las mezclas de reacción para los ensayos enzimáticos se prepararon como lo indican las respectivas tablas en la sección 9 (Anexos). Los valores reportados en porcentaje en las gráficas (%), indican la hidrólisis relativa respecto a la prueba realizada de amera específica; no indican el valor de la hidrólisis total. En la siguiente gráfica (Figura 13) se muestra el efecto del pH en la actividad de la invertasa, donde muestra la máxima actividad a pH 5.5.

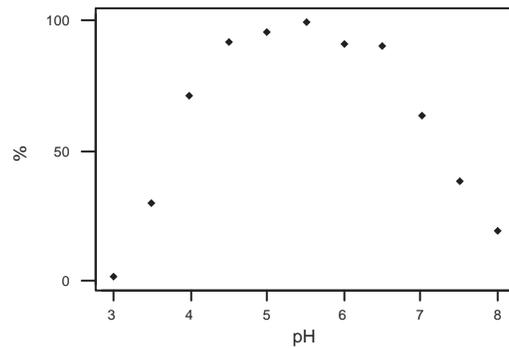


Figura 13. Efecto del pH en la actividad enzimática

El efecto del tiempo en la actividad enzimática (Figura 14) se midió en un intervalo de 0-60 minutos, observándose el 99 % de la hidrólisis relativa para esta prueba a los 30 minutos. El 100 % de la hidrólisis relativa fue a los 45 minutos.

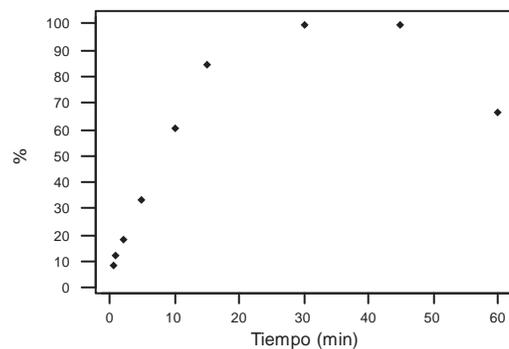


Figura 14. Efecto del tiempo en la actividad enzimática

El efecto de la temperatura máxima de hidrólisis reportada como el 100 % fue a los 80° C (Figura 14), lo que confirma que la enzima es termoestable, y es idónea para procesos que requieren altas temperaturas de operación como es la inversión de sacarosa.

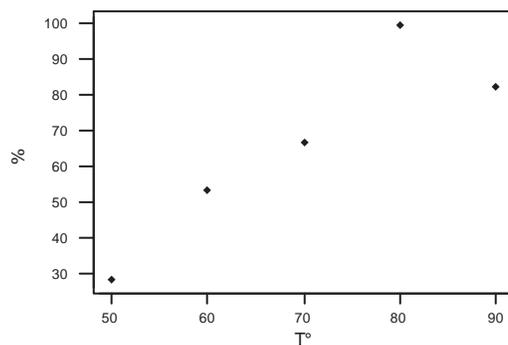


Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

La concentración del sustrato a la cual la enzima redujo su actividad fue a una concentración de 1168.565 mM (200 g/L).

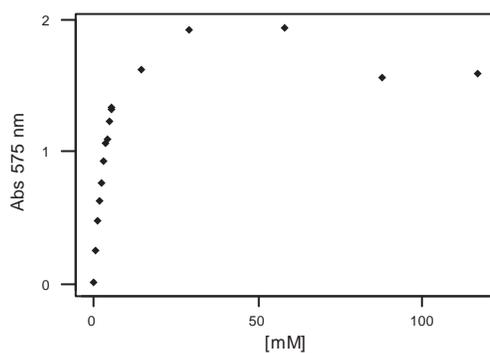


Figura 16. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática

6.4. Purificación del jugo de caña

Se analizaron tres muestras de jugo de caña y se obtuvieron los siguientes valores:

Tipo de jugo	° Bx	pH
Jugo natural	12.5	5.25
Jugo clarificado	12	5.25
Jugo desmineralizado	7	4.56

Tipo de jugo	° Bx	pH
Jugo natural	17.5	5.3
Jugo clarificado	17	5.3
Jugo desmineralizado	13	4.2

Tipo de jugo	° Bx	pH
Jugo natural	15.1	5.7
Jugo clarificado	14	5.7
Jugo desmineralizado	8	5.9

El procesado del jugo presentó una remoción significativa de impurezas (Figura 12), por lo que no fue necesario emplear carbón activado o resinas de adsorción para la remoción de color o impurezas residuales.

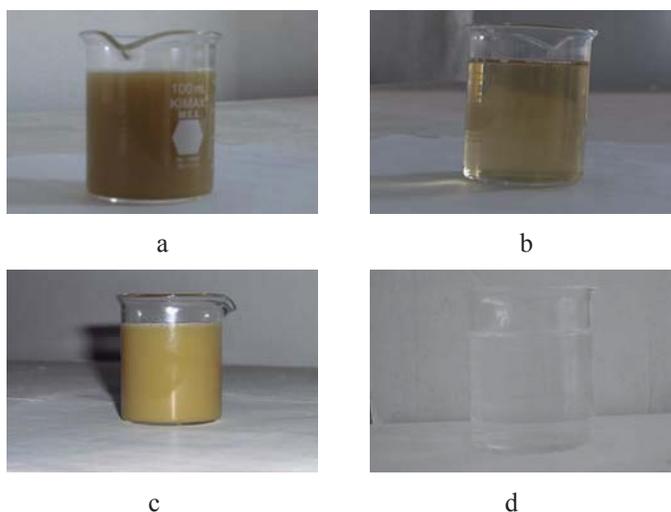


Figura 17. Purificación del jugo de caña de azúcar. a) Jugo natural. b) Jugo clarificado a través de membranas de microfiltración. c) Desecho de la filtración. d) Jugo desmineralizado.

Para determinar la saturación de las resinas de intercambio, se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Baja Presión (Bio-Rad® BioLogic LP) acoplado a una computadora para medir la conductividad a la salida del jugo (Figura 13-14). El nivel de saturación de las resinas se puede medir ya sea por el monitoreo de la conductividad o el pH. La conductividad es inversamente proporcional al pH. Es decir, si el pH es ácido a la salida como es el caso de la resina de intercambio catiónico (Dowex® 88), la conductividad es alta y en la medida en que la resina se satura el pH aumenta y la conductividad disminuye.

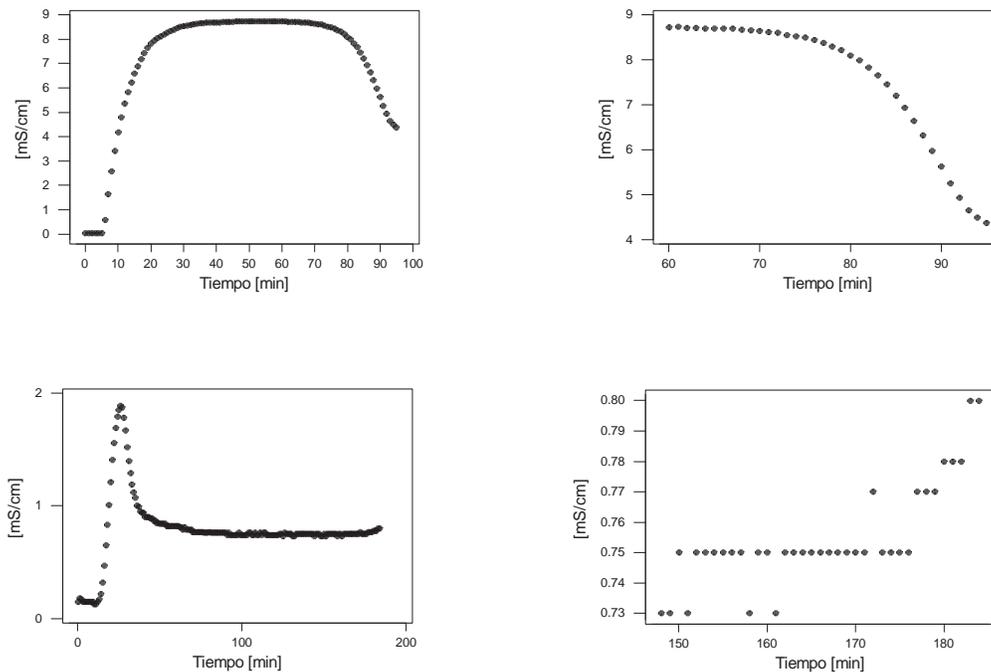


Figura 18. Saturación de la resina Dowex® 88 y 66

7. DISCUSIÓN

La rentabilidad del cultivo de caña de azúcar esta en función de su aprovechamiento integral. A través de su historia, la industria azucarera ha optimizado los procesos de industrialización para la extracción de la sacarosa y su posterior cristalización para la elaboración de lo que azúcar de mesa. A pesar de esto, durante el proceso no se ha logrado reducir la pérdida de sacarosa en forma de azúcares incristalizables en las melazas, producto cuyo valor comercial es limitado, ya que se emplea como pienso para ganado.

La industria azucarera debe modernizar sus procesos de industrialización para lograr abatir los costos de producción, minimizar los residuos contaminantes y buscar la diversificación de productos con un mayor valor. Las tecnologías de purificación tales como la filtración a través de membranas y el uso de resinas de intercambio iónico que suponen una gran inversión, a corto plazo lograrían abatir costos de producción y reducir la contaminación generada por el uso de clarificadores comunes como la cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y el azufre (S).

Por otra parte, la Biotecnología desempeña un papel fundamental en este aspecto. El uso de enzimas termoestables en procesos industriales ha sustituido muchos de los procesos químicos tradicionales debido a que las condiciones de operación son mejor controladas lográndose una baja o nula formación de subproductos. La producción de azúcar invertido es un mercado de gran alcance además de ser un producto de mayor valor agregado que al ser producido por métodos enzimáticos. Esta alternativa puede aprovechar la sacarosa de jugo de caña de azúcar sin las pérdidas que se obtienen para la cristalización de la sacarosa, la cual ha restringido su demanda al abasto nacional haciendo poco redituable su producción

8. CONCLUSIONES

- Se generó un vector denominado pTrcHis2A*Inu*, el cual contiene el gen *brfA* que codifica a la invertasa termoestable *Inu*.
- Se logró transformar con éxito la cepa de *E. coli* TOP10 con el vector pTrcHis2A*Inu*, logrando expresar la invertasa *Inu*.
- La invertasa *Inu* fue caracterizada bioquímicamente obteniéndose sus valores óptimos de catálisis.

9. ANEXOS

Tabla 1. pH ÓPTIMO (°t= 75° C, BUFFER CITRATO-FOSFATO)

pH	Buffer (µl)	Extracto enzimático (µl)	Sacarosa [200 g/L] (µl)	Abs (575 nm)
3.0	233.0	17.0	250.0	0.027
3.5	233.0	17.0	250.0	0.795
4.0	233.0	17.0	250.0	1.897
4.5	233.0	17.0	250.0	2.464
5.0	233.0	17.0	250.0	2.569
5.5	233.0	17.0	250.0	2.671
6.0	233.0	17.0	250.0	2.451
6.5	233.0	17.0	250.0	2.433
7.0	233.0	17.0	250.0	1.702
7.5	233.0	17.0	250.0	1.032
8.0	233.0	17.0	250.0	0.510

Tabla 2. TIEMPO DE HIDRÓLISIS ÓPTIMO

Tiempo (min.)	Buffer pH=5.5 (µl)	Extracto enzimático (µl)	Sacarosa 200 g/L (µl)	Abs 575 nm
0.5	233.0	17.0	250.0	0.133
1.0	233.0	17.0	250.0	0.191
2.0	233.0	17.0	250.0	0.290
5.0	233.0	17.0	250.0	0.520
10.0	233.0	17.0	250.0	0.950
15.0	233.0	17.0	250.0	1.331
30.0	233.0	17.0	250.0	1.572
45.0	233.0	17.0	250.0	1.573
60.0	233.0	17.0	250.0	1.045

Tabla 3. TEMPERATURA DE HIDRÓLISIS ÓPTIMA

Temp. (°C)	Buffer (µl)	Extracto enzimático (µl)	Sacarosa 200 g/L (µl)	Abs 575 nm
50	233.0	17.0	250.0	0.291
60	233.0	17.0	250.0	0.546
70	233.0	17.0	250.0	0.686
80	233.0	17.0	250.0	1.028
90	233.0	17.0	250.0	0.853

Tabla 4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO
(°T = 75° C, 15 min, Vol. final = 500 µL)

Sacarosa [g/L]	Sacarosa [mM]	Sacarosa (µL)	Agua (µL)	Buffer 50 mM pH 5.5	Extracto enzimático (µL)	Abs (575 nm)
0.0	0.000	0.0	250.0	233.0	17.0	0.000
2.0	5.843	1.3	248.7	233.0	17.0	0.241
4.0	11.686	2.5	247.5	233.0	17.0	0.473
6.0	17.528	3.8	246.2	233.0	17.0	0.630
8.0	23.371	5.0	245.0	233.0	17.0	0.759
10.0	29.214	6.3	243.7	233.0	17.0	0.918
12.0	35.056	7.5	242.5	233.0	17.0	1.063
14.0	40.899	8.8	241.2	233.0	17.0	1.099
16.0	46.742	10.0	240.0	233.0	17.0	1.222
18.0	52.585	11.3	238.7	233.0	17.0	1.322
20.0	58.428	12.5	237.5	233.0	17.0	1.331
50.0	146.070	31.3	218.7	233.0	17.0	1.628
100.0	292.141	62.5	187.5	233.0	17.0	1.924
200.0	584.282	125.0	125.5	233.0	17.0	1.939
300.0	876.424	187.5	62.5	233.0	17.0	1.567
400.0	1168.565	250.0	0.0	233.0	17.0	1.587

Tabla 5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA
(Acetato de sodio 50 mM, °T = 75° C, 15 min.)

Tubo	Extracto enzimático (µl)	Buffer 50 mM pH 5.5	Sacarosa [200 g/L] (µl)	Abs (575 nm)
A	0.0	250.0	250.0	0.000
B	1.0	249.0	250.0	0.213
C	5.0	245.0	250.0	0.585
D	10.0	240.0	250.0	1.076
E	25.0	225.0	250.0	2.216
F	50.0	200.0	250.0	3.043

Tabla 6. CURVA ESTÁNDAR DE ALBÚMINA (BSA)
STOCK_{BSA} = [1000 µg/mL], Vol. FINAL = 1000 µL

BSA [µg/mL]	BSA (µL)	Agua (µL)	Azul de Coomassie	Abs 620 nm
0.0	0.0	500.0	500.0	0.000
2.0	1.0	499.0	500.0	0.158
4.0	2.0	498.0	500.0	0.176
6.0	3.0	497.0	500.0	0.192
8.0	4.0	496.0	500.0	0.265
10.0	5.0	495.0	500.0	0.293
20.0	10.0	490.0	500.0	0.398
40.0	20.0	480.0	500.0	0.603
60.0	30.0	470.0	500.0	0.750
80.0	40.0	460.0	500.0	0.798
100.0	50.0	450.0	500.0	0.891
120.0	60.0	440.0	500.0	0.950
140.0	70.0	430.0	500.0	1.052
160.0	80.0	420.0	500.0	1.160
180.0	90.0	410.0	500.0	1.166
200.0	100.0	400.0	500.0	1.206

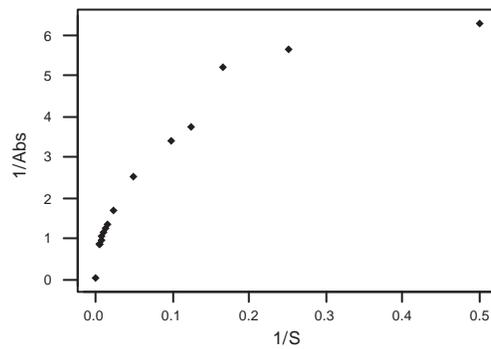


Figura 19. Curva patrón de BSA

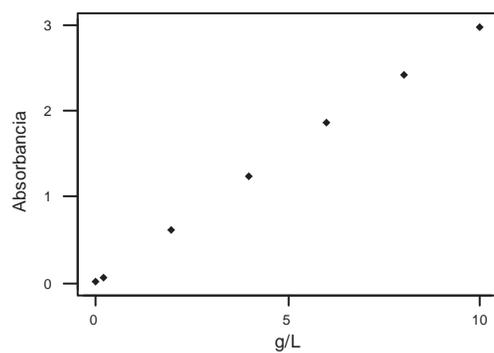


Figura 20. Curva patrón de glucosa y fructosa al 1 %

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., y López-Munguía, A. *Bioteología Alimentaria*. Primera edición. Editorial Limusa. México. 1993. pp. 636.
- [2] Bhosale, S. H., Rao, M. B., and Deshpande, V. V. 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews*. 60:280-300.
- [3] Cuevas-Arenas, M. A. 2004. Efectos del aumento de la demanda de jarabe de maíz de alta fructosa sobre la demanda de azúcar, análisis económico y econométrico. Tesis de grado. Magíster en Economía Agraria. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago-Chile. pp. 63
- [4] Santana de Almeida, A.C., Costa de Araújo, L., Mendes, A., Moraes de Abreu, C., Gomes de Andrade Lima, M., and Perez Fernandez Palha, M. 2005. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8:54-62.
- [5] Triana, O., Leonard, M., Saavedra, F., Fernández, N., Gálvez, G., y Peña, E. 1990. Atlas del bagazo de caña de azúcar. GEPLACEA/PNUD. México. pp. 143.
- [6] Sanjuán-Dueñas, R. 1997. Obtención de pulpa y propiedades de las fibras para papel. Agata Editores. México. pp. 293.
- [7] Rutiaga-Quiñones, J. G., Rivera-Prado, J. J., y Sanjuán-Dueñas, R. 2002. Blanqueo del parénquima de la caña de azúcar mediante la secuencia OD₁E_pD₂. *Ciencia Nicolaita*. 33:139-145.
- [8] Gutiérrez-Miceli, F. A., Arias-Castro, C., Dendooven, L., Méndez-Salas, R., Rodríguez-Mendiola, M. A., Ochoa-Alejo, N., y Bello-Pérez, L. A. 2002. Regulación enzimática de la acumulación de sacarosa en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* ssp.). *Agrociencia*. 36:411-419.
- [9] Australian Government. Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. The biology and ecology of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in Australia. 2004.
- [10] Chen, James C.P. *Manual del azúcar de caña. Para fabricantes de azúcar de caña y químicos especializados*. Editorial Limusa. México. 1997. pp. 1200.
- [11] Honig, Pieter. *Principles of sugar technology - Volume I*. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1982. pp. 645.
- [12] González, M. C., von Sachs Platz, J., and Roitsch, T. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. 9:606-613.
- [13] Nombres genéricos y Sistema Internacional de Numeración de Aditivos Alimentarios. CAC/GL 36-1989, Rev. 6-2001, Amd. 2006. *Codex Alimentarius*. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/7/CXG_036s.pdf, Consulta: 10/04/2007
- [14] <ftp://ftp.fao.org/codex/ccpfv23/pf2308as.pdf>, Consulta: 10/04/2007

- [15] http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_04/edulcorantes_abr04.pdf, Consulta: 11/04/2007
- [16] S.S. Patil, S.R. Kadam, K.B. Bastawde, J.M. Khire, and D.V. Gokhale. 2006. Production of lactic acid and fructose from media with cane sugar using mutant of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365. *Letters in Applied Microbiology*. 43:53-57.
- [17] Atiyeh, H., and Duvnjak, Z. 2001. Study of the production of fructose and ethanol from sucrose media by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:407-411.
- [18] Atiyeh, H., and Duvnjak, Z. 2002. Production of fructose and ethanol from sugar beet molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Biotechnol. Prog.* 18:234-239.
- [19] Atiyeh, H. K., and Duvnjak, Z. 2004. Purification of fructose syrups produced from cane molasses media using ultrafiltration membranes and activated carbon. *Separation Science and Technology*. 39:341-362.
- [20] Farone, W. A., and Cuzens, J. E. 2002. Procedimiento para la fabricación de azúcares mediante la hidrólisis con ácido fuerte de materiales celulósicos y hemicelulósicos. Oficina Española de Patentes y Marcas. Número de publicación: 2166776.
- [21] Tomotani, E. J., and Vitolo, M. 2006. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *Journal of Food Engineering*. Science Direct [online].
- [22] Arruda, L.M.O., and Vitole, M. 1999. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 81:23-33.
- [23] Rodrigues, Marili V.N.; Rodrigues, Rodney A.F.; Serra, Gil E.; Andrietta, Silvio R., and Franco, Telma T. 2000. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea através de planejamento experimental. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. 20:103-109.
- [24] Yanai, K., Nakane, A., Kawate, A., and Hirayama, M. 2001. Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:766-773.
- [25] Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., and Czjzek, M. 2004. The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *The Journal Of Biological Chemistry*. 279:18903–18910.
- [26] Liebl, W., Brem, D., and Gotschlich, A. 1998. Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:55-64.
- [27] <http://perso.orange.fr/svt.ronsard/svt.ronsard/travaux/exper/invertase/intro.htm>
- [28] http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/

parte07/02.html, Consulta: 21/03/07.

- [29] Kurup, A. S., Subramani, H. J., Hidajat, K., and Ray, A. K. 2005. Optimal design and operation of SMB bioreactor for sucrose inversion. *Chemical Engineering Journal*. 108:19-33.
- [30] Rodrigues, M. V. N., Rodrigues, R. A. F., Serra, G. E. *et al.* 2000. Improvement of invert syrup production using heterogeneous hidrolisis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. Vol. 20:1 pp. 103-109. ISSN 0101-2061.
- [31] Serna-Saldívar, S. R., y Rito-Palomares, M. A. 2005. Production of invert syrup from sugarcane juice using immobilized invertase. United States Application 20050084939. <http://www.freepatentsonline.com/20050084939.html>, Consulta: 29/03/2007.
- [32] Clarke, M. A., and Godshall, M. A. *Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane*. Sugar Series 9. Elsevier Sci. Publishers. 1988. Amsterdam, Netherlands. pp. 265-291.
- [33] Mann, A. P. S., Sachdeva, M. Batta, and S. K. Parveen. 2003. Purification and characterization of proteinaceous invertase inhibitor from sugarbeet roots and its interaction with sugarcane invertase. *Sugar Cane International*. pp. 25-29.
- [34] Donovan, M. *Sugar. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Vol. 7., R. Macrae, R. Robinson, and M. Sadler (eds.) Academic Press, London, UK. 1993. pp. 4441-4464.
- [35] Glasziou, K. T. 1969. Control of enzyme formation and inactivation in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 20:63-88.
- [36] Trojanowicz, M., Compagnone, D., Gonçalves, C., Jónca, Z., and Palleschi, G. 2004. Limitations in the analytical use of invertase inhibition for the screening of trace mercury content in environmental samples. *Analytical Sciences*. 20:899-904.
- [37] Kim, J. H., Ryu, Y. B., Kang, N. S., Lee, B. W., Heo, J. S., Jeong, I-Y., and Park, K. H. 2006. Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 29:302-305.
- [38] Sizer, I. W., and Fennessey, J. F. 1950. The inactivation of invertase by tyrosinase. II. The influence of copper and gold on the oxidation of invertase and pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*. pp. 351-359.
- [39] Vorster, D. J., and Botha, F. C. 1998. Partial purification and characterisation of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry*. 49:651-655.
- [40] <http://www.lenntech.com/espanol/floculacion.htm>, Consulta: 16/04/2007
- [41] Castellan, G. W. *Fisicoquímica*. Segunda edición. Addison Wesley Longman. México. 1998. pp. 1057.
- [42] Equipo Didáctico Océano. *Vocabulario Científico-Técnico*. Editorial Océano. España. 2004. pp. 490.
- [43] GEA Filtration. Biblioteca de GEA Filtration. Folletos de GEA Filtration. *Filtración por*

- membranas* - Osmosis inversa, Nanofiltración, Ultrafiltración y Microfiltración. http://www.geafiltration.com/Espanol/fpdfs/Niro_filt.pdf, Consulta: 30/06/2006
- [44] <http://www.lenntech.com/espanol/Tecnologia-de-membrana.htm>, Consulta: 16/04/2007
- [45] *Industria alimentaria. Tecnologías emergentes*. 2005. Capítulo 6. *Tecnología de membranas*. <http://www.edicionsupc.es/ftppublic/pdfmostra/CT00804M>, Consulta: 10/04/2007
- [46] Sharma, Shri K., Mulvaney, Steven J., y Rizvi, Syed S.H. *Ingeniería de Alimentos. Operaciones unitarias y prácticas de laboratorio*. Editorial Limusa. México. 2003. pp. 348.
- [47] Godshall, M.A., Iqbal, K., Moore, S., and Triche, R. 1999. Potential new product development using membranes. Proceedings of the Sugar Processing Research Institute, Inc., Symposium on Advanced Technology for Cane and Beet Refined Sugar Production, New Orleans, LA, USA, (C-11), (Abstract).
- [48] Saska, M. 2000. Method for producing white sugar. US Patent, No. 6,096,136.
- [49] GEA Filtration. Biblioteca de GEA Filtration. Folletos de GEA Filtration. *Filtración por membranas* - Industrias del Azúcar, Almidones y Edulcorantes. <http://www.geafiltration.com/fpdfs/starch&sweetners.pdf>, Consulta: 30/06/2006.
- [50] Dow Liquid Separation. 2000. DOWEX Ion Exchange Resins. Fundamentals of Ion Exchange. Dow Chemical U. S. A. pp. 7.
- [51] Dow Liquid Separations. 2002. DOWEX Ion Exchange Resins. The use of DOWEX ion exchange resins and adsorbents in corn sweetener processing. Dow Chemical U. S. A. pp. 9.
- [52] Harm F., German Patent 95, 447 (1896).
- [53] Adams, B. A. and Holmes, E. L., J. Soc. Chem. Ind. 54 (1935) 1-6T.
- [54] Smit P., U. S. Patent 2 564 820, August 21, 1951. Application filed in Holland, October 18, 1939, in U. S. October 3, 1940.
- [55] Vallez, H. A., U. S. Patent 2 388 194, October 30, 1945. U. S. Patente 2 388 195, October 30, 1945.
- [56] A. Elmidaoui, F. Lutin, L. Chay, M. Taky, M. Tahaikt, and My R. Alaoui Hafidi. 2002. Removal of melassigenic ions for beet sugar syrups by electrodialysis using a new anion-exchange membrane. *Desalination*. 148:143–148.
- [57] Dow Liquid Separations. Dowex Ion Exchange Resins. DOWEX ion exchange resins for HFCS deashing and polishing. Reference Manual. Dow Chemical U. S. A. pp. 18.
- [58] Sedmak, J. J., and Grossberg, S. E. 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*. 79:544-552.
- [59] Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426.