

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA α -GLUCOSIDASA COMO POSIBLE INDICADOR DE ADULTERACIÓN EN MIELES

M. Federico⁽¹⁾, A. Turina^(2,3)

mfederico@inti.gov.ar

⁽¹⁾ Dto. de Química Analítica y Residuos Urbanos-DT Centro-SOR Centro-GOAR-INTI.

⁽²⁾ Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Cátedra de Química Biológica, Córdoba, Argentina.

⁽³⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT), Córdoba, Argentina.

Palabras Clave: azúcares; *Apis mellifera*; calidad; Argentina

INTRODUCCIÓN

La principal adulteración intencional de la miel se debe a la adición de azúcares invertidos o jarabes los cuales son obtenidos principalmente de la hidrólisis del almidón del maíz (jarabe de glucosa y jarabe de maíz de alta fructosa), por ser estos productos de menor valor comercial y de fácil acceso. Se considera adulteración porque la reglamentación aplicable a la miel prohíbe el agregado de aditivos de cualquier tipo [1], [2]. Esta adulteración puede no ser fácilmente detectable mediante el análisis directo del azúcar porque sus componentes son los principales componentes naturales de la miel y por lo tanto el producto adulterado tendría propiedades físicas similares a la miel natural [3]. Estos aditivos pueden ser detectados en la miel por contener dextrinas (azúcares superiores) provenientes del proceso de fabricación de estos jarabes siendo inexistentes en las mieles naturales [4]. Existen diversos métodos de análisis capaces de detectar estos azúcares y cuantificarlos, sin embargo, todos ellos requieren de equipamientos costosos y personal especialmente formado.

En este trabajo se estudió la posible influencia de azúcares invertidos en la actividad enzimática de la α -glucosidasa de la miel, pudiendo ser esta enzima un indicador de adulteración.

OBJETIVOS

Estudiar el efecto de la adulteración por agregado de azúcares invertidos a mieles genuinas sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron cuatro mieles genuinas, proporcionadas por la Cooperativa Apícola Villa de Soto del Dpto. de Cruz del Eje, Córdoba, Argentina.

Se utilizó para adulterar las mieles un jarabe mezcla marca Sucrodex. Se prepararon muestras de miel adulteradas con jarabe 10% P/P y 20 % P/P en solución buffer-fosfato. De igual modo se prepararon muestras control con 10 % P/P y 20 % P/P con agua destilada para poder comprobar que las posibles variaciones en la actividad enzimática son debido al agregado de azúcares invertidos y no por la dilución de las muestras.

Se determinó la actividad α -glucosidasa de las mieles genuinas y adulteradas a distintas temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 60 °C) para luego graficar la actividad específica vs. la temperatura.

La actividad α -glucosidasa se determinó mediante el método de referencia N° 9 publicado por la IHC [5], basado en el método Siegenthaler que utiliza el sustrato artificial 4-nitrofenil- α -D-glucopiranososa (pNPG). El método fue adaptado para trabajar con pequeños volúmenes. Los resultados fueron expresados como actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) para poder comparar los resultados entre mieles.

La proteína en miel fue determinada por el método Bradford [6].

RESULTADOS

Todas las mieles exhibieron la mayor actividad α -glucosidasa a los 40°C y una reducción abrupta de la actividad a partir de los 50°C.

Las diferencias observadas entre las mezclas de miel con 10 % P/P de jarabe y la muestra control no fueron significativas, sin embargo, si se observaron diferencias significativas cuando la mezcla contiene 20 % P/P de jarabe (Figura 1).

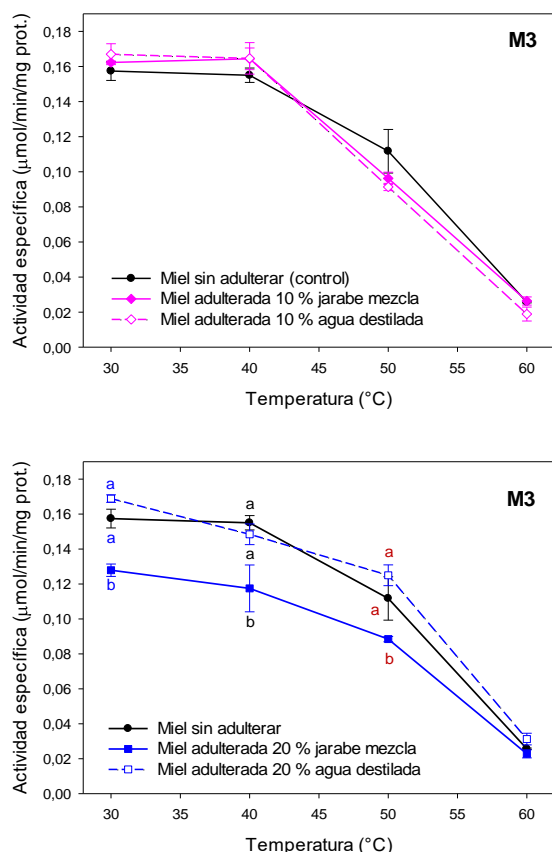


Figura 1: Actividad específica de α -glucosidasa de la miel M3 a distintas temperaturas ($P= 0,050$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversos estudios publicados podrían indicar que la actividad de la α -glucosidasa de la miel es inhibida por glucosa, entre otros factores [7]. Si bien la afinidad por el sustrato de la α -glucosidasa (pNPG) es muy alta, la enzima también está hidrolizando, aunque en menor medida, la sacarosa presente en la muestra. El agregado de fructosa y glucosa podría estar estimulando la ocurrencia de las reacciones inversas, no solo de hidrólisis de pNPG sino también la de hidrólisis de sacarosa, estableciéndose un nuevo equilibrio en donde se hidroliza menos pNPG [8]. Otra explicación para la inhibición de la hidrólisis de pNPG en presencia de jarabe podría estar relacionada con el contenido de maltosa, maltotriosa y restos de azúcares del jarabe, ya que la maltosa también es reconocida como sustrato por la enzima [8]. Además de trehalosa y glucosa, no hemos encontrado reportes sobre el efecto de otros azúcares sobre la hidrólisis de pNPG por la α -glucosidasa de la miel, este es un aspecto que debería evaluarse para echar luz sobre el mecanismo por el cual la enzima puede detectar la adulteración con este jarabe y podría ser el objetivo de futuros trabajos. La mayor actividad α -glucosidasa a los 40°C coincide con la temperatura óptima reportada para α -

glucosidasa III obtenida a partir de glándulas salivales *Apis mellifera* [9].

En principio no podemos decir que la actividad α -glucosidasa puede ser un indicador de adulteración cuando la adulteración es inferior al 20 % P/P. Sin embargo, la actividad de la α -glucosidasa fue exitosa para revelar la adulteración de la miel a partir del 20 % P/P de jarabe, lo que representa la detección de aproximadamente un 6 % P/P de glucosa proveniente del jarabe. Los resultados obtenidos de esta experiencia muestran que la actividad de α -glucosidasa es un método sensible y prometedor para detectar la adulteración en mieles por el agregado de jarabes de maíz siendo una primera aproximación al desarrollo de un método sencillo, considerando que no hay trabajos de este tipo realizados. Será necesario mejorar el diseño del experimento para incluir mayor cantidad de muestras en el ensayo, probar mayores concentraciones de adulterante y evaluar la capacidad de otros azúcares presentes en el jarabe para inhibir la hidrólisis del pNPG.

AGRADECIMIENTOS

Al INTI que financió el trabajo y puso a disposición sus laboratorios. A Dra. Anahí V. Turina (quien dirigió este trabajo en el marco de una tesis de maestría [7]) y al laboratorio IIBYT-UNC que contribuyó con su equipamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAA. Res. GMC N° 015/94 Reglamento Técnico MERCOSUR de identidad y calidad de miel.
- [2] Codex Alimentarius. (2019). CXS 12-1981 enmienda 2019.
- [3] Mehryar, L., & Esmaili, M. (2011). Honey & honey adulteration detection: a review. Proceedings of 11th International Congress on Engineering and Food.
- [4] INTI. (2009). Programa: Pruebas de desempeño de productos. Informe de análisis de miel. Buenos Aires: INTI.
- [5] Harmonised Methods of the International Honey Commission. (2009). <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- [6] Bio-Rad Protein Assay. (s.f.). <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>
- [7] Federico, M. (2021). Estudio de la actividad invertasa en mieles del departamento Cruz del Eje (Córdoba): tratamiento térmico y posible adulteración. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. <http://hdl.handle.net/11086/22083>
- [8] Huber R. E., & Mathison R. D. (1976). Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). *Can J. Biochem*, 54 (2), 153-164. doi:10.1139/o76-023
- [9] Nishimoto, M., Kubota, M., Tsuji, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., & Chiba, S. (2001). Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α -glucosidase III. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(7), 1610-1616.