

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INVERTASA EN MIELES DEL DEPARTAMENTO DE
CRUZ DEL EJE (CÓRDOBA). TRATAMIENTO TÉRMICO Y POSIBLE
ADULTERACIÓN.**

Por

Ing. Mónica M. Federico

Directora: Dra. Anahí V. Turina

Lugar de trabajo



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS Y TECNOLÓGICAS (IIBYT) - FACULTAD DE

CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES - UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL - CENTRO REGIONAL CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2021

COMISIÓN EVALUADORA

Nombre: Dra. María Verónica Nolan

Lugar de trabajo: IIBYT (Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas), ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos) FCEfN-UNC, CCT (Centro Científico Tecnológico CONICET-Córdoba)

Nombre: Dra. María Verónica Baroni

Lugar de trabajo: ICYTAC (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba), CCT (Centro Científico Tecnológico CONICET-Córdoba)

Nombre: Mgter. María Clemencia Barberena

Lugar de trabajo: Agencia de Extensión Rural, INTA Cruz del Eje.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar: Auditorio del Edificio Integrador de la Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

Fecha: 16/12/2021

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

DEDICATORIA

A mi madre, allí donde quiera que esté.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial y a sus autoridades por haber financiado esta tesis y brindarme los recursos necesarios para su conclusión.

A la Dra. Sara Eugenia Molina, del Departamento de Alimentos Centro, sede Cruz del Eje de INTI, quién me brindó sus conocimientos, experiencia y realizó los contactos necesarios con la Cooperativa Apícola Villa de Soto para la visita a planta y obtención de las mieles objeto de este estudio.

Al Ing. Agr. Oscar Demarchi, miembro y tesorero de la Cooperativa Apícola Villa de Soto, por su interés en este trabajo y poner a la Cooperativa a mi disposición.

A la Ing. Silvia Ermeninto, jefa del Departamento de Química Analítica y Residuos Urbanos Centro del INTI, y a su equipo de colaboradores quienes me permitieron utilizar las instalaciones y recursos del laboratorio químico.

A la Dra. María Angélica Perillo, quién fuera la directora del IIBYT al momento de iniciar mi tesis, por haber aceptado que realice mi tesis en el IIBYT y poner a mi disposición su personal, laboratorio y recursos para la concreción de esta; y a todo el equipo de profesionales por la colaboración prestada y la confianza recibida.

A las autoridades y docentes de la Maestría, quienes supieron llevar adelante un postgrado de nivel académico.

Y en particular, un agradecimiento sumamente afectuoso, a mi directora de tesis, la Dra. Anahí Turina, que, con su capacidad docente, conocimientos técnicos, disponibilidad constante y paciencia infinita supo orientarme y hacer posible que pudiera lograr los objetivos planteados en esta tesis.

A todos, muchísimas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
1 INTRODUCCIÓN	14
1.1 La miel	14
1.2 Enzima α -glucosidasa (invertasa) y otras enzimas de la miel	15
1.3 Procesado de la miel	17
1.4 Cristalización de la miel y tratamientos térmicos	20
1.5 Calidad de la miel y la actividad enzimática como indicador	21
1.6 Adulteración	22
1.7 Cooperativa Apícola Villa de Soto	24
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
2.1 Hipótesis	25
2.2 Objetivos	25
3 MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Reactivos y equipos	26
3.2 Muestras de mieles	27
3.3 Determinación de actividad de α -glucosidasa	28
3.4 Determinación de la fluorescencia intrínseca de la α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.5 Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos de α -glucosidasa en miel	35
3.6 Tratamiento térmico de mieles simulados en laboratorio	36
3.7 Adulteración de miel con jarabe mezcla y determinación de actividad α -glucosidasa	37
3.8 Determinación de proteína en miel	38
3.9 Determinación de parámetros físico-químicos en mieles	39
Estudio de la actividad invertasa en mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba). Tratamiento térmico y posible adulteración. (Mónica Federico)	4

3.10	Análisis estadístico de resultados y gráficos	40
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1	Características físico-químicas de las mieles estudiadas	40
4.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estructura de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	42
4.3	Efecto de la temperatura y tratamientos térmicos simulados en laboratorio sobre la actividad α -glucosidasa en miel	56
4.4	Efecto de la adulteración de miel con jarabe mezcla en la actividad α -glucosidasa	68
5	CONCLUSIONES	73
6	PROYECCIONES FUTURAS	74
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÉNDICES	80
	Apéndice 1: Diagrama de flujo de procesamiento y fraccionamiento de miel	80
	Apéndice 2: Pasterurizador M3 marca Farli	81
	Apéndice 3: Tabla comparativa de requisitos mínimos establecidos para mieles según el CAA, la Resolución GMC N° 015/94, CODEX STAN 12:1981 e IHC	82
	Apéndice 4: Efecto en la actividad enzimática de los tratamientos térmicos aplicados en cada miel (M1, M2, M3 y M4)	83
	Apéndice 5: Efecto de la adulteración con jarabe mezcla en la actividad α -glucosidasa en cada miel (M1, M2, M3 y M4)	90
	Apéndice 6: Certificado de análisis del Jarabe Mezcla marca Sucrodex, de QUIMINSA	95
	Apéndice 7: Presentación del trabajo en el VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina	96

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Procedencia e identificación de las mieles utilizadas.	28
Tabla 2: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de tiempo de enzima α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
Tabla 3: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de enzima α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
Tabla 4: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de cinética de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	33
Tabla 5: Esquema del diseño de experimento para la determinación del efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia de la α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	34
Tabla 6: Detalle de la construcción de cada muestra para la determinación de la actividad de la α -glucosidasa de la miel.	35
Tabla 7: Construcción de cada muestra para la determinación de la curva de actividad enzimática en la miel M1.	36
Tabla 8: Construcción del experimento de los 10 tratamientos térmicos usados en mieles.	36
Tabla 9: Construcción de las muestras para la determinación de adulteración.	38
Tabla 10: Caracterización físico química de las mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba).	41
Tabla 11: V_{max} y K_m obtenidos experimentalmente para temperaturas de incubación 30, 40, 50 y 60°C para la α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> .	50
Tabla 12: Porcentaje de intensidad de fluorescencia (IF) respecto a la IF a 25 °C de solución de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> a temperaturas de calentamiento y enfriamiento.	54
Tabla 13: Resultados obtenidos de NI para las cuatro mieles del Departamento de Cruz del Eje y valores obtenidos por el Laboratorio INTI-Agroalimentos.	60
Tabla 14: Porcentaje de disminución de la actividad enzimática en mieles después de recibir tratamientos térmicos simulados en laboratorio.	63
Tabla 15: NI de las muestras control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de las muestras con tratamientos térmicos para las cuatro mieles.	66
Tabla 16: Concentración de glucosa en mieles y jarabe mezcla, y las concentraciones finales de las mezclas realizadas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe.	69
Tabla 17: Concentración de fructosa en mieles y jarabe mezcla, y las concentraciones finales de las mezclas realizadas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe.	69
Tabla 18: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M1.	84
Estudio de la actividad invertasa en mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba). Tratamiento térmico y posible adulteración. (Mónica Federico)	6

Tabla 19: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M2.	86
Tabla 20: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M3.	87
Tabla 21: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M4.	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura tridimensional de α -glucosidasa de <i>Apis mellifera</i> (variante III).	16
Figura 2: Hidrólisis de la sacarosa (α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido) con la enzima α -glucosidasa.	17
Figura 3: Departamentos que conforman el Noroeste de Córdoba.	25
Figura 4: Mecanismo de transformación del pNPG por la acción de la α -glucosidasa.	28
Figura 5: Termopar digital y ubicación dentro de tubo de Khan con la muestra; y disposición de los tubos en la gradilla.	37
Figura 6: Curva de calibración de pNP ⁻ en medio buffer-fosfato y Tris-HCl pH 9,0 a 24 °C.	43
Figura 7: Curvas de tiempo para concentraciones de sustrato (pNPG) de 0,6 mM y 17 mM a concentración constante de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> enzima.	45
Figura 8: Relación entre la concentración de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> y la A_{400nm} como medida de velocidad de reacción.	46
Figura 9: Curva de sustrato para la actividad de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> a temperaturas de incubación de 30, 40, 50 y 60 °C.	47
Figura 10: Variación de la velocidad de formación de producto de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> a temperaturas de incubación de 30, 40, 50 y 60 °C a distintas concentraciones de pNPG.	49
Figura 11: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y la afinidad de la α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> para la hidrólisis de pNPG. La línea de puntos azul señala la temperatura óptima para la enzima.	50
Figura 12: Espectros de fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> durante el proceso de calentamiento.	52
Figura 13: Porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia (IF) respecto a la IF a 25 °C de solución de α -glucosidasa purificada a partir de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> .	53
Figura 14: Efecto del ciclo de calentamiento-enfriamiento sobre los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa de <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	55
Estudio de la actividad invertasa en mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba). Tratamiento térmico y posible adulteración. (Mónica Federico)	8

Figura 15: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la α -glucosidasa en la miel M1. 56

Figura 16: Curva de sustrato para la actividad de α -glucosidasa de la miel a 40 °C para la miel M1. 59

Figura 17: Gráfico de NI para el control y muestras con tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio a 60 °C y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 min con calentamiento previo de 50 °C por 30 min. Para cada grupo, las medias con una letra común no son significativamente diferentes para $p \leq 0,05$ (Análisis de varianza con test a posteriori LSD de Fisher). La línea de puntos azul señala el valor mínimo recomendado internacionalmente de NI. 61

Figura 18: Gráfico de NI para el control y muestras con tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio a 70 °C y tiempos de exposición de 1 min 30 s, 3, 5, 10, 15 y 20 min con calentamiento previo de 50 °C por 30 min. Para cada grupo, las medias con una letra común no son significativamente diferentes para $p \leq 0,05$ (Análisis de varianza con test a posteriori LSD de Fisher). La línea de puntos azul señala el valor mínimo recomendado internacionalmente de NI. 62

Figura 19: Gráfico de puntos de actividad α -glucosidasa expresada como actividad específica según tratamientos a 60 °C y 70 °C a iguales tiempos (5, 10, 15 y 20 min) para las mieles M1, M2, M3 y M4. Comparación de pares de datos para cada tiempo (5, 10, 15 y 20 min) y prueba de significancia a través del test de Student. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). 64

Figura 20: Gráfico de barra de NI para las muestras control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para las cuatro mieles. 66

Figura 21: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de las mieles M3 y M4 a distintas temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P = 0,050$). 71

Figura 22: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M1. 84

Figura 23: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M2. 85

Figura 24: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M3. 87

Figura 25: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M4. 88

Figura 26: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M1 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student (P= 0,050). 91

Figura 27: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M2 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student (P= 0,050). 92

Figura 28: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M3 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student (P= 0,050). 93

Figura 29: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M4 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student (P= 0,050). 94

ABREVIATURAS

ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Asp	Ácido aspártico
CAA	Código Alimentario Argentino
CXS	Codex Alimentarius Standard
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada
Glu	Ácido glutámico
GMC	Grupo Mercado Común
HMF	Hidroximetilfurfural
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPLC-IRMS	Cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrómetro de masas de relación isotópica
IF	Fluorescencia intrínseca
IHC	International Honey Commission
INTI	Instituto Nacional de Tecnología Industrial
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
JMAF	Jarabe de maiz de alta fructosa
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
NI	Número de invertasa
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/P	Peso en peso
pNP	4-nitrofenol
pNP ⁻	4-nitrofenolato
pNPG	4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (también α -PNPG)
β -PNPG	4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
RENAPA	Registro Nacional de Producciones Apícolas
SAGPyA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
SCIRA	Espectroscopía de masa de carbono
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
TLC	Cromatografía de capa fina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

RESUMEN

La miel es un producto natural complejo constituido principalmente por hidratos de carbono, agua y otros constituyentes en menor proporción como ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, enzimas, sustancias aromáticas, minerales, pigmentos, etc. Su calidad disminuye con el sobrecalentamiento, el envejecimiento y la adulteración. En ese sentido, las reglamentaciones de cada país y Codex Alimentarius exigen ciertos parámetros de calidad utilizando indicadores como el contenido de 5-hidrometilfurfural y la actividad diastasa. Sin embargo, la actividad α -glucosidasa (también llamada invertasa) es más sensible al calor que la actividad diastasa considerándose un mejor indicador. La adulteración, consiste en el agregado de azúcares y jarabes industriales para obtener mieles más fluidas que resultan atractivas para el consumidor, son más económicas y facilitan los procesos industriales. En este trabajo proponemos determinar algunos parámetros fisicoquímicos de mieles del Departamento de Cruz del Eje y estudiar el efecto de tratamientos térmicos simulados en laboratorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa presente en la miel para brindar sugerencias de tiempo y temperatura en los procesos térmicos a los cuales es sometida. Además, dado que los adulterantes podrían interferir la hidrólisis del sustrato artificial de la α -glucosidasa (4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido), se propone estudiar este efecto para identificar una posible adulteración. A modo de referencia y para poner a punto el método, se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad y también sobre la estructura de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para este trabajo se estudiaron cuatro mieles genuinas de productores del Dpto. de Cruz del Eje (Córdoba). Los tratamientos térmicos, simulados en laboratorio, consistieron en el calentamiento a temperaturas equivalentes a las utilizadas en las salas de extracción de miel para la "pasteurización" (60 °C y 70 °C) y distintos tiempos con precalentamiento. La adulteración intencional se realizó con jarabe mezcla de uso alimentario comercial al 10% P/P y 20 % P/P. La actividad α -glucosidasa fue determinada por el método modificado Siegenthaler recomendado por la International Honey Commission. Los resultados fueron expresados como Número de Invertasa (NI), M/min, μ moles/min o como actividad específica según el caso. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron utilizando el modelo de Michaelis-Menten en el rango de 30 °C a 60 °C.

La temperatura óptima para la actividad de la enzima purificada de *Saccharomyces cerevisiae* fue 40 °C ($K_m=0,22 \text{ mM} \pm 0,02$, $V_{max}=1,81 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$ de proteína). Por encima de esta temperatura la actividad disminuyó, lo que fue coherente con la pérdida irreversible de estructura de la proteína evidenciada por la disminución de su intensidad de fluorescencia intrínseca (IF) a temperaturas superiores a los 40 °C. Un comportamiento similar se observó para la enzima presente en las mieles.

Todas las mieles tratadas térmicamente experimentaron una disminución del NI respecto al control. Los tratamientos que llevaron a una disminución del NI por debajo de 10, mínimo recomendado internacionalmente, fueron aquellos a 60 °C por más de 15 min y a 70 °C por más de 10 min. El promedio de la reducción de la actividad α -glucosidasa fue del 33 % para las mieles que recibieron un tratamiento a 60 °C por 20 min y de 37 % para las mieles que recibieron un tratamientos a 70 °C por 15 min y 20 min, con un precalentamiento a 50 °C por 30 min y enfriamiento posterior en todos los casos.

La actividad α -glucosidasa permitió distinguir la adulteración de la miel a partir del 20 % P/P de jarabe.

Este trabajo permitió adaptar el método recomendado por la IHC para la determinación de α -glucosidasa a volúmenes pequeños compatibles con el uso de espectrofotómetros, particularmente en lectores de placa permitiendo economizar reactivos y tiempo de medición.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La miel

La miel es un producto natural elaborado por las abejas melíferas (*Apis mellífera*) a partir del néctar de las flores o mielada. Es considerada un producto alimenticio el cual ha sido consumido desde épocas remotas por el hombre. Aunque se le conocen otros usos (en medicina, cosmética, como preservador de alimentos, etc.) (Bogdanov S., *et al.*, 2009), se puede afirmar que su principal uso es como alimento y/o edulcorante tanto para consumo directo o uso industrial como ingrediente en preparaciones alimenticias.

Por tratarse de un alimento, el Codex Alimentarius, organismo que depende de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), ha establecido los parámetros de calidad/inocuidad de la miel y sus límites aceptables. La norma aplicable, con sus correspondientes modificaciones, es la CXS 12-1981. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) es el que fija la norma a aplicar en el territorio argentino. Los parámetros para cumplir se encuentran descriptos en el Capítulo X del Código a partir del artículo 782. La aplicación en el MERCOSUR (Mercado Común del Sur) está establecida en la Resolución GMC N° 015/94.

El CAA define por miel “el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena” (CAA, 1995). En Argentina es considerada un producto de origen animal, y si bien el CAA dentro de la órbita del ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) da las disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológica y de identificación comercial del producto; el control para su elaboración y comercialización está a cargo del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (SAGPyA-SENASA, 2006).

Químicamente, la miel es una solución concentrada de azúcares. En promedio los carbohidratos de la miel no superan el 82,3 %. Alrededor del 90% del total de azúcares en la miel están conformados por dos azúcares simples: glucosa y fructosa en porcentajes aproximados de 40 % y 30 % respectivamente, dependiendo esto del origen botánico. Estos productos provienen de la descomposición de la sacarosa la cual también se encuentra

presente la miel, pero en muy baja proporción (Baglio, 2018). Contiene, además, una mezcla compleja de otros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen. Las proteínas presentes en la miel provienen fundamentalmente del polen. El color varía de casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, o total o parcialmente cristalizada.

La miel es operculada por la abeja en el panal conteniendo normalmente entre 17 % y 18 % de agua, superando este valor sufre problemas de fermentación por falta de madurez de la miel (Baglio, 2018). Según la legislación argentina, el contenido de agua no puede superar el 18 % y no debe contener ningún tipo de aditivos ni conservantes para ser comercializada (CAA, 1995).

Las características de la miel dependen de los néctares que le dieron origen, de las condiciones del suelo y el ambiente donde crecieron las plantas que aportaron esos néctares, de la época de la cosecha y genética de la abeja reina. La caracterización de una miel se define a través de análisis fisicoquímicos, polínicos y sensoriales. (Gaggiotti, M., *et al.*, 2009; Costa, *et al.*, 2016).

En resumen, la miel es la transformación del néctar (solución conformada por un 60% de agua, sacarosa, glucosa, fructosa, aminoácidos y minerales) recolectado por las abejas, llevado a la colmena donde sufre un proceso de transformación, básicamente reducción del contenido de agua y la conversión de la sacarosa en glucosa y fructosa gracias a la acción de la enzima invertasa segregada por las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras. Este proceso continúa después de la extracción y depende del tiempo y tipo de almacenamiento (White J. W., 1979).

1.2 Enzima α -glucosidasa (invertasa) y otras enzimas de la miel

La principal enzima de la miel, que proviene de las abejas melíferas y es responsable de la descomposición de la sacarosa del néctar en azúcares invertidos como glucosa y fructosa, fue denominada inicialmente como invertasa (White J. W., 1979). Esta enzima es una α -glucosidasa (EC 3.2.1.20 según la nomenclatura de la IUBMB o también α -D-glucoside glucohidrolasa). En el cuerpo de las abejas, se ha identificado la presencia de varios tipos de invertasas (tipo I, II y III). De ellas, la variante tipo III, presente en las glándulas hipofaríngeas de la *Apis mellifera*, es la que es agregada al néctar para su

conversión en miel durante la maduración en la colmena (Kubota M., *et al.*, 2004). La α -glucosidasa de *Apis mellifera* (variante III) presenta una estructura de Barril (β/α)₈ de 567 aminoácidos, siendo su peso molecular 65.565. En la Figura 1 se muestra un modelo por homología basado en la sacarosa hidrolasa de "Bombyx mori GH13".

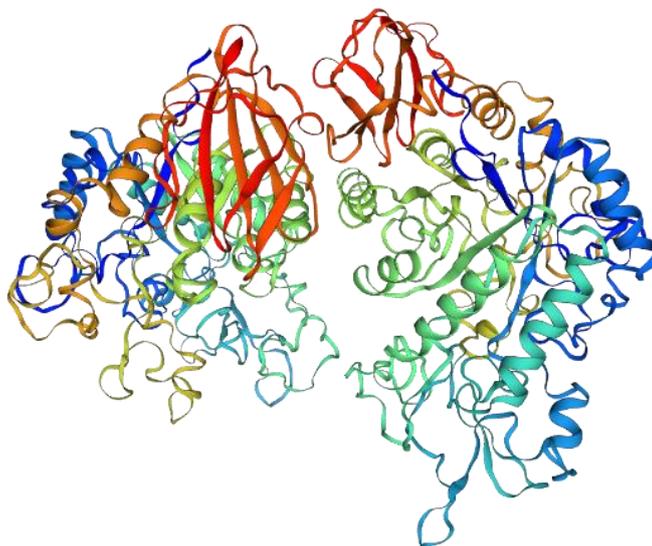


Figura 1: Estructura tridimensional de α -glucosidasa de *Apis mellifera* (variante III). Modelo por homología basado en la sacarosa hidrolasa de "Bombyx mori GH13" [H9J974](https://www.rcsb.org/entry/H9J974), [6lga.1.A](https://www.rcsb.org/entry/6lga.1.A), SMTL Version 2021-08-11; Seq Identity 44,92%. Average Model Confidence (QMEANDisCo): $\pm 0,05$. (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q17058?csm=A14D88DD657C99C2>).

El hecho de que instituciones como la International Honey Commission, creada en 1990 para generar una norma internacional de miel, en su compilado "Harmonised methods of the International Honey Commission" utilice la denominación actividad invertasa para referirse a la actividad de la α -glucosidasa (Pontoh, 2001; Huber R. E & Mathison R. D., 1976) y que la IUBMB ha reservado el nombre de "invertasa" para la β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), ha generado confusiones en algunos trabajos de investigación de enzimas en miel.

La α -glucosidasa de la miel es una glucosil hidrolasa que hidroliza los enlaces glucosídicos, α -1,4 del extremo no reductor de un sustrato, generando como producto α -D-glucosa. Es decir que es una exoamilasa que actúa mediante un mecanismo que conserva el estado anomérico de la molécula. Estas enzimas a menudo poseen la capacidad de transglicosilación (Huber R. E & Mathison R. D., 1976).

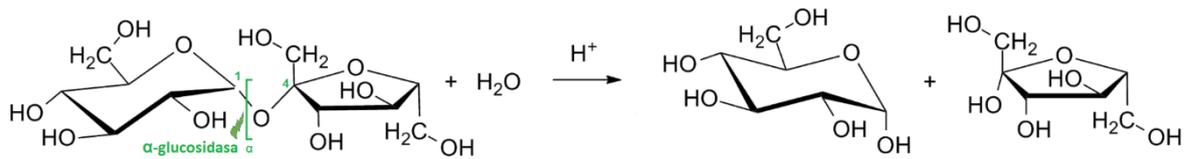


Figura 2: Hidrólisis de la sacarosa (α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido) con la enzima α -glucosidasa.

En la miel también existe la β -glucosidasa, descubierta en ensayos de rutina de la α -glucosidasa pero en vez de usar como sustrato α -PNPG se sustituyó por el β -PNPG, sin embargo esta enzima no interviene en el desdoblamiento de la sacarosa por contener α -glucosa ligada (Low N., *et al.*, 1986). También se encuentran otras enzimas, como la diastasa, que descompone los almidones en glucosa. Esta última es la más conocida ya que se dispone de métodos sencillos para medir su actividad y como es inestable frente al calor reporta información sobre la calidad de la miel (White J. W., 1979).

1.3 Procesado de la miel

Argentina es el tercer productor de miel a nivel mundial después de China y Estados Unidos. Entre el 90 % y el 95 % de la producción se exporta a granel. Según datos del RENAPA (Registro Nacional de Productores Apícolas) de 2019 existen más de 11000 productores registrados y casi 3 millones de colmenas (RENAPA, 2019). Córdoba es la cuarta provincia con mayor producción en el país, muy cerca de Santa Fe quién ocupa el tercer lugar. El 95 % de la producción es realizada por pequeños productores apícolas (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019).

La miel es comercializada a granel o fraccionada, por lo cual sufre un proceso de extracción de la colmena. Este proceso tiene diversas etapas según la cantidad de miel a procesar y calidad deseada. La miel puede contener polen, cera de abeja y otros materiales indeseados como levaduras, los cuales son removidos para mejorar la calidad y la inocuidad.

Existen dos procesos de práctica habitual en establecimientos productivos que son el filtrado y el calentamiento. El filtrado separa los materiales no deseados y los procesos térmicos eliminan microorganismos responsables del deterioro, reducen la humedad (Subramanian R., *et al.*, 2007) y retrasan el proceso natural de cristalización (Baglio, 2018).

Las mieles utilizadas para este estudio corresponden a mieles del monte nativo del Noroeste de Córdoba y la época de cosecha en esta zona se realiza de octubre a diciembre. La cosecha de miel se lleva a cabo a temperatura ambiente superando los 30 °C y pudiendo llegar a los 40 °C dependiendo de la zona y los horarios de operación.

A continuación, se describen los procesos básicos utilizados en salas de extracción en procesos productivos a pequeña escala.

Recepción, descarga y almacenamiento de alzas

Las alzas (estructura en cuyo interior se colocan los cuadros que contienen los panales de cera estampada donde la abeja elabora y almacena la miel) son recibidas en la sala de extracción. Éstas pueden ser almacenadas por unos días manteniendo la aireación y prevención de plagas, aunque lo más habitual es su procesamiento inmediatamente al llegar.

Desoperculado

El desoperculado consiste en retirar el opérculo de cera que cubre la miel madura en el panal. Esto se realiza generalmente con un equipo tipo guillotina o bien a mano con cuchillo desoperculador. Estos equipos generan calor durante el proceso, entre 35 y 38 °C, teniendo un control de la temperatura según el equipo utilizado, o casi sin control o nulo, usando el cuchillo desoperculador. Mediante este proceso por un lado se obtiene cera, miel y algunas impurezas y por otro, el panal con miel que va al siguiente proceso.

Extracción

La extracción se realiza generalmente, colocando el panal en un equipo que mediante la fuerza centrífuga y gravedad extraerá la miel. También puede realizarse por proceso de prensado de los panales o bien por escurrido.

Tamizado y depósito de miel

El tamizado de la miel se realiza para eliminar la mayor cantidad de impurezas tales como restos de cera, abejas y otras impurezas de gran tamaño. En general se utilizan tamices de paso menor a 5 mm (Marini, s.f.) pudiendo utilizar temperatura para facilitar el proceso, pero sin superar los 40 °C (Subramanian R., *et al.*, 2007). La miel extraída se almacena temporalmente en depósitos.

Decantado de miel

La miel es elevada mediante bombas adecuadas a tanques de decantación. Este proceso se realiza en forma natural dejando en reposo la miel por 48 horas (Marini, s.f.). Las partículas pesadas se acumulan en el fondo del tanque (decantación) y las livianas quedan en la superficie (espumado) las cuales son removidas con utensilios especiales. El decantado se considera un proceso de purificación.

Pasteurización

El proceso de pasteurización es un proceso térmico que combina temperatura y tiempo. El objetivo de este proceso es reducir el contenido de hongos y levaduras, pero también permite reducir la viscosidad de la miel para facilitar los procesos de transporte, filtrado, envasado y retardar los procesos de cristalización en góndola. Este proceso generalmente se aplica a mieles que se fraccionan para la venta. Existen en el mercado diversos equipos desde equipos convencionales (calentador eléctrico para tambores) a equipos automáticos de ultra alta temperatura donde la miel es sometida a unos 78 °C por 2 minutos.

Filtrado

La miel puede tener un proceso de filtrado antes del envasado, cuando la miel está a temperaturas que no superan los 40 °C, para así obtener una miel cristalina. En otros casos la filtración se realiza durante la pasteurización aprovechando la mayor fluidez de la miel a causa de las temperaturas más elevadas. Esta filtración por presión se realiza a través de mallas de 80 a 100 μm (Subramanian R., *et al.*, 2007). En algunos países de Europa se exige que la malla filtrante no sea menor a 200 μm de tal modo de evitar retener el polen (Bogdanov, E. & Martin, P., 2002), teniendo en cuenta que el polen tiene un diámetro que varía entre 10 y 60 μm de acuerdo a la especie floral habiendo de mayor tamaño (White J. W., 1979) y es un indicador del origen botánico de la miel que se desea preservar.

Envasado en tambores

Las mieles comercializadas a granel son envasadas en tambores y destinadas para diversos usos. En esta etapa se admiten mezclas de mieles, en tal caso se utilizan tanques mezcladores/homogeneizadores con regulación de temperatura para lograr la mezcla deseada.

En Argentina, la miel debe ser envasada en tambores de 300 kg de primer uso según Resolución SENASA 121-98 autorizados por SENASA (SENSASA, 1998), y debe rotularse según la Resolución SENASA 186-03 (SENASA, 2003) para asegurar la trazabilidad del producto.

Fraccionado

El fraccionado puede realizarse a mano o en equipos automáticos en envases bromatológicamente aptos. Las empresas fraccionadoras deberán cumplir con lo establecido en el CAA. En el **Apéndice 1** se muestra un Diagrama de Flujo del proceso de fraccionamiento de la miel.

1.4 Cristalización de la miel y tratamientos térmicos

Como se dijo anteriormente, la miel es una solución concentrada de azúcares. Esta solución está sobresaturada con una concentración de más del 70 % de azúcares con relación al agua que normalmente es menos del 20 % y por lo tanto tiende a cristalizar separándose la glucosa que es la responsable de este fenómeno en la miel (Valega, 2005). El proceso de cristalización involucra la formación de cristales de glucosa monohidratada en diferentes cantidades, formas, y disposición dependiendo de las condiciones del proceso. Este es un proceso que se lleva a cabo naturalmente en todas las mieles, y la tendencia y rapidez en cristalizar depende de varios factores. Las mieles con menos concentración de agua y alta concentración de glucosa tienen mayor tendencia a cristalizar como así también las almacenadas a temperaturas por debajo de los 14 °C (Baglio, 2018). Ciertos factores son necesarios para que comience la cristalización: la presencia de núcleos adecuados de condensación o simples cristales de glucosa, partículas extrañas, pequeños granos de polen o microburbujas de aire (Baglio, 2018).

El procesado de la miel involucra, en muchos casos, procesos térmicos. Estos procesos se aplican para: reducir la viscosidad de la miel y así facilitar el filtrado, bombeo, transporte y envasado; reducir el contenido de agua para prevenir la fermentación; disolver los núcleos de cristales de glucosa para retardar la cristalización; homogenizar el color según preferencias del consumidor y destruir las levaduras osmofílicas tolerantes al azúcar para prolongar la vida útil de la miel. El calentamiento es el proceso de mayor importancia en el procesado de la miel porque afecta directamente la calidad (Chua, *et al.*, 2014).

La cristalización natural de la miel presenta el inconveniente que no es aceptada por el consumidor promedio en muchos países, que interpreta, equivocadamente, que la miel ha sido adulterada con el agregado de azúcar refinada y rehúsa adquirirla (Valega, 2005). Es entonces, una práctica habitual el calentamiento de la miel principalmente para obtener mieles líquidas por más tiempos que son del gusto del consumidor. En general, las mieles que se exportan son sometidas a procesos térmicos y almacenados durante períodos más largos antes de llegar al mercado. El proceso térmico ayuda a la preservación del producto por más tiempo (Bogdanov, E. & Martin, P., 2002). Está demostrado que el calor es el único agente práctico para prevenir la granulación y fermentación, pero es la causa del deterioro de la calidad de la miel (White J. W., 1979), como se verá más adelante.

El almacenamiento se debe entender también como parte del proceso productivo, teniendo en cuenta que la miel ya no es un producto de consumo estacional, sino que es requerida durante todo el año. La miel fuera de la colmena continúa con el proceso de maduración ya que las enzimas siguen activas (Lichtenberg-Kraag, 2012). También hay que tener en cuenta que la miel es un producto altamente higroscópico, por lo que una mala conservación deriva en aumento de la humedad favoreciendo la fermentación. Los cambios que ocurren en la miel durante el calentamiento en el proceso de extracción también ocurren durante el almacenamiento dependiendo de las temperaturas de conservación. Las temperaturas de almacenamiento que favorecen la cristalización se encuentran entre 10 °C a 16 °C, y las que favorecen el deterioro son aquellas que superan los 27 °C (White J. W., 1979).

1.5 Calidad de la miel y la actividad enzimática como indicador

Dado que la miel es considerada un alimento, los requisitos de calidad/inocuidad son fijados internacionalmente por Codex Alimentarius en la reglamentación CXS 12-1981 y enmendada en el 2019. En Argentina, basándose en los requisitos del Codex, rige la Resolución GMC N° 015/94 incorporada en el Código Alimentario Argentina en 1995. Esta reglamentación es aplicable a todos los países que conforman el MERCOSUR. En el **Apéndice 3** se muestra una tabla comparativa con los requisitos de estas reglamentaciones.

Para poder determinar la calidad e inocuidad de miel es necesario la realización de diversos análisis o determinaciones según el objetivo de calidad perseguido. Estos son (INTI, 2009):

- Calidad sanitaria: ensayos microbiológicos, plaguicidas, metales y antibióticos.
- Madurez y conservación: humedad refractométrica.
- Deterioro del producto: acidez (fermentación), Hidroximetilfurfural (HMF) y actividad diastásica (frescura e indicador de proceso).
- Limpieza del producto: sólidos insolubles en agua.
- Adulteración del producto: glucosa comercial y jarabe de maíz de alta fructosa agregados (aditivos).
- Adulteración y madurez: azúcares reductores y sacarosa aparente.
- Lealtad comercial: peso neto, evaluación de la información al consumidor y origen botánico (sólo para las marcas que lo identifiquen o declaren).
- Características organolépticas: sabor y olor característicos de la miel.

El contenido de HMF y actividad diastásica son los dos parámetros usados internacionalmente para controlar los límites de los tratamientos térmicos de la miel (Chua, *et al.*, 2014). El HMF es un producto de descomposición del azúcar, que surge especialmente cuando se sobrecalienta y se almacena incorrectamente la miel, por otro lado, se puede observar un debilitamiento en la actividad diastásica por el efecto del calor (White J. W., 1979). Ambos son indicadores de “frescura” de la miel. Mientras el valor de HMF aumenta, el valor de actividad enzimática disminuye. Si bien en general se determina la actividad diastásica para evaluar la actividad enzimática, la actividad de la enzima α -glucosidasa (llamada actividad invertasa) es más sensible al calor que las amilasas y bajan su actividad más rápido durante el almacenamiento comparado con las amilasas (Vorlová L. & Pridal A., 2002). Por tal motivo, la actividad de esta enzima es una alternativa para la evaluación de la calidad de la miel durante los tratamientos térmicos y almacenamientos o como indicador de frescura. En algunos países como Italia y Suiza, ya se está utilizando la actividad α -glucosidasa como un criterio adicional de calidad de miel (Dimins, *et al.*, 2006), y la Asociación Alemana de Apicultores han fijado valores específicos de HMF y actividad invertasa para distinguir mieles genuinas de aquellas tratadas térmicamente o mal almacenadas (Deutscher Imkerbund E.V., consultado en febrero del 2020).

1.6 Adulteración

La miel genuina es un producto natural relativamente costoso, y es por lo que a lo largo de los años ha sufrido procesos de adulteración intencional debido a los altos costos

de producción, poco margen de ganancias, la existencia de adulterantes disponibles a bajo costo y la desactualización de las metodologías oficiales para la detección de fraude (García, 2016). La adulteración se da tanto en los mercados nacionales como en los internacionales. Algunos exportadores inescrupulosos, adulteran grandes cantidades de miel con jarabes para obtener un precio competitivo a nivel internacional (dumping comercial). Esto último es bien descrito en el trabajo de García donde compara los principales países exportadores de miel y el crecimiento exagerado de las exportaciones de los países asiáticos (García, 2016). La adulteración es una cuestión de lealtad comercial y protección al consumidor. Según Bogdanov y Martin la autenticidad de la miel tiene dos aspectos diferenciados: respecto a la producción de miel y respecto a la descripción geográfica y botánica de origen (2002). Esto último, si bien es importante, no es de interés para este trabajo.

Respecto a la producción de la miel, uno de los aspectos a tener en cuenta son las malas prácticas apícolas en alimentación artificial que pueden llevar a una adulteración no intencional. Esta alimentación es realizada con sacarosa o jarabe de maíz y se debería realizar exclusivamente cuando las colmenas se encuentren en cámara de cría y época alejada de la mielada, de lo contrario podrán aparecer restos de estos productos en las alzas melarias siendo considerado una adulteración (García Girou, 2003; Fattori, *et al*, s.f.).

La principal adulteración intencional de la miel se debe a la adición de azúcares invertidos o jarabes (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 (Codex Alimentarius y CAA) prohíbe el agregado de aditivos de cualquier tipo. 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 (Mehryar & Esmaili, 2011).

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 (INTI, 2009). Existen diversos métodos de análisis capaces de detectar estos azúcares y cuantificarlos (cromatografía gaseosa y cromatografía líquida, espectroscopia NIR, FTIR-ATR, HPAEC-PAD, HPLC-IRMS, método calorimétrico (DSC), SCIRA,

espectroscopía Raman con transformada de Fourier) (Mehryar & Esmaili, 2011). Recientemente se ha incorporado la Resonancia Magnética Nuclear como el método más novedoso para la detección de adulteración de miel como así también para la determinación de su origen botánico, desarrollándose actualmente la base de datos que hará de ésta una herramienta de gran utilidad (García, 2016). Sin embargo, todos estos métodos requieren de equipamientos costosos y personal especialmente formado.

1.7 Cooperativa Apícola Villa de Soto

Este trabajo se realizó con mieles provenientes de la Cooperativa Apícola de Villa de Soto Limitada, la cual funciona como tal desde el año 2011. Posee habilitación municipal y del SENASA. Según entrevista al Ing. Agr. Oscar Demarchi, miembro y tesorero de la Cooperativa, al momento del estudio la Cooperativa estaba conformada por 17 productores que poseían entre 100 y 700 colmenas, con una producción de aproximadamente 100.000 kg de miel en la campaña 2017-2018 (fines de octubre hasta comienzos de marzo).

La Cooperativa cuenta con las instalaciones y equipamiento necesarios para la producción de miel a granel, habiendo adquirido en el año 2017, a través de fondos del Ministerio de Trabajo y Empleo de la Nación, un equipo Pasteurizador Modelo M3 y una Envasadora automática con dosificador Modelo EV 304, ambos de la marca Farli. Estos equipos aún no estaban instalados ni en funcionamiento al momento del estudio. Con estos equipos se prevé la producción fraccionada para el mercado interno con el objetivo de dar valor agregado a la miel. La utilización de un Pasteurizador implicará someter a la miel a un proceso térmico. Según información brindada por el fabricante del Pasteurizador, el equipo realiza el proceso alcanzando temperaturas de entre 68-72 °C y 1 min 30 s de exposición pudiendo durar todo el proceso (entrada-salida) 7 min. En el **Apéndice 2** se muestra el equipo pasteurizador.

Las mieles procesadas por la Cooperativa corresponden a apiarios del Noroeste de Córdoba, rodeados de flora nativa, por lo que las principales fuentes de polen y néctar son de especies características de la región fitogeográfica chaqueña (Costa, *et al.*, 2016). En la **Figura 3**, se muestran los Departamentos comprendidos en el Noroeste de Córdoba.

Para este trabajo se obtuvieron muestras de 4 productores de la Cooperativa correspondiente a los meses de noviembre y diciembre de 2017, época de mayor

producción apícola, del Departamento de Cruz del Eje. Las mieles no fueron sometidas a ningún proceso térmico ni almacenamiento previo al estudio.



Figura 3: Departamentos que conforman el Noroeste de Córdoba.
Foto extraída del “Formulario de registro para indicación geográfica y denominación de origen”
presentado por la Mesa Apícola del Noroeste de Córdoba (2017).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La actividad de la enzima invertasa (α -glucosidasa) presente en las mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba), es sensible a cambios en su entorno tales como calentamiento o agregado de azúcares o jarabes industriales, de manera tal que puede usarse como indicador de pérdida de calidad de la miel.

2.2 Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad de la enzima α -glucosidasa presente en mieles de la Cooperativa Apícola Villa de Soto (Departamento de Cruz del Eje, Córdoba) y el efecto de diversos procesos térmicos asociados a su procesado, variando el tiempo y la temperatura, y de distintos grados de adulteración de las mieles genuinas, con azúcares invertidos.

Objetivos específicos

- a) Determinar algunos parámetros fisicoquímicos que permitan corroborar la calidad y frescura de las mieles, tales como pH, actividad de agua, conductividad, azúcares reductores, humedad, cenizas, minerales, actividad diastasa, actividad invertasa (α -glucosidasa), y contenido HMF.
- b) Estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa relacionándolos con cambios de estructura de la enzima.
- c) Estudiar el efecto de distintos protocolos de pasteurización sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa a fin de sugerir a la Cooperativa el más adecuado que permita preservar la calidad de sus mieles.
- d) Estudiar el efecto de la adulteración por agregado de azúcares invertidos de las mismas mieles caracterizadas anteriormente, sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y equipos

3.1.1 Reactivos

- Solución buffer-fosfato 0,1 M, pH 6,0 (Harmonised Methods IHC, 2009)
 - KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico) marca Merck.
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio di básico di hidratado) marca Merck.
- Solución TRIS-HCl 3M, pH 9,5 (Harmonised Methods IHC, 2009)
 - Tris (hidroximetil) aminometano, marca Merck y Sigma regulación de pH con solución de HCl marca Cicarelli 3 M.
- Solución mezcla de buffer-fosfato 0,1 M, pH 6,0 y TRIS-HCl 3M, pH 9,5 en la siguiente proporción: 92 % de buffer fosfato y 8 % de Tris-HCl, pH final 9,0.
- pNPG (4-nitrofenil- α -D-glucopiranososa) \geq 99%, N1377, marca Sigma-Aldrich.
- pNP (4-nitrofenol) calidad analítica marca Anedra.
- α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* Tipo I. (EC 3.2.1.20) Polvo liofilizado G5003-100UN, marca Sigma-Aldrich.
- Jarabe mezcla grado alimenticio marcar Sucrodex de Quiminsa.
- Bio-Rad Protein Assay
- Albúmina sérica bovina. Fracción V, polvo liofilizado, marca Sigma.

3.1.2 Equipos

- Espectrofotómetro Multiskan Spectrum, modelo 51118650, marca Thermo Scientific.
- Espectrofotómetro DU 7500, marca Beckman.
- Flurómetro modelo Fluorolog 3-22 marca Horiba Scientific.
- Cubeta de vidrio de 1 cm de espesor, cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor y placa de cultivo de 96 wells.
- Agitador vortex.
- Baños termostatizados.
- Termómetro de alcohol hasta 100 °C con resolución de 0,5 °C para control del baño termostático.
- Termómetro digital con termopar tipo k marca Luft.
- Cronómetro digital.
- Micropipetas
 - 10 a 100 µl, marca Socorex
 - 100 a 1000 µl, marca Socorex
 - 2 a 20 µl, marca Eppendorf
 - 20 a 200 µl, marca Eppendorf
 - 100 a 1000 µl, marca Diagon
- Balanza analítica OHAUS Analytical
- Balanza analítica Mettler H35AR
- Tubos de Khan de vidrio
- Porta tubos de ensayo (gradillas)
- Material de vidrio (matraces aforados, vasos de precipitados, varillas, etc.)

3.2 Muestras de mieles

Se utilizaron cuatro mieles genuinas sin ningún tratamiento térmico, proporcionadas por la Cooperativa Apícola Villa de Soto del Dpto. de Cruz del Eje, correspondientes a la campaña 2017. Las mieles fueron identificadas como M1, M2, M3 y M4 según se muestra en la **Tabla 1**. Las mismas fueron almacenadas en lugar oscuro, seco y fresco (temperatura de laboratorio), hasta la realización de los estudios. Las determinaciones fueron realizadas durante el 2018 y 2019.

Tabla 1: Procedencia e identificación de las mieles utilizadas.

ID	Fecha de cosecha	Procedencia
M1	9/11/2017	Costas de las Salinas
M2	12/11/2017	16 km al norte de Serrezuela
M3	3/12/2017	Las Cañadas
M4	5/12/2017	Bañado de Soto

3.3 Determinación de actividad de α -glucosidasa

3.3.1 Procedimiento general

El procedimiento general de trabajo utilizado es una modificación del método de referencia N° 9 del documento "HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION" publicado en 2009 por la IHC (Harmonised Methods of the International Honey Commission, 2009), basado en el método Siegenthaler (Siegenthaler, 1977).

El método Siegenthaler consiste en la hidrólisis del sustrato artificial pNPG (4-nitrofenil- α -D-glucopiranos) por la enzima α -glucosidasa, produciéndose por un lado α -D-glucopiranos y por otro 4-nitrofenol. La reacción se detiene por el agregado de una solución fuertemente alcalina, lo que inhibe la reacción enzimática por el cambio de pH e induce la ionización total del 4-nitrofenol a 4-nitrofenolato, un compuesto coloreado que puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 400 nm con un espectrofotómetro. La cantidad de 4-nitrofenolato generado es equivalente a la cantidad de pNPG transformado. Este mecanismo se muestra en la **Figura 4**.

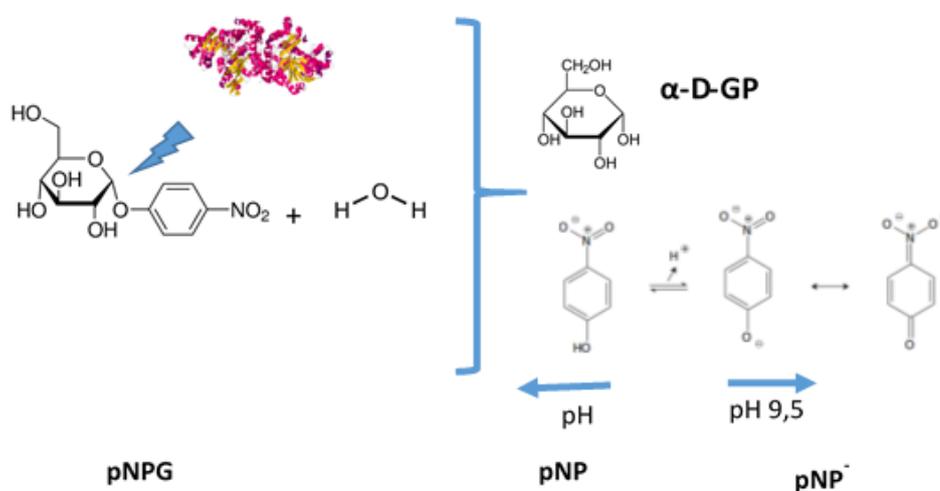


Figura 4: Mecanismo de transformación del pNPG por la acción de la α -glucosidasa.

Confección de la muestra problema:

En un tubo de Khan se agregó solución de sustrato y solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0), se mezcló en vórtex y precalentó en baño termostatzado durante 5 min a la temperatura correspondiente según el experimento. Luego del precalentamiento se agregó la solución de prueba (que contiene la enzima), se mezcló en vórtex e incubó en baño termostatzado a la temperatura y el tiempo correspondientes según el experimento. Al finalizar el tiempo de incubación, el tubo se retiró del baño y se agregó inmediatamente solución de fin de reacción (Tris-HCl 3M, pH 9,5), se mezcló en vórtex y enfrió a temperatura ambiente (no más de 15 min) para posteriormente realizar la lectura a 400 nm en equipo Espectrofotómetro Thermo Scientific. Las lecturas fueron realizadas en cubeta de vidrio de paso óptico 1 cm (lectura individual) o bien se utilizó una placa de cultivo de 96 wells, incorporando un volumen de 200 μ L en cada zócalo (lectura múltiple).

Confección del blanco:

En un tubo de Khan se agregó: solución sustrato, solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) y solución fin de reacción (Tris-HCl 3M, pH 9,5), se mezcló en vórtex y precalentó en baño termostatzado durante 5 min a la temperatura correspondiente según el experimento. Luego del precalentamiento se agregó la solución de prueba (que contiene la enzima), mezcló en vórtex e incubó en baño termostatzado a la temperatura y el tiempo correspondientes según el experimento. Al finalizar el tiempo de incubación se retiró el tubo y enfrió a temperatura ambiente (no más de 15 min) para posteriormente realizar la lectura a 400 nm en equipo Espectrofotómetro Thermo Scientific. Las lecturas fueron realizadas en cubeta o placa de cultivo, como se describió para la muestra problema.

Las determinaciones fueron realizadas como mínimo por duplicado y el blanco se preparó para cada solución de prueba.

Para el cálculo de absorbancia de la solución p-nitrofenolato se restó el valor absorbancia del tubo blanco al valor de absorbancia del tubo problema.

La actividad enzimática se expresó en μ mol/min y la actividad específica en unidades internacionales, es decir μ mol/min/mg de proteínas. También se calculó el NI (o unidades Gontarski) para expresar la actividad enzimática. El NI se refiere a la cantidad de sacarosa (g) hidrolizada en 1 hora por las enzimas contenidas en 100 g de miel bajo condiciones de prueba (Hadorn H., *et al.*, 1962) y permite correlacionar los resultados obtenidos para la

actividad de la invertasas por el método de Siegenthaler basado en la hidrólisis de pNPG con los que se obtienen por el método polarimétrico de Hadorn por medio de la siguiente relación $NI = 21,64 \times A_{pNP^- 400nm}$, donde 21,64 es la pendiente de la regresión lineal del gráfico NI (eje y) vs A_{400} (eje x) (Dustmann, *et al.*, 1985).

En este trabajo, si bien hemos calculado también el NI para las mieles, los análisis se realizan sobre la actividad específica expresada en unidades internacionales.

3.3.2 Determinación de la longitud de onda (λ) de mayor absorción para el pNP⁻ (4-nitrofenolato)

Para esta determinación se preparó una solución concentrada de pNP 122,9 μ M, pesando 1,71 mg y enrasando a 100 ml en matraz aforado, con una mezcla de buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) y Tris-HCl (3M, pH 9,5) en igual proporción que la mezcla resultante luego de detener la reacción enzimática en las pruebas de cinética (92 % de buffer-fosfato y 8 % de Tris-HCl). Esta solución tuvo un pH final de 9,0. Luego se realizó una dilución hasta una concentración de 20,5 μ M para realizar las lecturas.

Se preparó un blanco con la mezcla de buffer-fosfato y Tris-HCl con la cual se trazó la línea de base y se registró el espectro de absorción entre 250 nm y 600 nm con un Espectrofotómetro Beckman DU 7500.

3.3.3 Determinación del coeficiente de extinción molar del pNP⁻ (4-nitrofenolato)

Se construyeron las curvas de calibración con soluciones testigos a distintas concentraciones a partir de la solución madre de pNP (122,9 μ M). Para el registro de la absorbancia se utilizó una cubeta de vidrio de paso óptico de 1 cm y una placa de cultivo de 96 wells con volumen de 200 μ L y paso óptico de 0,505 cm calculado geoméricamente. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en el Espectrofotómetro Thermo Scientific. Se graficaron los valores de absorbancia en función de la concentración M de pNP⁻. El coeficiente de extinción molar (ϵ) se calculó, aplicando la Ley Lambert-Beer, como la pendiente de la recta de absorbancia dividida el paso óptico (Kolthoff, *et al.*, 1979).

3.3.4 Determinación de parámetros cinéticos de α -glucosidasa por el modelo de Michaelis-Menten

Se decidió utilizar la enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* EC 3.2.1.20 (maltasa) para poner a punto el método y adquirir la destreza necesaria para llevar adelante los ensayos de actividad enzimática. Se eligió esta enzima por la similitud

que presenta con la variante tipo III de α -glucosidasa presente en las glándulas hipofaríngeas de la *Apis mellifera* y que finalmente formará parte de la miel.

Según el sistema de clasificación CAZymes (Carbohydrate-Active enzymes database, <http://www.cazy.org/>), basado en similitudes en la secuencia de aminoácidos, en plegamiento de las proteínas y mecanismos enzimáticos (Henrissat, B., 1991; Henrissat & Bairoch, A., 1996; Lombard, *et al.*, 2014), ambas, α -glucosidasas de la de *Saccharomyces cerevisiae* y la tipo III de *Apis mellifera*, se agrupan en la Familia 13, clan GH-H. Por su parte, Chiba las clasifica en la familia I en base a su estructura primaria ya que comparten 4 regiones altamente conservadas (I-IV). Además, ambas son capaces de hidrolizar pNPG y sus mecanismos catalíticos implican la participación de los aminoácidos Glu y Asp de la región 3 (Chiba, 1997).

Curva de tiempo

Para esta determinación se midió la actividad enzimática, según el procedimiento descrito en el punto 3.3.1, a 6 tiempos distintos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min), concentración constante de sustrato (17 mM y 0,6 mM) y temperatura de incubación de 40 °C.

Se preparó una solución de 0,2 mg/ml de enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) y solución sustrato de pNPG de 0,02 M en solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). A partir de los valores de absorbancia se calculó la actividad enzimática como cantidad de producto formado por minuto y se graficó en función del tiempo. En la **Tabla 2** se muestra cómo fueron construidas las muestras para esta experiencia.

Tabla 2: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de tiempo de enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentración constante de sustrato de 17 mM y 0,6 mM.

Reactivos (0,017 M de sustrato)	Tiempo (min)					
	5	10	15	20	25	30
Sustrato 0,02 M (μ l)	430	430	430	430	430	430
Enzima 0,2 mg/ml (μ l)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Buffer-fosfato 0,1 M pH 6,0 (μ l)	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Tris 3M, pH 9,5 (μ l)	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5
Volumen total (μ l)	515	515	515	515	515	515

Reactivos (0,0006 M de sustrato)	Tiempo (min)					
	5	10	15	20	25	30
Sustrato 0,02 M (μ l)	15	15	15	15	15	15
Enzima 0,2 mg/ml (μ l)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Buffer-fosfato 0,1 M pH 6 (μ l)	430,0	430,0	430,0	430,0	430,0	430,0
Tris 3M, pH 9,5 (μ l)	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5
Volumen total (μ l)	500	500	500	500	500	500

Curva de enzima

Para esta determinación se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.3.1. Se preparó una solución de 0,4 mg/mL (SE_1) de enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). A partir de esta solución se prepararon las demás diluciones (SE_2 , SE_3 , SE_4 y SE_5). Como sustrato se preparó una solución de pNPG de concentración de 0,02 M en solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). En la **Tabla 3** se muestra cómo fueron construidas las muestras para esta experiencia. Las muestras fueron incubadas a 40 °C por 20 min. Se graficaron los valores de absorbancia en función de concentración de enzima.

Tabla 3: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentración constante de sustrato (17 mM).

Reactivos	Concentración de α -glucosidasa (μ g/ml)										
	0,05	0,10	0,20	0,35	0,50	0,83	1,00	5,00	10,00	30,00	40,00
Sustrato 0,02 M (μ l)	830	830	830	830	830	830	830	830	830	830	815
SE_1 0,4 mg/ml (μ l)								13	25	75	100
SE_2 4 μ g/ml (μ l)		25	50								
SE_3 2 μ g/ml (μ l)	25										
SE_4 6 μ g/ml (μ l)				58	83						
SE_5 20 μ g/ml (μ l)						40	50				
Buffer-fosfato 0,1M, pH 6,0 (μ l)	60	60	35	27	2	5	35	73	60	10	0
Tris 3M, pH 9,5 (μ l)	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
Volumen total (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	960	1000	1000	1000	1000	1000

Determinación de temperatura óptima y parámetros cinéticos K_m y V_{max}

Para esta determinación se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.3.1. Se preparó una solución de 0,2 mg/ml de enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y dos soluciones concentradas de sustrato pNPG, una de concentración 0,02 M y otra de 0,03 M. En ambos casos se utilizó como disolvente la solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). En la **Tabla 4** se muestra cómo fueron construidas las muestras para esta experiencia.

Tabla 4: Detalle de la construcción de las muestras para curvas de cinética de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.
Concentración constante de enzima (5 μ g/ml).

Reactivos	Concentración de pNPG (M)										
	0,0002	0,0003	0,0006	0,0009	0,0015	0,0030	0,0060	0,0090	0,0120	0,0180	0,0240
Sustrato 0,02 M (μ l)	10,0	15,0	30,0	45,0	75,0	150	300				
Sustrato 0,03 M (μ l)								300	400	600	800
Enzima 0,2 mg/ml (μ l)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Buffer-fosfato 0,1M, pH 6,0 (μ l)	880	875	860	845	815	740	590	590	490	290	90
Tris 3M, pH 9,5 (μ l)	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0
Volumen total (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Se determinó la actividad enzimática a distintas concentraciones de sustrato y distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C); tiempo de incubación de 20 min.

A partir de los valores de absorbancia se calculó la actividad enzimática como cantidad de producto formado por minuto y por cantidad de proteína, y se graficó en función de la concentración de sustrato. Los valores de V_{max} y K_m fueron calculados en base al ajuste de los valores experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Fennema, O., 2010).

3.4 Determinación de la fluorescencia intrínseca de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*

Para poder observar como la temperatura afecta la estructura de la enzima, se utilizó la propiedad que tienen las proteínas de fluorescer producto de la re-emisión de fotones absorbidos; esto se debe a que las proteínas contienen aminoácidos aromáticos que son capaces de producir fluorescencia (Nilsen, 2003).

Para esta determinación se preparó una solución de 0,2 mg/ml de la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) y se diluyó a la mitad con solución buffer-fosfato para realizar las lecturas. La muestra fue sometida a un proceso de calentamiento y enfriamiento controlado en diversas

condiciones de tiempo y temperatura utilizando un baño termostatzado conectado al fluorómetro marca Horiba Scientific.

El estudio se realizó considerando el proceso de precalentado a 50 °C por 30 min (tomado como referencia del proceso de licuado/homogeneizado de miel) y calentado a 60 °C por 10 min o 20 min (tomado como referencia del proceso de calentado/pasteurización de miel). En la **Tabla 5** se muestra el diseño del experimento.

Tabla 5: Esquema del diseño de experimento para la determinación del efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

Calentamiento hasta 60 °C 10 min		Calentamiento hasta 60 °C 20 min	
Calentamiento	Temperatura de lectura °C	Calentamiento	Temperatura de lectura °C
Estabilizar 3 min y tomar lectura	25	Estabilizar 3 min y tomar lectura	25
Estabilizar 3 min y tomar lectura	30	Estabilizar 3 min y tomar lectura	30
Estabilizar 3 min y tomar lectura	35	Estabilizar 3 min y tomar lectura	35
Estabilizar 3 min y tomar lectura	40	Estabilizar 3 min y tomar lectura	40
Estabilizar 3 min y tomar lectura	45	Estabilizar 3 min y tomar lectura	45
Estabilizar 3 min y tomar lectura	50	Estabilizar 3 min y tomar lectura	50
Calentar 30 min y tomar lectura	50	Calentar 30 min y tomar lectura	50
Estabilizar 3 min y tomar lectura	55	Estabilizar 3 min y tomar lectura	55
Estabilizar 3 min y tomar lectura	60	Estabilizar 3 min y tomar lectura	60
Calentar 10 min y tomar lectura	60	Calentar 20 min y tomar lectura	60

Enfriamiento desde 60 °C 10 min		Enfriamiento desde 60 °C 20 min	
Enfriamiento	Temperatura de lectura °C	Enfriamiento	Temperatura de lectura °C
Estabilizar 3 min y tomar lectura	55	Estabilizar 3 min y tomar lectura	55
Estabilizar 3 min y tomar lectura	50	Estabilizar 3 min y tomar lectura	50
Estabilizar 3 min y tomar lectura	45	Estabilizar 3 min y tomar lectura	45
Estabilizar 3 min y tomar lectura	40	Estabilizar 3 min y tomar lectura	40
Estabilizar 3 min y tomar lectura	35	Estabilizar 3 min y tomar lectura	35
Estabilizar 3 min y tomar lectura	30	Estabilizar 3 min y tomar lectura	30
Estabilizar 3 min y tomar lectura	25	Estabilizar 3 min y tomar lectura	25

Durante el proceso se fueron registrando espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína (λ emisión 300 a 550 nm; λ excitación 280 nm correspondiente a la fluorescencia del triptófano; slits 2; incremento 1nm). Las lecturas se realizaron en cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor.

3.5 Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos de α -glucosidasa en miel

3.5.1 Determinación de actividad α -glucosidasa en miel

Se utilizó el procedimiento descrito en el punto 3.3.1. La solución de prueba se preparó pesando 5 g de miel y diluyendo con solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) hasta 25 ml. Las muestras se incubaron por 20 min a 40 °C en un baño termostatizado con una variación $\pm 0,5$ °C. Las determinaciones se realizaron como mínimo por triplicado. En la **Tabla 6** se detalla la construcción de la muestra para esta determinación.

Tabla 6: Detalle de la construcción de cada muestra para la determinación de la actividad de la α -glucosidasa de la miel.

Reactivos	Volumen sistema experimental utilizado
Sustrato 0,02 M	420 μ l
Solución de miel 5 g/25ml	42,5 μ l
Tris 3 M, pH 9,5	42,5 μ l
Volumen total	505 μ l

En este caso, los valores de actividad enzimática se expresaron unidades internacionales (μ mol/min/mg de proteína.) y también se expresaron en Número de Invertasa (NI) según la Ecuación (1), como se mencionó en la sección 3.3.1. El NI indica la cantidad de sacarosa por gramo hidrolizado en 1 hora por la enzima contenida en 100 g de miel en las condiciones del ensayo. Esta unidad fue elegida porque es de uso común.

$$NI = 21,64 \times \Delta A_{400} \quad (1)$$

Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} en miel

Se utilizó el procedimiento descrito en el punto 3.3.1. La solución de prueba se preparó pesando 1 g de miel y diluyendo con solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0) hasta 5 ml. Para esta determinación se preparó una solución concentrada de sustrato (pNPG) de 0,02 M utilizando como disolvente solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). Las incubaciones fueron realizadas a 40 °C por 20 min. En la

Tabla 7 se muestra cómo fueron construidas las muestras para esta experiencia.

A partir de los valores de absorbancia se calculó la actividad específica como unidades internacionales ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) y se graficó en función de la concentración de sustrato. Los valores de V_{max} y K_m fueron calculados ajustando los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Fennema, O., 2010).

Esta experiencia sólo se realizó con la muestra de miel M1.

Tabla 7: Construcción de cada muestra para la determinación de la curva de actividad enzimática en la miel M1.

Reactivos	Concentración pNPG (M)									
	0,0002	0,0003	0,0006	0,0009	0,0015	0,0030	0,0060	0,0090	0,0120	0,0170
Sustrato 0,02 M (μl)	10,0	15,0	30,0	45,0	75,0	150	150	225,00	300,00	420,00
Miel 1g/5ml (0,2 g/ml)	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	42,5	42,5	42,5	42,5
Buffer-fosfato 0,1 M, pH 6,0 (μl)	821	816	801	786	756	681	266	191	116	0
Tris 3M, pH 9,5 (μl)	84,0	84,0	84,0	84,0	84,0	84,0	42,0	42,0	42,0	42,0
Volumen total (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	505

3.6 Tratamiento térmico de mieles simulados en laboratorio

Para observar el efecto en la actividad de la α -glucosidasa de la miel después de la aplicación de un tratamiento térmico similar a los utilizados en los procesos industriales, las mieles recibieron 10 tratamientos térmicos (combinación de tiempo y temperatura) simulados en laboratorio. Los tratamientos consistieron en someter a la miel a un proceso de precalentado (tomado como referencia de licuado/homogeneizado de miel), calentado (tomado como referencia del proceso de calentado/pasteurización de miel) y enfriado en condiciones controladas según el esquema mostrado en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Construcción del experimento de los 10 tratamientos térmicos usados en mieles.

N° trat.	Precalentado		Calentado		Enfriado		Almacenado	
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Temperatura	Tiempo
1	50	30	70	1,50	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
2	50	30	70	3	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
3	50	30	70	5	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
4	50	30	70	10	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
5	50	30	70	15	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
6	50	30	70	20	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
7	50	30	60	5	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
8	50	30	60	10	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
9	50	30	60	15	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis
10	50	30	60	20	40	suficiente	Ambiente	hasta análisis

Se prepararon 3 baños termostatzados con circulación de agua, y se ubicaron en forma secuencial. Los baños termostatzados se estabilizaron a 50 °C (baño I), 70 °C o 60 °C según el caso (baño II), y 40 °C (baño III). La temperatura se monitoreó mediante termómetro manteniéndose a $\pm 0,5$ °C. El nivel de agua fue tal que permitió que la miel, contenida en los tubos, quedara completamente dentro del líquido. Las mieles fueron colocadas en tubos de Khan dejando un espacio de cabeza de aproximado de 1 cm, luego de lo cual se taparon para evitar la evaporación. Se colocó un termómetro digital con termopar dentro de uno de los tubos del grupo correspondiente a una serie para monitorear la temperatura en el interior del tubo durante la prueba como se muestra en la **Figura 5**. Los tubos se acomodaron en una gradilla y se sumergieron en el baño I de precalentado a 50 °C por 30 min. Transcurrido este tiempo, la gradilla fue retirada y colocada en el baño II donde se realizó el calentamiento a la temperatura y tiempo definido en la **Tabla 8**. Transcurrido el tiempo de calentamiento, la gradilla fue retirada y colocada en el baño II a 40 °C. Cuando la muestra alcanzó los 40 °C fue retirada para un enfriado a temperatura ambiente (temperatura de laboratorio) y almacenada en lugar fresco, sin luz y seco hasta el momento de realizar la determinación de actividad enzimática (punto 3.3.1). Los tratamientos se realizaron por duplicado y por triplicado según el caso. El tiempo de precalentamiento y calentamiento fue cronometrado.



Figura 5: Termopar digital y ubicación dentro de tubo de Khan con la muestra; y disposición de los tubos en la gradilla.

3.7 Adulteración de miel con jarabe mezcla y determinación de actividad α -glucosidasa

3.7.1 Adulteración de miel

Para esta determinación se prepararon muestras de miel adulteradas con jarabe (10% P/P y 20 % P/P), para cada una de las mieles por triplicado. Las muestras se prepararon

pesando 4,5 g de miel y 0,5 g de jarabe diluyendo hasta 25 ml en buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0); y 4 g de miel y 1 g de jarabe diluyendo hasta 25 ml en buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0), para las adulteraciones del 10 % P/P y 20 % P/P, respectivamente. 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 utilizó para adulterar jarabe mezcla marca Sucrodex. Las muestras así preparadas fueron conservadas en heladera hasta el momento de análisis.

3.7.2 Determinación la actividad de α -glucosidasa en mieles adulteradas

Para esta determinación se utilizó el método descrito en el punto 3.3.1. Las soluciones de prueba fueron las preparadas según el punto 3.7.1. Se preparó una solución concentrada de sustrato pNPG de 0,02 M utilizando como disolvente solución buffer-fosfato (0,1 M, pH 6,0). En este caso la concentración final de sustrato en cada muestra fue de 9 mM. Se midió la actividad de la enzima en función de la temperatura, para evaluar si la presencia de adulterante afecta a la estabilidad de la enzima a altas temperaturas. Se incubó a 30, 40, 50 y 60 °C por 20 min. Las determinaciones se realizaron por duplicado. En la **Tabla 9** se detalla la construcción de las muestras. Los resultados fueron expresados en actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) para poder comparar los resultados entre todas las mieles.

Tabla 9: Construcción de las muestras para la determinación de adulteración.

Reactivos	Volumen (μL)
Sustrato 0,02M	225
Muestra 1g/5ml (control, 10% y 20 % adulterada)	42,5
Tris 3M, pH9,5	42,5
Buffer-fosfato 0,1 M, pH 6,0	190
Volumen total	500

3.8 Determinación de proteína en miel

La proteína en miel fue determinada por el método Bradford utilizando el kit de reacción Bio-Rad y realizando las lecturas por triplicado en placa de cultivo a 595 nm en Espectrofotómetro Thermo Scientific (Bio-Rad Protein Assay, s.f.). Se utilizó albúmina sérica bovina en una concentración de 2 mg/L en agua destilada, a partir de la cual se prepararon 3 testigos (0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml y 1,4 mg/ml) y se trazó una curva de calibración de mg/ml

de albúmina vs. A_{595nm} . Los resultados fueron expresados en mg de proteína por gramo de miel.

3.9 Determinación de parámetros fisicoquímicos en mieles

Para conocer algunas características de las mieles utilizadas en este trabajo, se solicitó a un laboratorio externo la realización de las determinaciones. Los análisis fueron realizados en el INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial).

A continuación, se mencionan las determinaciones realizadas y los métodos utilizados:

- Humedad refractométrica: ME 101 “Determinación de humedad refractométrica en miel” basado en Norma IRAM 15931:2007 “Miel. Determinación de la humedad por refractometría”.
- Cenizas conductimétrica: ME 104 “Determinación de cenizas conductimétricas en miel” basado en Norma IRAM 15945:2007 “Miel. Determinación de la conductividad eléctrica”.
- Acidez libre: ME 109 A “Acidez libre en miel – A: Método con titulación manual y pH-metro” basado en Norma IRAM 15933:2013 “Miel. Determinación de la acidez libre”.
- Hidroximetilfurfural: AOAC N° 980.23, 16th Ed (1995).
- Actividad diastásica: AOAC N° 958.09, 16th Ed (1995).
- Actividad invertasa: Harmonised Methods of the International Honey Commission (abril 2009).
- Sólidos insolubles en agua: Norma IRAM 15936:2008 “Miel. Determinación de sólidos insolubles en agua”.
- Fructosa y glucosa: por HPLC
 - Columna: Phenomenex Rezex RCM Monosaccharide
 - Precolumna: Carbo Ca
 - Fase móvil: H_2O
 - Flujo: 0,6 ml/min
 - Detector: Índice de refracción a 70 °C
- Sacarosa: por HPLC
 - Columna: Kromasil KR100-5NH₂; 250 x 4,6 mm

- Precolumna: Phenomenex NH₂; 4 mmL x 3,0 mm ID
- Fase móvil: AcN: H₂O : 70 : 30
- Flujo: 1,0 ml/min
- Detector: Índice de refracción a 30 °C

3.10 Análisis estadístico de resultados y gráficos

Los datos fueron graficados y analizados estadísticamente utilizando el software InfoStat v. 2018 y el software SigmaPlot v. 12.5. Se estimaron medias y desvíos estándares. Se realizaron análisis de varianza y test de separación de medias (LSD) y test t de Student para un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Las unidades de medida y los símbolos utilizados corresponden al Sistema Internacional de Unidades-SI (Oficina Internacional de Pesas y Medidas, 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características fisicoquímicas de las mieles estudiadas

En la **Tabla 10** se muestran los valores obtenidos para el análisis de las mieles del Dpto. de Cruz del Eje (Córdoba) utilizadas en este estudio. La cantidad de hidroximetilfurfural (HMF) (< 1 mg/kg) y la actividad diastásica (> 8 ND) permiten comprobar la frescura y calidad de estas mieles. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores para mieles frescas y no adulteradas del noroeste de Córdoba (Baroni M.V., *et al.*, 2009). Además, las mieles cumplen con los requisitos de calidad establecidos por el art. 783 del CAA, la Resolución GMC N° 015/94 y el CODEX STAN 12-1981 para humedad refractométrica, cenizas conductimétricas, acidez libre, HMF, actividad diastásica, sólidos insolubles en agua y sacarosa aparente.

En el **Apéndice 3** se muestra una tabla comparativa de los valores de referencia utilizados.

Es necesario mencionar que este tipo de análisis no ofrece información sobre el origen botánico de las mieles.

Tabla 10: Caracterización físico química de las mieles del Departamento de Cruz del Eje (Córdoba).

Determinaciones	Muestras				Requisito normativo	⁽¹⁾ Compo- sición mieles NO Cba.
	M1	M2	M3	M4		
⁽²⁾ Humedad refractométrica (g/100g)	14,9 ± 0,1	15,4 ± 0,1	14,9 ± 0,1	14,3 ± 0,1	⁽³⁾ Máximo 18	17,4 ± 0,8 15,8 - 18,8
⁽²⁾ Cenizas conductimétricas (mS/cm)	0,563 ± 0,036	0,412 ± 0,023	0,673 ± 0,044	0,707 ± 0,047	⁽⁴⁾ Miel de flores: máx. 0,8 ⁽⁴⁾ Miel de mielada: mín. 0,8	
⁽²⁾ Acidez libre (meq/kg)	8,68 ± 1,97	7,35 ± 1,67	6,30 ± 1,43	5,36 ± 1,22	⁽³⁾ Máximo 40	22,8 ± 11,2 10,1 - 52,2
⁽²⁾ Hidroximetilfurfural (mg/kg)	< 1	< 1	< 1	< 1	⁽³⁾ Máximo 40	0,54 ± 0,41 0,05 - 1,52
⁽²⁾ Actividad diastásica ND (escala Gothe)	16,9	14,2	11,1	18,0	⁽³⁾ Mínimo 8 ⁽³⁾ Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)	17,9 ± 6,7 8,9 - 31,8
⁽²⁾ Actividad de invertasa NI	14,13 ± 0,03	10,93 ± 0,88	14,50 ± 0,57	11,53 ± 0,38	⁽⁵⁾ Recomendado: mínimo 10, mieles con baja actividad enzimática mínimo 4	—
⁽²⁾ Sólidos insolubles en agua (g/100g)	0,056	0,045	0,061	0,087	⁽³⁾ Máximo 0,1 ⁽³⁾ Miel prensada máx. hasta 0,5	—
⁽²⁾ Sacarosa aparente (g/100g)	< 0,1	0,17	< 0,1	1,7	⁽³⁾ Miel de flores: máx. 8 ⁽³⁾ Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 10	—
⁽²⁾ Fructosa (como fructosa) (g/100g)	40,6	38,9	40,7	37,6	—	37,2 ± 4,2 27,5 - 44,3
⁽²⁾ Glucosa (como glucosa anhidra) (g/100g)	31,4	31,6	30,4	27,3	—	29,4 ± 3,7 21,5 - 34,7
⁽⁶⁾ Proteínas (Bradford) (mg/kg)	623,1	286,7	400,6	450,2	—	322 ± 145 168 - 708

(1): Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics (Baroni, *et al.*, 2009)

(2): Laboratorio INTI-Agroalimentos.

Los resultados de humedad refractométrica, cenizas conductimétricas y acidez libre corresponden a la media ± la incertidumbre para un 95 % de confianza para k=2. Los resultados para actividad de invertasa corresponden a la media ± una vez la desviación estándar.

(3): CAA - Capítulo X

(4): CODEX STAN 12-1981

(5): Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission (Bogdanov, *et al.*, 1999).

Los resultados corresponden a la media ± una vez la desviación estándar.

(6): Realizados en este trabajo.

4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estructura de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*

4.2.1 Cinética de la α -glucosidasa purificada

Se estudió la cinética de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* (Tipo I) con el objetivo de poner a punto y adaptar el protocolo de trabajo (método recomendado por la IHC) a volúmenes pequeños. Trabajar con volúmenes pequeños no solo permitió economizar reactivos sino también tiempo al poder medir muchas muestras de manera simultánea utilizando un espectrofotómetro con lector de placas.

Determinación de la concentración de producto (pNP⁻)

El pNP⁻ (4-nitrofenolato) es el producto obtenido de la descomposición del pNPG por la acción catalítica de la enzima α -glucosidasa. La determinación del coeficiente de extinción molar del pNP⁻ (ϵ_{pNP^-}) permitió utilizar la Ley de Lambert y Beer para cuantificar la cantidad de producto formado durante el proceso de catálisis enzimática. La cantidad de producto es equivalente a la cantidad de sustrato utilizado (pNPG).

Se registró el espectro de absorción de producto de la reacción catalizada por α -glucosidasa (pNP⁻ = 20,5 μ M) disuelto en una mezcla buffer-fosfato y Tris-HCl (92 % buffer-fosfato y 8 % Tris-HCl) y pH final de 9,0. Se trazó la línea de base con la mezcla de buffer-fosfato y Tris-HCl y luego se registró el espectro de absorción entre 250 nm y 600 nm con el Espectrofotómetro Beckman. Se determinó una longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de 400 nm confirmando lo definido en el método 9 de la IHC (Harmonised Methods of the International Honey Commission, 2009).

Para determinar el coeficiente de extinción molar del pNP⁻ (ϵ_{pNP^-}) en solución buffer-fosfato y Tris-HCl se prepararon soluciones testigos a partir de una solución madre de pNP y se construyeron las curvas de calibración midiendo la absorbancia a 400 nm en cubeta de vidrio y en placa de cultivo de 96 wells. El coeficiente de extinción molar ϵ_{pNP^-} se calculó como la pendiente de la recta de absorbancia vs. concentración de pNP⁻ según la Ley de Lambert y Beer (Kolthoff, et al., 1979). La fórmula es mostrada en la Ecuación (2).

$$A = b * \epsilon * C \quad (2)$$

Siendo:

C: concentración de pNP⁻

b: paso óptico

ϵ : coeficiente de extinción molar del pNP⁻

El valor de ϵ NP⁻ para cubeta de vidrio de paso óptico de 1 cm fue 19290 M⁻¹cm⁻¹ (**Figura 6, a**). El valor de ϵ NP⁻ para placa de cultivo de 96 wells, volumen 200 μ L y un paso óptico de 0,505 cm (calculado geoméricamente) fue de 19634 M⁻¹cm⁻¹ (**Figura 6, b**). Los valores hallados de coeficiente de extinción molar, paso óptico y longitud de onda de mayor absorción del pNP⁻, se utilizaron en todas las pruebas realizadas, tanto con la enzima purificada de *Saccharomyce cerevisiae* como con la enzima de la miel.

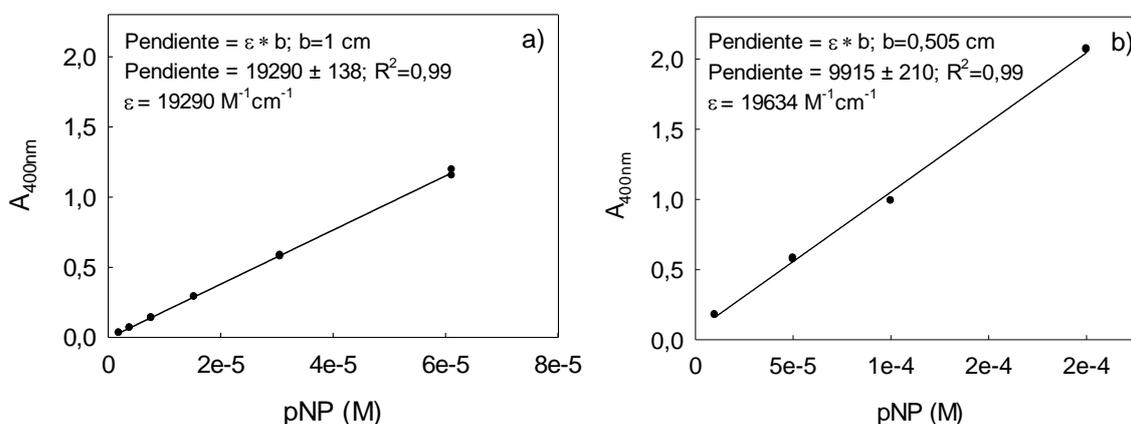


Figura 6: Curva de calibración de pNP⁻ en medio buffer-fosfato y Tris-HCl pH 9,0 a 24 °C.
a) Cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico. b) Placa de cultivo de 96 wells, volumen de 200 μ L y paso óptico 0,505 cm.

Determinación de las condiciones de trabajo a velocidad inicial (Modelo de Michaelis-Menten).

El comportamiento general de la mayoría de las reacciones enzimáticas sigue el mecanismo descrito por Michaelis-Menten en 1913, es también el caso de las α -glucosidasas de *Saccharomyce cerevisiae* (maltasa) y de la de *Apis mellifera* (variante III) presente en la miel (Yoshikawa 1994 y Nishimoto 2001). Cuando comienza la reacción, la velocidad aumenta en forma proporcional a la generación de producto en los primeros momentos de la reacción, esto se da cuando se ha consumido menos del 5 % de sustrato, es en esta zona que hablamos de velocidad inicial. Cuando toda la enzima está saturada de

sustrato, la enzima funciona al máximo, continuamente se forma el complejo enzima-sustrato, se genera el producto y se libera la enzima, pero la reacción inversa (k_{-2}) aún no ocurre. El sistema llega al estado estacionario en donde la velocidad de formación de producto es constante y máxima (Fennema, O., 2010). Un esquema general de una reacción enzimática se puede ver en la Ecuación (3).



Siendo:

E = enzima

S = sustrato

P = producto

k_1 = velocidad de reacción del complejo E.S

k_{-1} = velocidad de desaparición del complejo E.S

k_{-2} = velocidad de formación del complejo E.S después de la formación del producto. Otro de los supuestos del modelo de Michaelis-Menten que se debe cumplir para poder aplicarlo es que esta velocidad sea cero.

La relación entre la velocidad y la concentración de sustrato está expresada por la ecuación Michaelis-Menten (4) respondiendo a una relación hiperbólica.

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Siendo:

V: velocidad media experimental

V_{max} : velocidad máxima de reacción

K_m : constante Michaelis – Menten

[S]: concentración de sustrato

El valor de K_m (constante Michaelis-Menten) es un valor característico para cada enzima con su sustrato específico y corresponde a la concentración de sustrato cuando se llega a la mitad de la velocidad máxima (V_{max}). Es un indicador de la afinidad de esa enzima por el sustrato y viceversa. Cuanto más pequeño es K_m mayor afinidad existe por el sustrato (Nilsen, 2003).

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5)$$

La V_{max} representa el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por molécula de enzima cuando la misma está saturada de sustrato. Esta velocidad es característica para una enzima a una concentración específica de ella.

Curva de tiempo

Se realizaron dos curvas, a dos concentraciones de sustrato pNPG (0,6 mM y 17 mM) y a una concentración constante de enzima (5 $\mu\text{g/ml}$ de α -glucosidasa) en buffer- fosfato (0,1 M, pH 6,0). La reacción transcurrió a 40 °C y se detuvo por el agregado de Tris-HCl (3M, pH 9,5). Se midió la $A_{400\text{nm}}$ cada 5 min, durante 30 min.

En la **Figura 7** podemos observar que hasta los 25 min de incubación la relación entre velocidad (como formación de producto) y tiempo es lineal, lo que sugiere que ese es el límite de tiempo para mantener la reacción en la zona de velocidad inicial.

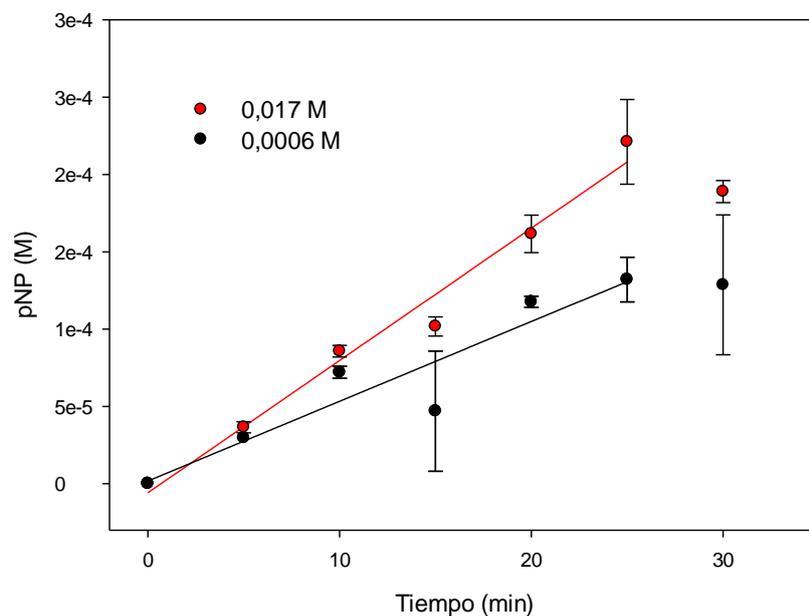


Figura 7: Curvas de tiempo para concentraciones de sustrato (pNPG) de 0,6 mM y 17 mM a concentración constante de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* enzima. Concentración de enzima: 5 $\mu\text{g/ml}$, tiempos y temperatura de incubación: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, 40 °C.

Se decide trabajar con la concentración de pNPG de 17 mM y un tiempo de incubación de 20 min para trabajar en condiciones de velocidad inicial (Harmonised Methods of the International Honey Commission, 2009).

Curva de Enzima

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima dependerá de la concentración de la enzima en la mezcla de la reacción (Nilsen, 2003). Siguiendo el procedimiento establecido en el punto 3.3.1, se prepararon diversas diluciones de enzimas y se determinó la A_{400nm} (como medida de la velocidad de reacción) manteniendo constante la concentración de sustrato, tiempo, temperatura y pH. Se graficaron los valores obtenidos para A_{400nm} a las distintas concentraciones de enzima (**Figura 8**).

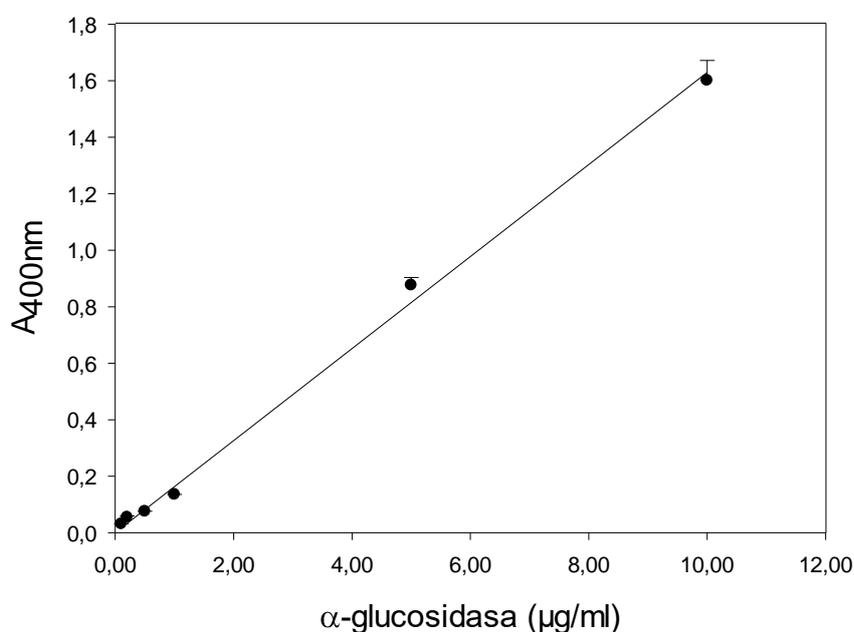


Figura 8: Relación entre la concentración de la enzima α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* y la A_{400nm} como medida de velocidad de reacción. La concentración de sustrato (17 mM de pNPG), la temperatura (40 °C) y el tiempo de incubación (20 min) se mantuvieron constantes.

En la **Figura 8** se puede observar que la concentración de enzima es directamente proporcional a la velocidad de reacción (relación lineal) hasta 10 µg/ml, máxima concentración ensayada. En base a los valores de absorbancia registrados y tomando en cuenta el rango de medición con mínimo error del espectrofotómetro se decidió trabajar

con la concentración de enzima de 5 $\mu\text{g/ml}$ para la determinación de los parámetros cinéticos.

4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*

Se midió la velocidad de formación de producto a diferentes temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 60 $^{\circ}\text{C}$) para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*. En la **Figura 9** se muestran las cuatro curvas de sustrato a las diferentes temperaturas. Se observa claramente que 40 $^{\circ}\text{C}$ es la temperatura óptima de actividad para la α -glucosidasa y que a valores superiores a los 6 mM de sustrato se produce una disminución de la velocidad lo que indicaría una posible inhibición por sustrato (Fennema, O., 2010). Se ajustaron las curvas a la ecuación de Michaelis-Menten, a concentraciones menores a aquellas en que ocurre la inhibición por sustrato, como se muestra en la **Figura 10**, para poder determinar K_m y V_{max} .

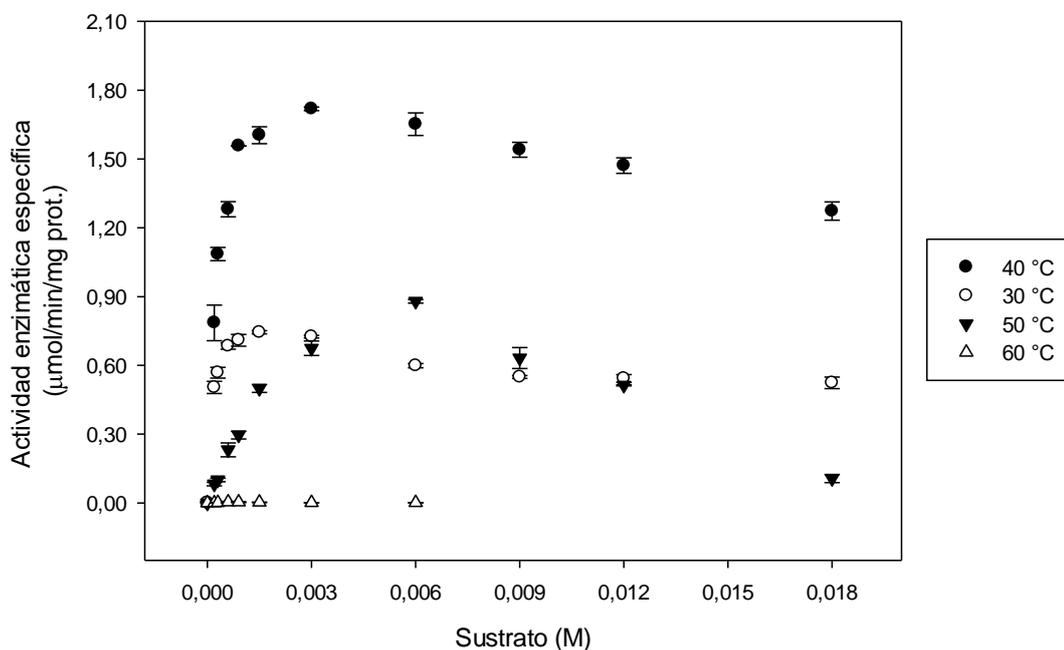
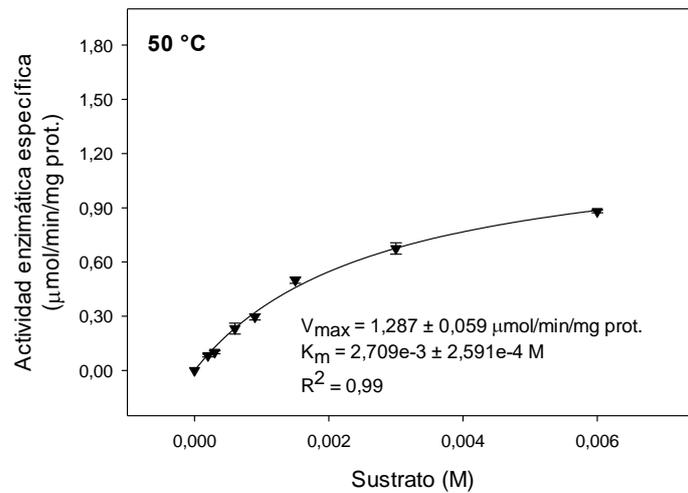
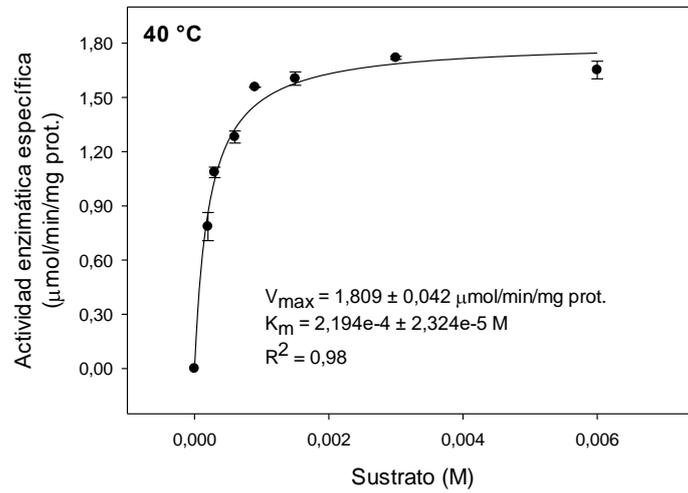
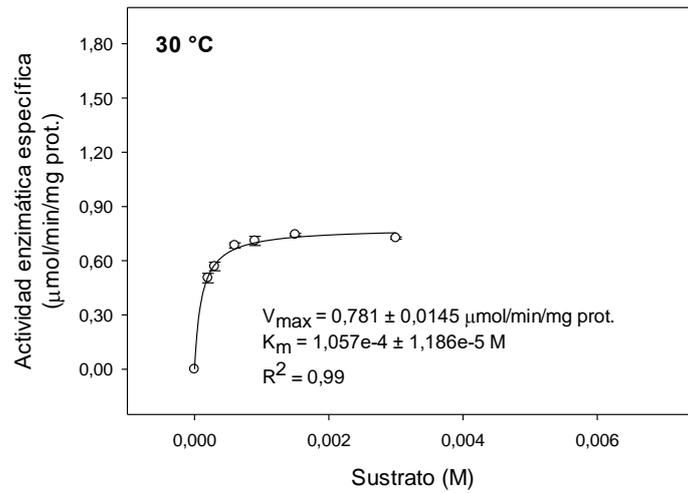


Figura 9: Curva de sustrato para la actividad de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* a temperaturas de incubación de 30, 40, 50 y 60 $^{\circ}\text{C}$. Concentración de enzima 5 $\mu\text{g/ml}$, tiempo de incubación 20 min.



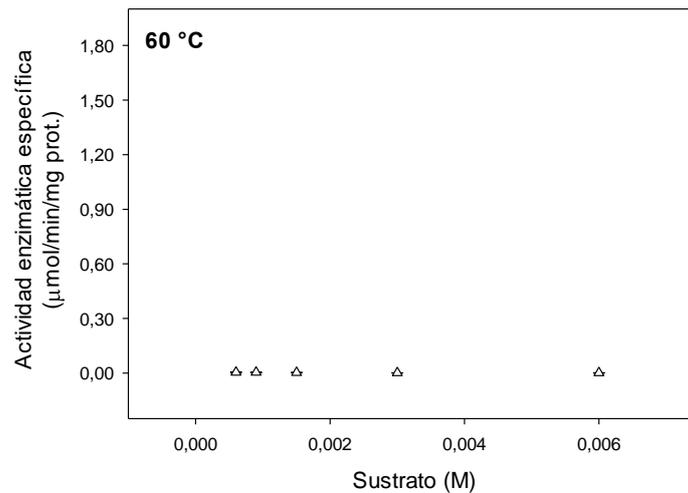


Figura 10: Variación de la velocidad de formación de producto de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* a temperaturas de incubación de 30, 40, 50 y 60 °C a distintas concentraciones de pNPG. Concentración de enzima 5 µg/ml, tiempo de incubación 20 min.

En función de los resultados experimentales se observa que el comportamiento cinético de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* sigue el modelo de Michaelis-Menten para las temperaturas de 30, 40 y 50 °C, por debajo de una concentración de sustrato de 6 mM. A 60 °C la enzima pierde totalmente la capacidad para hidrolizar al sustrato.

Del ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Como se puede ver en la **Tabla 11** y en la **Figura 11**, la temperatura óptima para esta enzima es 40 °C ya que a dicha temperatura se registra la mayor actividad enzimática (V_{max} de $1,81 \pm 0,04$ µmol/min/mg de proteína). Los valores de V_{max} disminuyen a medida que aumenta la temperatura después de los 40 °C lo que sugiere una menor cantidad de enzima activa a mayor temperatura. El valor de K_m obtenido a 40 °C ($0,22 \pm 0,02$ mM) está de acuerdo con lo reportado por otros autores en condiciones similares (Yamamoto, *et al.*, 2004; Tabata, *et al.*, 1984), sin embargo, no es posible comparar los valores de V_{max} porque los métodos utilizados, si bien utilizan el mismo sustrato, no son iguales; no son descriptos detalladamente en la bibliografía o no fueron expresados con unidades internacionales.

Por encima de los 40 °C se observó la pérdida de actividad y disminución de la afinidad (aumento de K_m), por desnaturalización de la proteína debido al efecto de la temperatura.

Tabla 11: V_{max} y K_m obtenidos experimentalmente para temperaturas de incubación 30, 40, 50 y 60°C para la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*.

Temperatura (°C)	$V_{max} \pm EE$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.)	$K_m \pm EE$ (mM)
30	$0,78 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
40	$1,81 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,02$
50	$1,29 \pm 0,06$	$2,71 \pm 0,26$
60	---	---

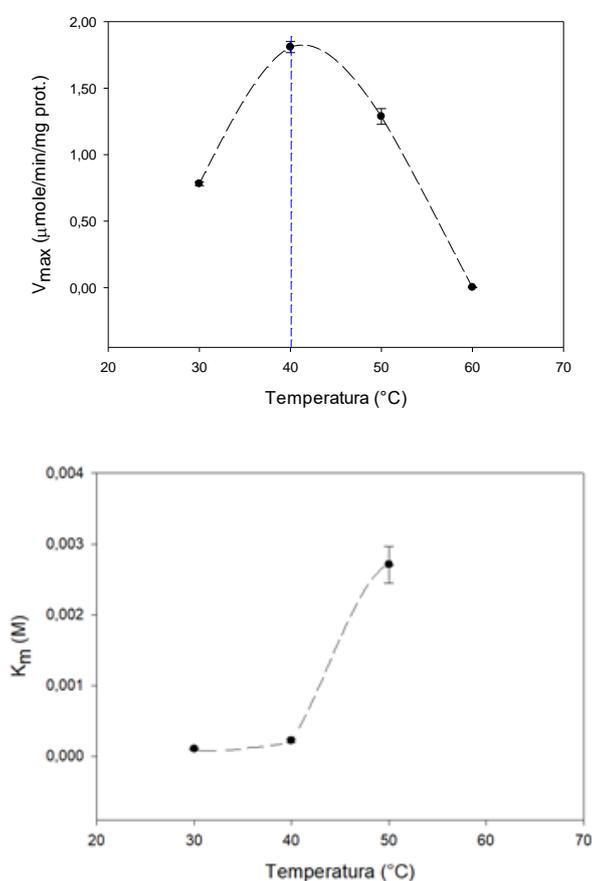


Figura 11: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y la afinidad de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* para la hidrólisis de pNPG. La línea de puntos azul señala la temperatura óptima para la enzima.

4.2.3 Efecto de la temperatura sobre la estructura de la α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*

La fluorescencia intrínseca de una proteína resulta de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos que se encuentran formando parte de su estructura y de la interacción de estos con su entorno. La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada se deben a la excitación de los residuos de triptófano, con algunas emisiones debido a la tirosina y fenilalanina. El triptófano tiene una longitud de onda de máxima absorción de 280 nm y su pico de emisión va desde 300 a 350 nm dependiendo de la polaridad del medio ambiente local (el pico se corre a mayores longitudes de onda cuando el ambiente es más polar), por lo que puede ser usada como indicador de los microambientes del triptófano y por ende de cambios en el plegamiento de la proteína que modifiquen su microambiente (Nilsen, 2003).

Es decir, cuando una proteína se encuentra en su estado de conformación nativo-plegada en medio acuoso, los triptófanos que forman parte de su estructura se encuentran más o menos expuestos al solvente acuoso polar, según su localización en la estructura tridimensional de la proteína. Si por algún motivo, la proteína sufriera cambios en su estructura, los triptófanos que estaban protegidos en el corazón hidrofóbico de la estructura podrían quedar más expuestos al medio acuoso lo que llevaría a un corrimiento del espectro de emisión, permitiendo sugerir la desnaturalización de la proteína (Santos, 2009).

Con el objetivo de evaluar el efecto del aumento de la temperatura sobre la estructura de la enzima, se midió la fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa *Saccharomyce cerevisiae* (Tipo I, 0,1 mg/ml en solución buffer-fosfato) a lo largo del proceso de calentamiento y para determinar si el efecto observado era reversible, también se registraron espectros en el proceso de enfriamiento. Además, para simular el tratamiento que recibe la enzima que se encuentran en la miel, se incluyó en el trayecto de calentamiento una incubación a 50°C por 30min (precalentado) y al llegar a 60°C se mantuvo a dicha temperatura durante 10 min o 20 min antes de comenzar el ciclo de enfriamiento, para emular la pasteurización.

Las gráficas de la **Figura 12** nos muestran espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa de *Saccharomyce cerevisiae* registrados durante el proceso de calentamiento. Se observó que a 25 °C el pico máximo de intensidad de fluorescencia (λ_{max}) ocurrió a los 351 nm. El aumento de la temperatura indujo la disminución de la intensidad de fluorescencia respecto a la observada a 25 °C y un corrimiento batocrómico del espectro, es decir hacia valores mayores de λ (de menor energía).

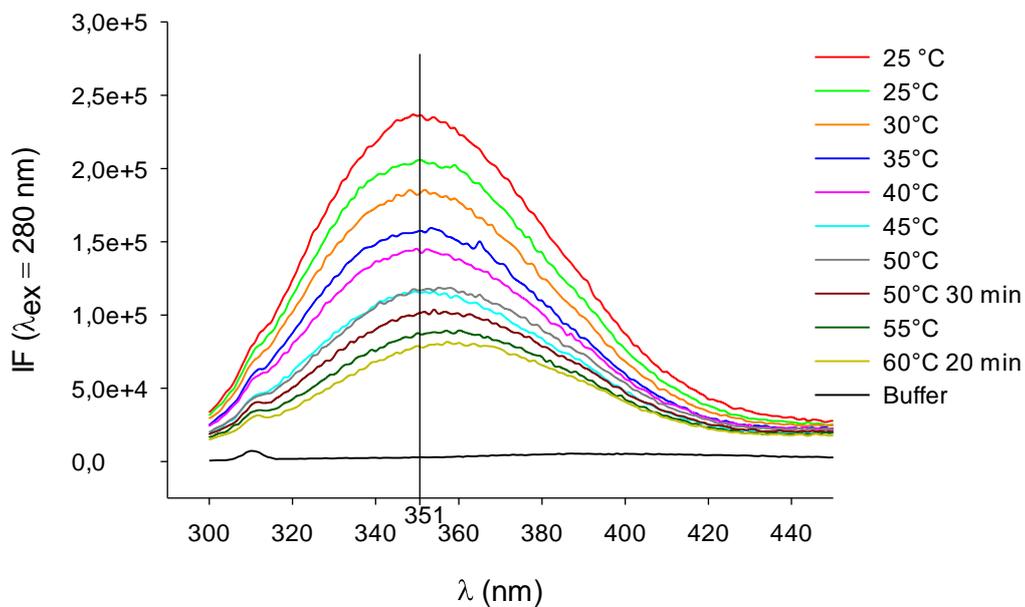
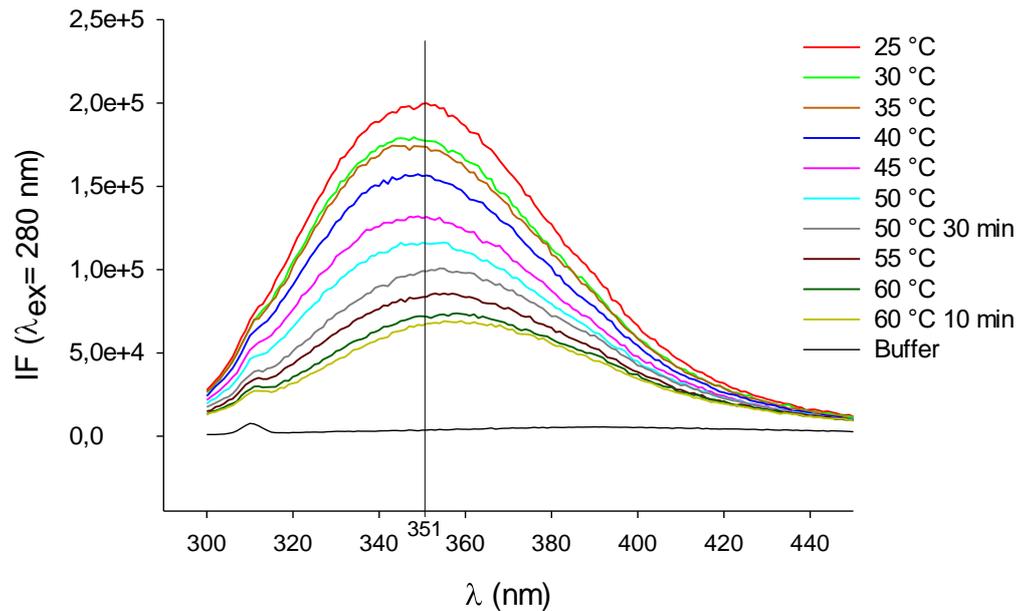


Figura 12: Espectros de fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* durante el proceso de calentamiento. En los gráficos se indica el pico máximo de IF a 25 °C.

Se graficó el porcentaje de intensidad de fluorescencia a 351 nm respecto a la IF inicial a 25 °C incluyendo el proceso de calentado y enfriado y se calculó el % de disminución de la intensidad de fluorescencia. En estos gráficos (**Figura 13**) se observa claramente como disminuye la IF con el aumento de la temperatura y cómo no se recupera dicha IF al volver a la temperatura inicial.

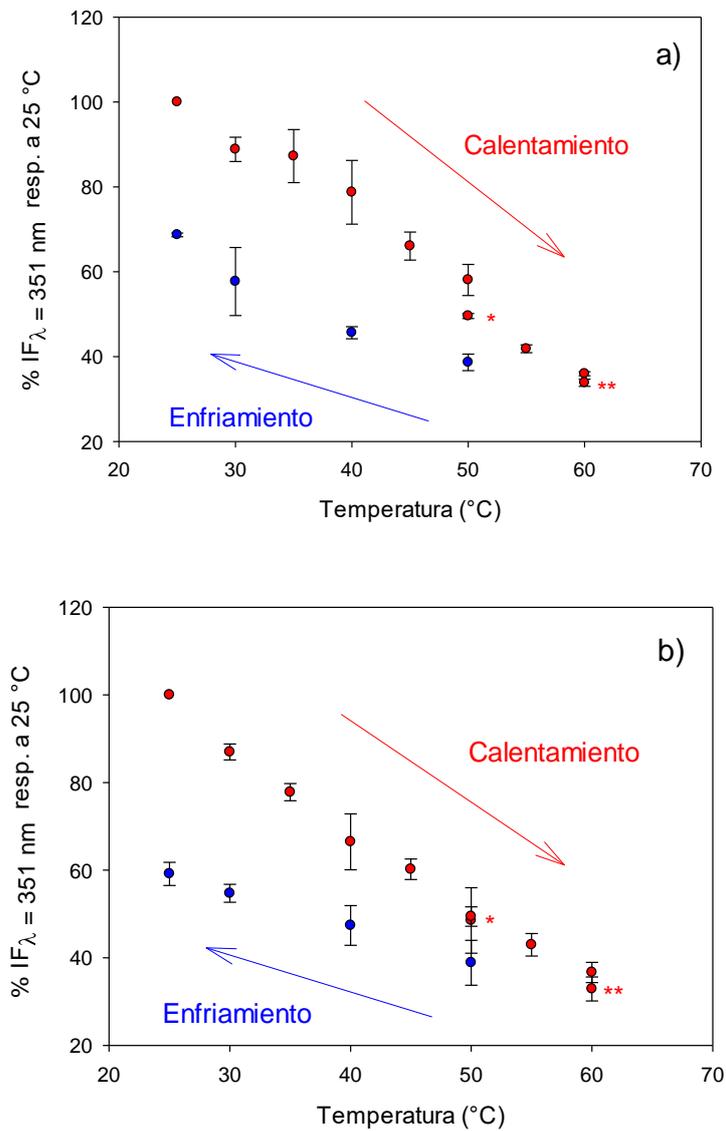


Figura 13: Porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia (IF) respecto a la IF a 25 °C de solución de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae*.

a) Calentamiento máximo de 60 °C por 10 min indicado con dos asteriscos. b) Calentamiento máximo de 60 °C por 20 min indicado con dos asteriscos. El calentamiento a 50 °C por 30 min indicado con un asterisco.

En la **Tabla 12**: se muestran los valores representados en la **Figura 13**. Se puede observar que a medida que se aumentó la temperatura disminuyó el porcentaje de intensidad de fluorescencia llegando a valores similares en ambas experiencias ($33,9 \pm 0,9$ % de IF a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y $32,9 \pm 2,7$ % de IF a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min). Para decidir si las diferencias entre las medias observadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 10 min y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 20 min se pueden justificar por los errores aleatorios, se realizó una prueba de significancia mediante el test de Student (Miller, J.C. & Miller, J.N., 1993) no mostrando diferencias estadísticamente significativas en ambos valores ($P=0,05$). En el proceso de enfriamiento, se puede observar que a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se logró recuperar los valores de IF iniciales, pero dado que la intensidad de fluorescencia del triptófano (uno de los aminoácidos de residuos aromáticos que genera fluorescencia) disminuye con la temperatura, independientemente de si ocurren cambios en su entorno (Lakowicz, 2006), los porcentajes de disminución de IF no pueden atribuirse exclusivamente a la pérdida de estructura. En función de esto, la posición del espectro ($\lambda_{\text{máx}}$) resulta un parámetro más exacto para evaluar los cambios en el entorno del triptófano por desnaturalización de la proteína por efecto de la temperatura.

Tabla 12: Porcentaje de intensidad de fluorescencia (IF) respecto a la IF a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de solución de α -glucosidasa purificada a partir de *Saccharomyce cerevisiae* a temperaturas de calentamiento y enfriamiento.

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	% IF \pm EE ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min)		% IF \pm EE ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 min)	
	Calentamiento	Enfriamiento	Calentamiento	Enfriamiento
25	100	$68,7 \pm 0,4$	100	$59,2 \pm 2,6$
30	$88,8 \pm 2,9$	$57,7 \pm 8,0$	$87,0 \pm 1,81$	$54,7 \pm 2,0$
35	$87,3 \pm 6,3$		$77,8 \pm 2,0$	
40	$78,7 \pm 7,5$	$45,6 \pm 1,4$	$66,5 \pm 6,3$	$47,4 \pm 4,5$
45	$66,0 \pm 3,3$		$60,2 \pm 2,3$	
50	$58,1 \pm 3,7$	$38,7 \pm 1,9$	$48,5 \pm 7,5$	$38,9 \pm 5,1$
50 *	$49,6 \pm 0,6$		$49,4 \pm 2,2$	
55	$41,8 \pm 0,9$		$43,0 \pm 2,6$	
60	$36,0 \pm 0,5$		$36,7 \pm 2,3$	
60 **	$33,9 \pm 0,9$		$32,9 \pm 2,7$	

* calentamiento por 30 min.

** calentamiento por 10 min o por 20 min

La **Figura 14** muestra la variación de $\lambda_{\text{máx}}$ con la temperatura. El corrimiento del espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la α -glucosidasa indica que el aumento de la temperatura desnaturaliza la proteína exponiendo los triptófanos a un entorno más polar y que ese cambio en la estructura de la proteína es irreversible ya que luego del proceso de enfriamiento no se recuperan los valores iniciales de $\lambda_{\text{máx}}$. No se observan diferencias entre las incubaciones por 10 o 20 minutos a 60°C.

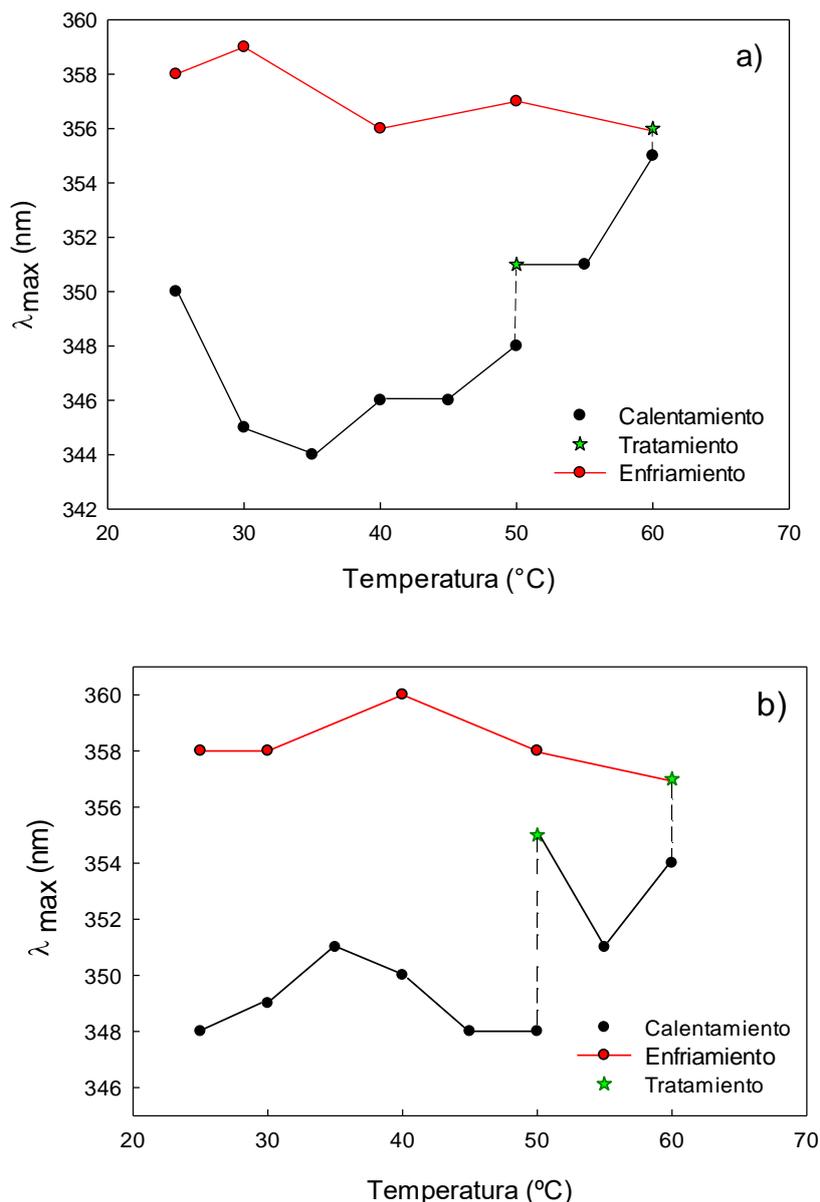


Figura 14: Efecto del ciclo de calentamiento-enfriamiento sobre los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de α -glucosidasa de *Saccharomyce cerevisiae*
a): tratamientos a 50 °C por 30 min y 60 °C por 10 min
b): tratamientos a 50 °C por 30 min y 60 °C por 20 min

4.3 Efecto de la temperatura y tratamientos térmicos simulados en laboratorio sobre la actividad α -glucosidasa en miel

4.3.1 Cinética de la actividad α -glucosidasa en miel

Según lo reportado por Nishimoto *et al.* y Kubota *et al.*, la principal α -glucosidasa de la miel corresponde a la α -glucosidasa III de *Apis mellifera*, la cual hidroliza sacarosa y pNPG ajustándose al modelo de Michaelis-Menten (2001; 2004). Además, estos autores, determinaron que el pH óptimo para esta enzima es 6 y la temperatura óptima 40 °C.

En la Figura 15 se puede observar que la temperatura óptima de la enzima presente en las mieles de del Dpto. de Cruz del Eje de Córdoba es 40 °C, coincidiendo con el trabajo de Nishimoto y Kubota, y que a medida que aumenta la temperatura la actividad disminuye siguiendo un patrón similar al observado con la α -glucosidasa purificada a partir de la *Saccharomyce cerevisiae* mostrado en la **Figura 11**.

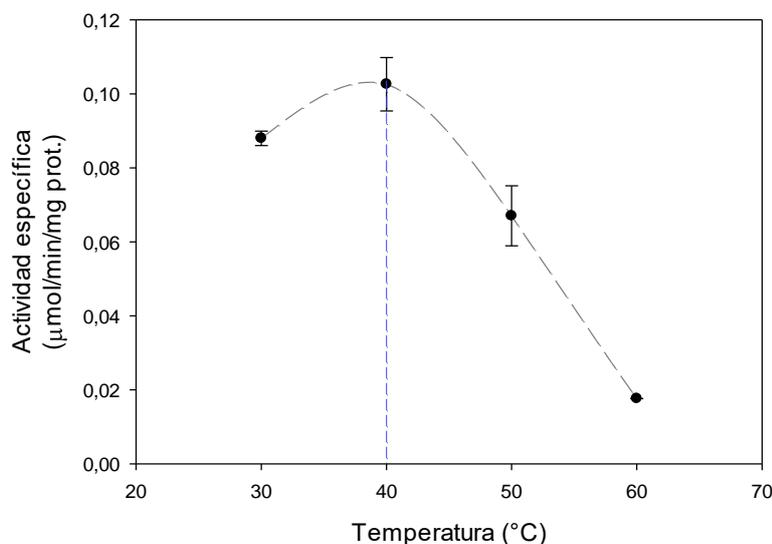


Figura 15: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la α -glucosidasa en la miel M1. La línea de puntos azul señala la temperatura óptima para la enzima.

La **Figura 16 a)** muestra la curva de sustrato realizada a partir de la enzima presente en la miel M1, siguiendo el método descrito en el punto 3.3.1 donde se respeta la cantidad de enzima y el tiempo de reacción sugerido por Siegenthaler, y que son los mismos que adopta la IHC para realizar sus determinaciones de NI. En este caso, con el objetivo de

determinar los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} , los valores fueron expresados como actividad específica previo la determinación del contenido de proteína por el método Bradford como se describió en el punto 3.8. El valor obtenido fue de $0,62 \pm 0,22$ mg proteína por gramo de miel.

Se observa que la curva de sustrato no alcanza claramente la meseta típica correspondiente a la V_{max} , posiblemente porque la concentración de sustrato máxima utilizada (17 mM) no fue suficiente. Es necesario aclarar que no fue posible utilizar concentraciones mayores de sustrato debido a la baja solubilidad de este en buffer-fosfato. Es por esto que, aparte de ajustar los datos experimentales a la ecuación de Michaelis - Menten, para obtener los parámetros cinéticos también se realizó el gráfico de las dobles recíprocas de Lineaweber-Burk (Fennema, O., 2010) mostrado en la **Figura 16 b**).

A partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten se determinó el valor de $V_{max} = 0,17 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. que refleja la cantidad de enzima activa en la miel M1 y el valor de $K_m = 7,11 \pm 0,95$ mM que muestra la afinidad de la enzima por el sustrato artificial pNPG. A partir del gráfico de Lineaweber-Burk se determinaron los siguientes valores para los parámetros cinéticos $V_{max} = 0,13$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. y $K_m = 5,73$ mM.

Los valores obtenidos de V_{max} y K_m fueron inferiores a los reportados por diversos autores para esta enzima, pero purificada a partir de abejas (Kubota M., *et al.*, 2004; Nishimoto, M., *et al.*, 2001) o purificada a partir de mieles (Pontoh, 2001; Huber R. E & Mathison R. D., 1976). Esto puede deberse principalmente a que los métodos utilizados por estos autores no siempre fueron los mismos a los utilizados en este trabajo, como así también, la enzima fue purificada. En este trabajo la enzima no fue purificada desde la miel, es decir que el medio en donde ocurrió la reacción fue distinto, y si bien, la afinidad por el pNPG de la enzima presente en la miel es muy alta, la enzima también podría estar hidrolizando, aunque en menor medida, la sacarosa presente estableciéndose un nuevo equilibrio en donde se hidroliza menos pNPG (Nishimoto, *et al.*, 2001). Además de los azúcares y el agua, la miel contiene otras sustancias en menor proporción. Los ácidos orgánicos (predominantemente el ácido glucónico) que derivan de la transformación del néctar en azúcares o directamente del néctar dándole a la miel una leve acidez, se encuentra en una concentración aproximada del 0,6 % (da Silva, *et all*, 2016). Es sabido que

la actividad enzimática varía en función de la acidez. Nishimoto, *et all*, realizó el estudio para la α -glucosidasa tipo III purificada en su trabajo del 2001 determinando que el pH óptimo para la enzima era de 6. Por otro lado, en el trabajo de Baroni M.V., *et all*, del 2009 determinó que el pH de las mieles del NO de Córdoba estaba en el rango de 3,2 y 5,8, lo que puede sugerir que el pH natural de la miel está por debajo del pH óptimo. Sin embargo, para las determinaciones de actividad enzimática según el método utilizado en este trabajo, se regula la acidez mediante un buffer, siendo el pH de la reacción de 6 (pH óptimo para la α -glucosidasa), por tal motivo se descarta que los ácidos orgánicos pudieran influir en los resultados de actividad. Otro factor que puede influenciar en la actividad enzimática son los compuesto fenólicos. En la miel existen más de 10.000 compuestos fenólicos identificados (flavonoides y no flavonoides) entre los cuales se encuentran la quercetina, la miricetina y el kaempferol (da Silva, *et all*, 2016). En un estudio se analizó la inhibición de la α -glucosidasa de levaduras por parte de 16 flavonoides utilizando pNPG como sustrato, y se demostró que la quercetina, miricetina y el kaempferol tenían un efecto inhibitor de más del 50 % en esta enzima, siendo la quercetina el que produjo la mayor inhibición (8 μ g produjo una inhibición del 50 %) (Iio, *et all*, 1984). En las mieles argentinas la concentración de compuestos fenólicos es de 700 a 800 μ g expresados como ácido gálico por gramo de miel (Patrignani & Lupano, 2016). Sin embargo no contamos con reportes sobre el contenido específico de los diferentes flavonoides en las mieles del Dpto. de Cruz del Eje, por lo que no podemos asegurar que en la solución de reacción para la determinación de la actividad de la α -glucosidasa utilizada en este trabajo exista una inhibición apreciable producida por estos compuestos.

Analizar mayor cantidad de mieles permitiría caracterizar a las mieles de la región en cuanto al contenido de α -glucosidasa.

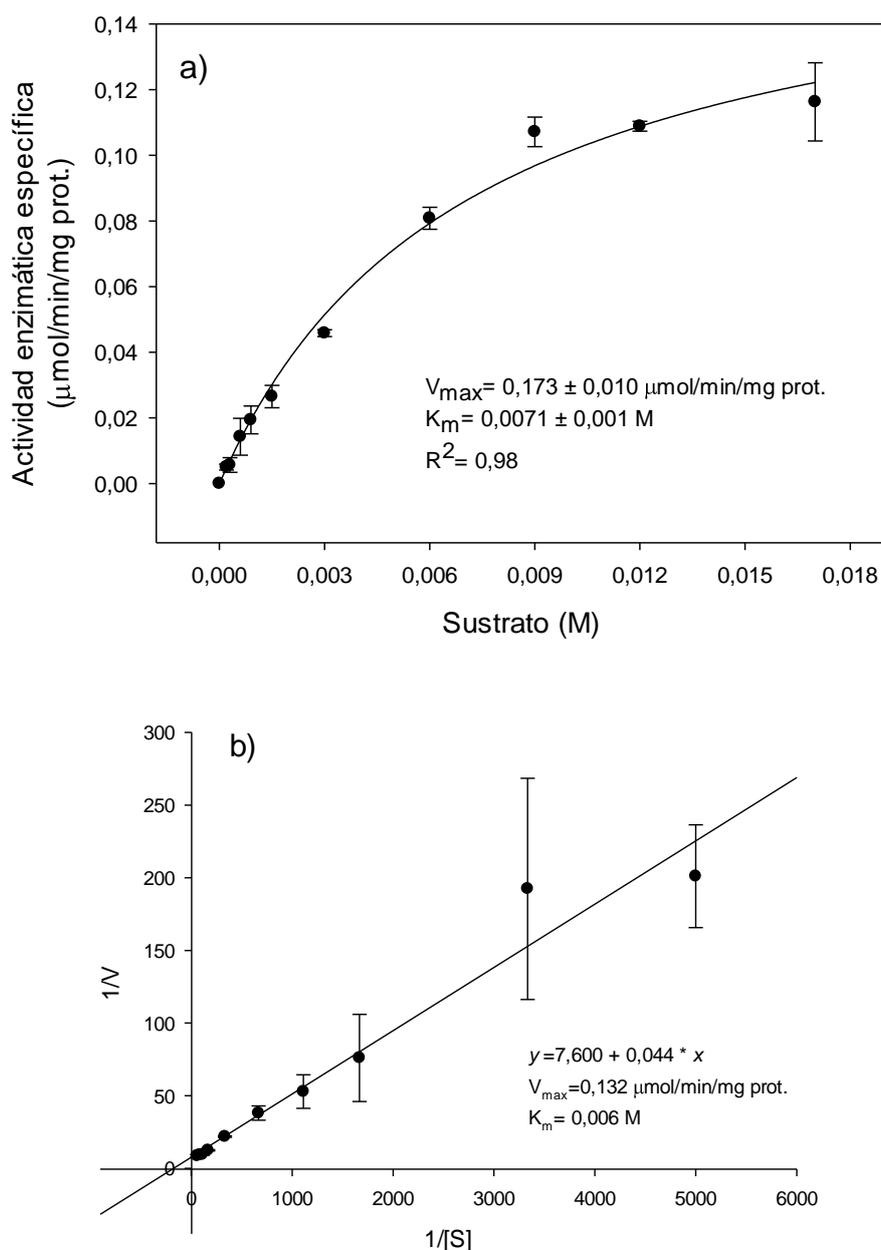


Figura 16: Curva de sustrato para la actividad de α -glucosidasa de la miel a 40°C para la miel M1. Concentración de miel $0,017 \text{ g/ml}$, tiempo de incubación 20 min .
a) Gráfica Michaelis-Menten y b) gráfica Lineaweaver-Burk.

4.3.2 Efecto de tratamientos térmicos sobre la α -glucosidasa en miel

Cuatro muestras de mieles de diferentes productores del Dpto. de Cruz del Eje, fueron sometidas a tratamientos térmicos diferentes (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio según se describe en el punto 3.6 de materiales y métodos. Posteriormente se determinó la actividad α -glucosidasa según el método

descrito en el punto 3.3.1 con el objetivo de observar el efecto de dichos tratamientos sobre la actividad enzimática y brindar sugerencias de los tiempos y temperaturas que afecten mínimamente la actividad de esta enzima, y de esa manera preservar la calidad de la miel.

Las mieles genuinas, sin ningún tratamiento térmico, fueron consideradas como muestra control. En este caso, la actividad enzimática se expresó como Número de Invertasa (NI).

En la **Tabla 13** se muestran los valores obtenidos para el parámetro la actividad α -glucosidasa, expresado como Número de Invertasa (NI). Las cuatro mieles mostraron valores $NI > 10$, superiores al mínimo recomendado por la IHC, mínimo 10 NI (Bogdanov S., *et al.*, 1999).

Para valorar la calidad de las determinaciones de la actividad α -glucosidasa en miel, realizadas en nuestro laboratorio, comparamos nuestros resultados con los obtenidos por un laboratorio de referencia (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). Para decidir si las diferencias entre las medias obtenidas en nuestro laboratorio y las medias obtenidas por el laboratorio de referencia se pueden justificar por los errores aleatorios, se realizó una prueba de significancia a través del test de Student (Miller, J.C. & Miller, J.N., 1993). La media del valor de NI de la miel identificada como M3, mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor de la media de NI de la referencia ($P=0,05$), dando un valor levemente superior como se puede ver la **Tabla 13**. Esta diferencia se puede deber a errores de reproducibilidad y repetibilidad del método. Para este trabajo se adoptaron los NI obtenidos en nuestro laboratorio. A partir de estos resultados podemos decir que nuestro protocolo para medir actividad de α -glucosidasa es confiable.

Tabla 13: Resultados obtenidos de NI para las cuatro mieles del Departamento de Cruz del Eje y valores obtenidos por el Laboratorio INTI-Agroalimentos.

Muestra	NI Obtenidos	NI Referencia
M1	13,8 ± 0,3	14,13 ± 0,03
M2	11,6 ± 0,1	10,93 ± 0,88
M3	15,9 ± 0,5	14,50 ± 0,57
M4	12,1 ± 0,4	11,53 ± 0,38

Los resultados corresponden a la media ± una desviación estándar.

En la **Figura 17** y la **Figura 18** se puede observar el efecto de los tratamientos térmicos sobre la enzima presente en las cuatro mieles. Todas las mieles que recibieron tratamientos térmicos experimentaron una reducción en la actividad de la α -glucosidasa respecto a la muestra control, aunque la reducción fue característica de cada miel.

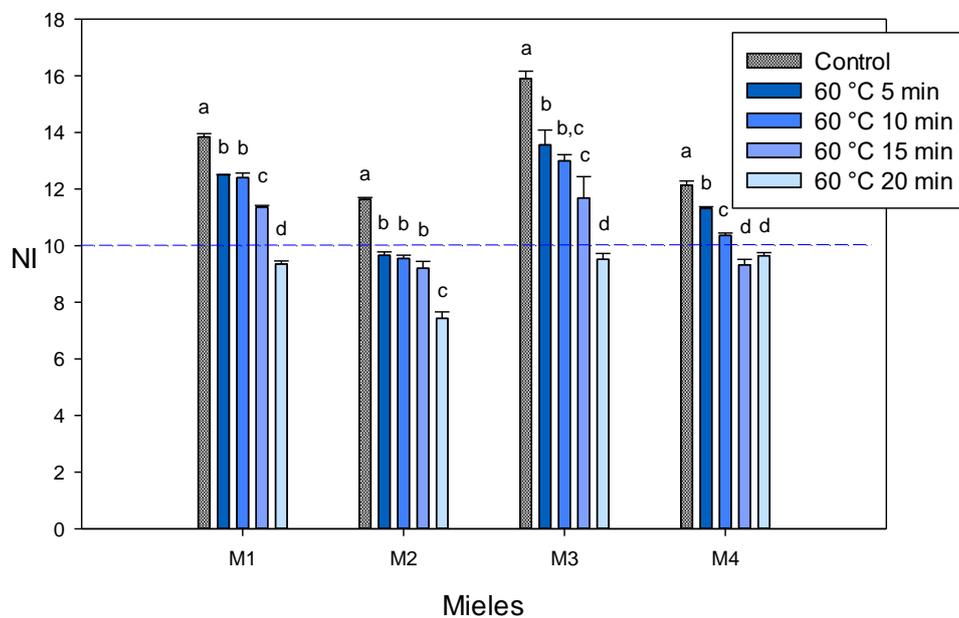


Figura 17: Gráfico de NI para el control y muestras con tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio a 60 °C y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 min con calentamiento previo de 50 °C por 30 min. Para cada grupo, las medias con una letra común no son significativamente diferentes para $p \leq 0,05$ (Análisis de varianza con test a posteriori LSD de Fisher). La línea de puntos azul señala el valor mínimo recomendado internacionalmente de NI.

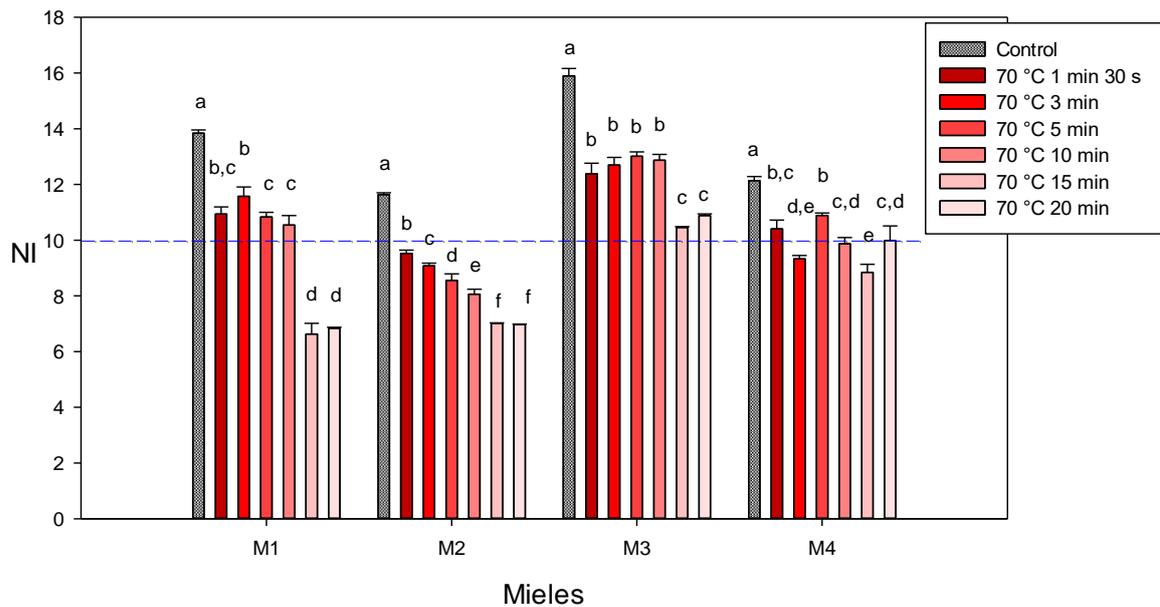


Figura 18: Gráfico de NI para el control y muestras con tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio a 70 °C y tiempos de exposición de 1 min 30 s, 3, 5, 10, 15 y 20 min con calentamiento previo de 50 °C por 30 min. Para cada grupo, las medias con una letra común no son significativamente diferentes para $p \leq 0,05$ (Análisis de varianza con test a posteriori LSD de Fisher). La línea de puntos azul señala el valor mínimo recomendado internacionalmente de NI.

En el **Apéndice 4** se muestra el efecto en la actividad enzimática de los tratamientos aplicados en cada miel por separado (M1, M2, M3 y M4). Las medias muestrales de NI del control y todas las medias de NI de las mieles con tratamiento fueron graficadas y se confeccionaron tablas en orden decreciente de NI en función de los resultados experimentales.

Como se pudo comprobar según los resultados individuales (**Apéndice 4**), el efecto de la temperatura (60 °C y 70 °C) a distintos tiempos de exposición y con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min aplicado a cada miel, llevó a una disminución irreversible de la actividad enzimática de la α -glucosidasa en todos los casos y, dependiendo del valor inicial de actividad enzimática, esta disminución estuvo por debajo del valor recomendado internacionalmente, mínimo 10 NI (Bogdanov S., *et al.*, 1999). Además, se ensayó el protocolo sugerido por el fabricante del pasteurizador Farli (68-72 °C por 1 min 30 s). La experiencia realizada en este trabajo a 1 min 30 s con un calentamiento previo de 50 °C por 30 min (proceso de precalentamiento/homogeneizado) llevó a una disminución de entre el

14 al 22 % del NI llevando ese valor al límite de tolerancia, esto se puede ver en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Porcentaje de disminución de la actividad enzimática en mieles después de recibir tratamientos térmicos simulados en laboratorio.

Tratamiento térmico	% de disminución de la actividad enzimática			
	60 °C 20 min*	70 °C 1 min 30 s**	70 °C 15 min*	70 °C 20 min*
M1	32,2	21,0	52,1	50,7
M2	36,2	18,1	39,8	40,1
M3	40,1	22,1	34,2	31,5
M4	23,2	14,3	27,1	17,7
% disminución promedio	32,9	18,9	38,3	35,0

* Con calentamiento previo a 50 °C 30 min

** Protocolo pasteurizador simulado en laboratorio con calentamiento previo a 50 °C 30 min

En la **Figura 19** se muestra comparativamente el efecto sobre la actividad de α -glucosidasa, expresada como actividad específica en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, de los tratamientos aplicados a 60 °C y a 70 °C a tiempos iguales (5, 10, 15 y 20 min) para cada miel. Para ello, previamente se determinó la cantidad de proteína de las cuatro mieles por el método Bradford descrito en el punto 3.8 y los resultados se muestran en la **Tabla 10**.

En base a la **Figura 16** podemos decir que los valores graficados corresponden a valores de V_{max} ($[S]=17\text{mM}$). Estos gráficos, al igual que la **Figura 17** y la **Figura 18**, permiten observar la variabilidad que existe entre las mieles, lo que pone en evidencia la necesidad de trabajar con mayor cantidad de muestras para poder estimar los valores poblacionales de las mieles de esta zona. Sin embargo, es posible determinar que en todos los casos el tiempo de exposición a altas temperaturas lleva a la disminución de la actividad de la enzima en porcentajes diversos.

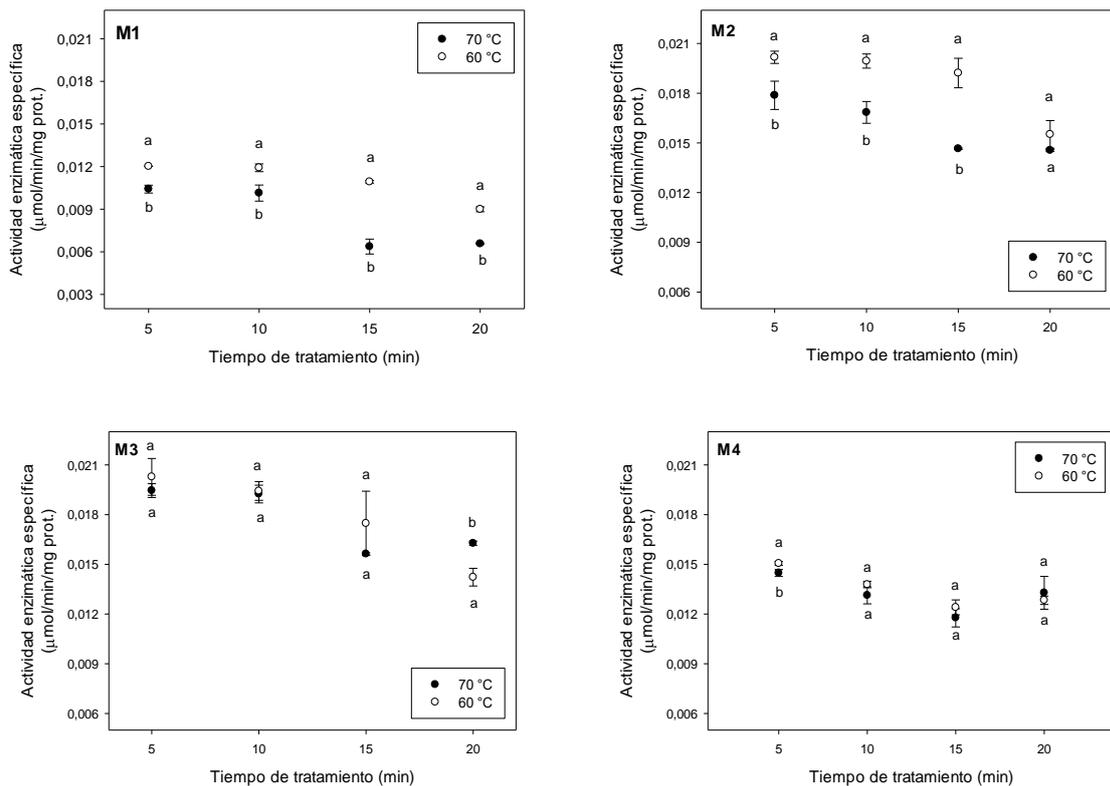


Figura 19: Gráfico de puntos de actividad α -glucosidasa expresada como actividad específica según tratamientos a 60 °C y 70 °C a iguales tiempos (5, 10, 15 y 20 min) para las mieles M1, M2, M3 y M4. Comparación de pares de datos para cada tiempo (5, 10, 15 y 20 min) y prueba de significancia a través del test de Student. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Por último, se compararon todas las medias muestrales de NI (controles y todas las muestras tratadas térmicamente) de las cuatro mieles. Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se realizó un Análisis de Varianza con un diseño en bloque completos al azar, considerándose a cada miel un bloque y recibiendo cada bloque los mismos tratamientos (10 tratamientos y precalentamiento según lo mostrado en **Tabla 8**), y test LSD Fisher para evaluar diferencias significativas (Balzarini, y otros, 2012).

Al igual que en el análisis de las mieles individuales (**Apéndice 4**) la media muestral de NI de todas las muestras sin tratamiento (NI 13,3), fue el valor de mayor actividad α -glucosidasa respecto a las medias muestrales de NI de todas las muestras que recibieron

tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio. Las diferencias fueron estadísticamente significativas como se muestra en la **Figura 20**.

La menor disminución en la actividad α -glucosidasa se evidenció en las muestras que recibieron tratamientos térmicos a 60 °C por 5 min y 10 min con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min, con medias muestrales de NI de 11,8 y 11,3 respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Los porcentajes de disminución de la actividad fueron de 11,7 % y 14,9 % para cada caso. La mayor disminución de la actividad α -glucosidasa se evidenció en las muestras que recibieron tratamientos térmicos a 60 °C por 20 min y 70 °C por 15 y 20 min, no habiendo diferencias significativas entre las medias de NI de las muestras que recibieron los tratamientos a 60 °C por 20 min y 70 °C por 20 min y entre las muestras que recibieron los tratamientos a 70 °C por 15 y 20 min. Los porcentajes de disminución de la actividad fueron de 32,5 %, 38,1 % y 34,9 % para 60 °C por 20 min, 70 °C por 15 y 70 °C por 20 min respectivamente.

Podemos decir que, tratamientos a 60 °C por 20 min o tratamientos a 70 °C por 15 y 20 min, previo a un calentamiento a 50 °C por 30 min, implicó una reducción por debajo del valor recomendado internacionalmente, mínimo 10 NI, (Bogdanov S., *et al.*, 1999) con una disminución porcentual de la actividad del 32,5 %, 38,1 % y 34,9 % respectivamente. Esto puede verse más claramente en la **Tabla 15**: NI de las muestras control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de las muestras con tratamientos térmicos para las cuatro mieles.

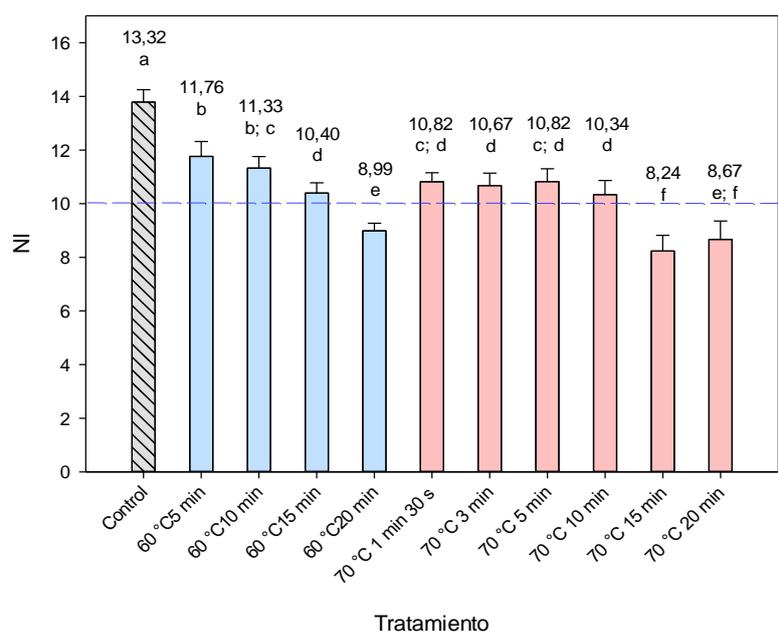


Figura 20: Gráfico de barra de NI para las muestras control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para las cuatro mieles. Análisis de varianza ($R^2=0,87$ y $CV=7,40$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). La línea de puntos señala el valor mínimo recomendado internacionalmente de NI.

Tabla 15: NI de las muestras control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de las muestras con tratamientos térmicos para las cuatro mieles. La línea de puntos señala el valor mínimo recomendado internacionalmente para NI.

Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
Temperatura	Tiempo				
Control	(sin tratamiento)	13,3	0,2	a	0,0
60 °C	5 min	11,8	0,3	b	11,7
60 °C	10 min	11,3	0,2	b; c	14,9
70 °C	5 min	10,8	0,2	c; d	18,8
70 °C	1 min 30 s	10,8	0,2	c; d	18,8
70 °C	3 min	10,7	0,2	d	19,9
60 °C	15 min	10,4	0,2	d	22,0
70 °C	10 min	10,3	0,2	d	22,4
60 °C	20 min	9,0	0,2	e	32,5
70 °C	20 min	8,7	0,3	e; f	34,9
70 °C	15 min	8,2	0,3	f	38,1

Nota: Análisis de varianza ($R^2=0,87$ y $CV=7,40$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Diversos trabajos han estudiado cómo afecta la temperatura a la calidad de la miel tanto en procesos de “pasteurización” como almacenamiento basándose principalmente en la actividad diastasa y el contenido de HMF entre otros (Tosi, *et al.*, 2002; Tosi, *et al.*, 2004; Turkmen, *et al.*, 2006; Molino, *et al.*, 2011; Escriche, *et al.*, 2008; Escriche, *et al.*, 2009; Adnan, *et al.*, 2014). Los resultados respecto al estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad α -glucosidasa se refieren principalmente a mieles de otros países y los tratamientos o metodología de análisis fueron diferentes a los aplicados en este trabajo (Chua, L., *et al.*, 2014; Lichtenberg-Kraag, 2012; Sramek, *et al.*, 2016). Algunos han reportado reducciones de la actividad invertasa del 50 % y 75 % para tratamientos por una hora a altas temperaturas, 60 °C y 70 °C respectivamente (Dimins, F., *et al.*, 2006), disminuciones entre el 50 % y hasta cerca del 70 % después de someter mieles de diversos orígenes florales a 55 °C por 24 h (Karabournioti & Zervalaki, 2001).

Gutierrez *et al.* presentó un estudio realizado en mieles argentinas mostrando el efecto de tratamientos térmicos simulados en laboratorio en la actividad α -glucosidasa donde se observó una disminución de la actividad α -glucosidasa (15,8 %). Sin embargo este estudio se realizó en mieles florales de pradera (2011), diferentes a las estudiadas en este trabajo.

En cuanto a la evaluación del tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, Orantes-Bermejo & Torre Fernandez-Piñar reportan una disminución de actividad α -glucosidasa promedio de 33,4 % en miel de castaña después de 10 meses, y una disminución promedio de 28,1 % en miel de romero en el mismo período de tiempo (2009). Así mismo Vorlová & Pridal, pudieron comprobar un descenso de un 77,8 % de la actividad α -glucosidasa de mieles comerciales checas comparadas con mieles frescas (2002).

Se puede observar que el calentamiento o el tiempo de almacenamiento siempre tienen un efecto negativo en la actividad α -glucosidasa con variaciones según la temperatura, tiempo de exposición a una temperatura dada, el tipo de almacenamiento, la actividad enzimática inicial y el tipo o variedad de miel.

En base a los resultados obtenidos para las cuatro mieles del Dpto. de Cruz del Eje de Córdoba, podemos concluir que los tratamientos térmicos que llevan a una disminución del NI por debajo de 10, valor mínimo recomendado internacionalmente, son aquellos a 60 °C por más de 15 min y a 70 °C por más de 10 min. Se registró en promedio, una reducción

de la actividad α -glucosidasa del 33 % para las mieles que recibieron un tratamiento a 60°C por 20 min y un 38 % para las mieles que recibieron un tratamientos a 70 °C por 15 min y 20 min, con un un precalentamiento a 50 °C por 30 min y enfriamiento posterior en todos los casos.

4.4 Efecto de la adulteración de miel con jarabe mezcla en la actividad α -glucosidasa

Se realizó la experiencia descrita en el punto 3.7 con el objetivo de observar cómo afecta a la actividad de la α -glucosidasa el agregado de azúcares simples, y si puede ser considerada esta enzima un indicador de adulteración a través de un método rápido, fiable y menos costoso que otros métodos para identificar azúcares más complejos como las dextrinas provenientes de la producción de glucosa o fructosa a partir de granos de maíz.

Para poder comparar los resultados hallados para cada miel, los mismos fueron expresados en actividad específica, ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Para ello se determinó la concentración de proteínas en las cuatro mieles por el método Bradford según el método indicado en el punto 3.8 y los resultados se muestran en la **Tabla 10**. Las mezclas con 10 % P/P y 20 % P/P con agua destilada no representarían una variación en la composición de la miel, por lo que se esperan resultados similares a la muestra control.

El jarabe utilizado (Sucrodex) es una mezcla que posee en su composición fructosa y glucosa como principales componentes. En el **Apéndice 6** se muestra el certificado de análisis suministrado por el fabricante. Este edulcorante es utilizado en la industria alimentaria para la elaboración de dulces y mermeladas, frutas escurridas y abrillantadas, licores, pulido de arroz, caramelos y conservas. Esta mezcla es de color claro y sabor dulce y estable a la temperatura, lo que permite almacenarse por largos períodos de tiempo a temperatura ambiente. Su menor precio, fácil disponibilidad y menor viscosidad en comparación con la miel, lo convierte en un buen candidato para ser utilizado como un adulterante, al igual que otros jarabes (jarabe de glucosa, jarabe de maíz de alta fructosa) de similares propiedades, los cuales son obtenidos de la hidrólisis del almidón del maíz. Como en su composición los azúcares principales son los mismos de la miel, es difícil de detectar su presencia. Para descartar la posibilidad de actividad enzimática, se realizó la determinación de actividad α -glucosidasa al jarabe mezcla según el método descrito en el punto 3.3.1 a 40 °C y 20 min de incubación, no detectando absorbancia de pNP⁻.

Se determinó la actividad α -glucosidasa a distintas temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 60 °C) a las mieles genuinas (muestra control) y a las mieles rebajadas en un 10 % P/P y 20 % P/P con jarabe mezcla y con agua destilada, para luego graficar la actividad específica vs. la temperatura. Para decidir si las diferencias entre las medias de la muestra control y las medias de las muestras adulteradas son significativas, es decir se deben a errores aleatorios, se aplicó una prueba de significación entre pares de muestras correspondiente a una misma temperatura mediante la aplicación del test de Student (Miller, J.C. & Miller, J.N., 1993).

El incremento en la concentración de glucosa en las mieles adulteradas representó el 3,2 % P/P y 6,4 % P/P para las mezclas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe mezcla, respectivamente. El incremento en la concentración de fructosa en las mieles adulteradas representó el 3,8 % P/P y 7,6 % P/P para las mezclas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe mezcla, respectivamente. En la **Tabla 16** y en la **Tabla 17** se muestran las concentraciones finales de estos azúcares según las preparaciones realizadas para este estudio.

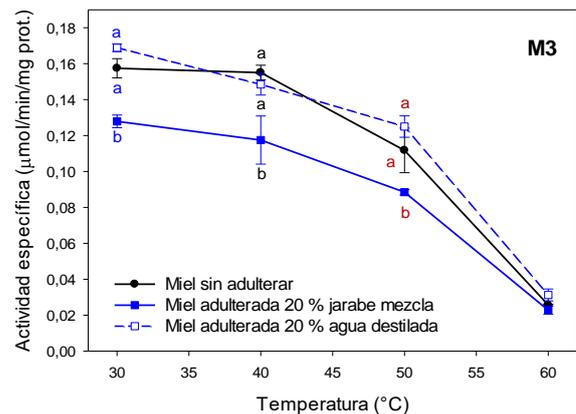
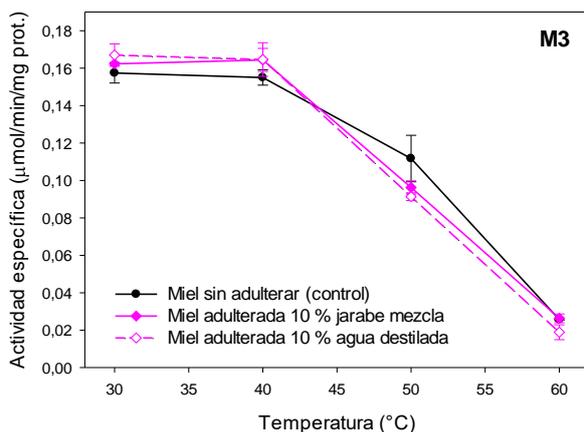
Tabla 16: Concentración de glucosa en mieles y jarabe mezcla, y las concentraciones finales de las mezclas realizadas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe.

Muestras	Glucosa g/100 g	Glucosa g/100 g 10 % jarabe	Glucosa g/100 g 20 % jarabe
M1	31,4	31,5	31,5
M2	31,6	31,6	31,7
M3	30,4	30,6	30,7
M4	27,3	27,8	28,2
Jarabe	32		

Tabla 17: Concentración de fructosa en mieles y jarabe mezcla, y las concentraciones finales de las mezclas realizadas con 10 % P/P y 20 % P/P de jarabe.

Muestras	Fructosa g/100 g	Fructosa g/100 g 10 % jarabe	Fructosa g/100 g 20 % jarabe
M1	40,6	40,3	40,1
M2	38,9	38,8	38,7
M3	40,7	40,4	40,2
M4	37,6	37,6	37,7
Jarabe	38		

Todas las mieles exhibieron la mayor actividad α -glucosidasa a los 40 °C y una reducción abrupta de la actividad a los 50 °C y 60 °C teniendo un comportamiento similar al de la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cereviceae* (punto 4.2.2). Las mieles M3 y M4, como se muestra en la **Figura 21**, tuvieron un comportamiento más cercano a lo esperado a temperaturas de 30, 40 y 50 °C, en comparación con las mieles M1 y M2 (**Apéndice 5**) donde no se evidencia claramente el efecto de la adulteración. Las diferencias en las mezclas con 10 % P/P de jarabe y la muestra control no son lo suficientemente grande como para rechazar que las diferencias observadas se deban a la variación aleatoria, sin embargo, se pueden observar diferencias significativas cuando la mezcla corresponde al 20 % P/P. Este efecto de reducción de la actividad enzimática por la presencia de azúcares simples podría asociarse a una inhibición por producto. Si bien la afinidad por el pNPG de la enzima presente en la miel es muy alta, la enzima también estará hidrolizando, aunque en menor medida, la sacarosa presente. 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 (Nishimoto, *et al.*, 2001).



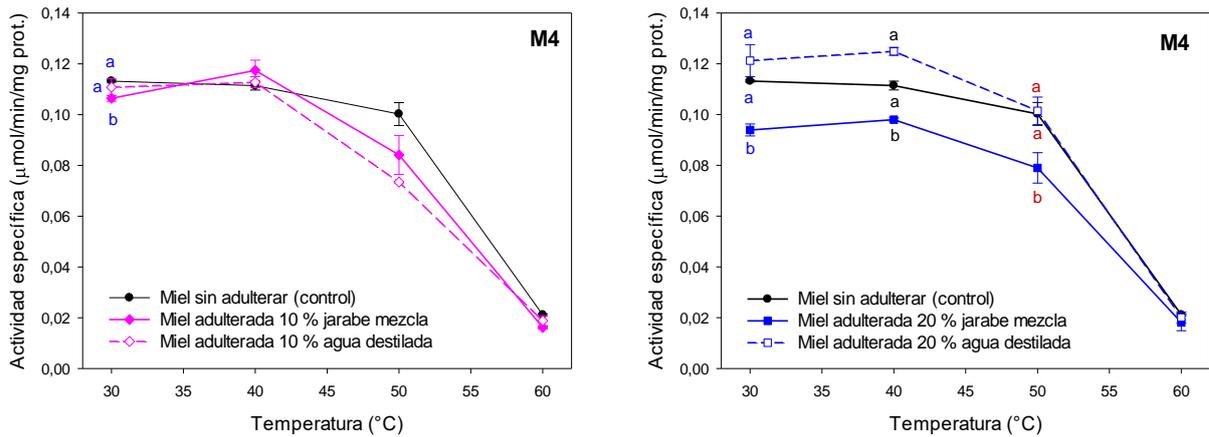


Figura 21: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de las mieles M3 y M4 a distintas temperaturas de incubación (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P= 0,050$).

En un estudio publicado por White *et al.* se evidenció que la actividad de la enzima α -glucosidasa presente en la miel es inhibida por glucosa y que además posee la capacidad de transglucosilación formando trisacáridos (α -maltosil β -D-glucosido) adicionando una glucosa a la sacarosa (1953), sin embargo, el trabajo no describe cómo es el mecanismo de inhibición. Por otro lado, en el trabajo de Huber *et al.*, donde se logra aislar la enzima α -glucosidasa de la abeja melífera, también describe la capacidad de transglucosilación y no hubo efecto de inhibición por glucosa a concentraciones hasta 0,5 M en prueba realizada pNPG como sustrato a concentración de 0,02 M (1976).

La disminución de la actividad de α -glucosidasa en la miel adulterada podría deberse también, a una propiedad alostérica de autoregulación de la α -glucosidasa inespecífica, pero esto podría ser poco probable según el trabajo Kubota *et al.* donde se estudiaron los tres tipos de α -glucosidasa presentes en la abeja *Apis mellifera* y la α -glucosidasa variante III, que es la enzima producida por la glándula hipofaríngea de la abeja y responsable de la conversión del néctar en miel, no presentó un comportamiento alostérico (2004).

Dado que el jarabe utilizado en nuestro trabajo contiene también maltosa, maltotriosa y restos de azúcares, podríamos sugerir que están inhibiendo la hidrólisis de pNPG en el sitio activo de la enzima, teniendo en cuenta que la maltosa es reconocida como sustrato de la enzima aparte de la sacarosa y que se ha descrito la inhibición de la hidrólisis

de pNPG en presencia de trealosa (Huber R. E & Mathison R. D., 1976). 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. La única forma de poder establecer que existe una inhibición por producto es a través de datos empíricos, lo que podría ser el objetivo de futuros trabajos.

En cuanto a la detección de una adulteración, se ha reportado el uso de métodos cromatográficos (HPLC) y espectroscópicos (FTIR) que resultan laboriosos y costosos para su implementación. Fattori *et al.*, ha realizado una experiencia mediante TLC (cromatografía de columna de capa fina) para detectar adulteración de mieles mediante la cuantificación de maltodextrinas (polímero de la glucosa que aparece como resultado de la hidrólisis del almidón). En el estudio se realizaron mezclas de miel pura en distintas proporciones con jarabe de glucosa (1, 2, 5, 7 y 10 % P/P). Mediante este método la mínima detección de jarabe de glucosa fue de 0,5 % P/P (Fattori, *et al.*, s.f.). En el trabajo no se especifica la concentración de glucosa de dicho jarabe, pero sí se puede inferir que, mediante métodos de TLC, es posible detectar pequeñas cantidades de este adulterante, sin embargo, es un método muy laborioso y costoso. Por su parte, Abdel-Aal, *et al.*, propuso un método para detectar adulteración en base a la determinación de la viscosidad aparente de las mieles siendo capaz de detectar desde un 10 % P/P de nivel de adulteración de miel con JMAF (1993).

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 enzima es capaz de detectar adulteraciones del 20 % P/P, lo que representa la detección de aproximada de 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. Estos resultados no pueden ser tomados como concluyentes, pero es 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.

5. CONCLUSIONES

La temperatura óptima para la actividad de la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* fue de 40 °C, por encima de esta temperatura la actividad de la enzima disminuye y puede explicarse por el cambio irreversible de la estructura de la proteína evidenciado por el incremento de λ_{max} a temperaturas superiores a los 40 °C. Por otra parte, La temperatura optima de la enzima presente en la miel también fue de 40 °C y en base a la homología que presenta con la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. Proponemos que la enzima en la miel sufre cambios similares en su estructura ante la exposición a temperaturas mayores a 40°C.

Se ensayaron tratamientos térmicos que simulan los que experimentaría la miel en un proceso de extracción (precalentamiento a 50 °C por 30 min; pasteurización y enfriado) y se determinó el NI. Todas las mieles tratadas térmicamente experimentaron una disminución del NI respecto al control (miel sin tratamiento térmico). Los tratamientos que llevaron a una disminución del NI por debajo de 10 (mínimo recomendado internacionalmente), fueron aquellos a 60 °C por más de 15 min y a 70 °C por más de 10 min. El promedio de la reducción de la actividad α -glucosidasa fue del 33 % para las mieles que recibieron un tratamiento a 60 °C por 20 min y un 37 % para las mieles que recibieron un tratamientos a 70 °C por 15 y 20 min.

En función de los resultados de este trabajo, se recomienda que en los procesos de “pasteurización” convencionales se establezcan protocolos estandarizados teniendo en cuenta: valores iniciales de NI, el volumen de miel, forma de homogeneización (o mezclado), la temperatura y tiempo de exposición durante los tratamientos térmicos para evitar sobrecalentamientos, recomendando el uso de temperaturas no mayores a los 60 °C por más de 15 min. Así mismo, para los sistemas de “pasteurización” a alta temperatura-corto tiempo, se recomienda la implementación de protocolos estandarizados teniendo en cuenta: los valores iniciales de NI, temperatura y velocidad de “pasteurización” recomendando no superar los 70 °C por más de 10 min. En ambos casos, para la definición de un protocolo, es conveniente tomar muestras antes y después de los tratamientos y

confirmar, mediante determinación de NI, que el proceso no provoca disminución de la actividad enzimática por debajo de los 10 NI. Para los casos de mieles de baja actividad enzimática natural, el valor recomendado de NI no debe ser inferior a 4 (Bogdanov S., *et al.*, 1999), pero este no sería el caso de mieles del Noroeste de Córdoba.

Finalmente, la actividad α -glucosidasa de la miel permitió distinguir la adulteración de la miel a partir del 20 % P/P de jarabe.

6. PROYECCIONES FUTURAS

En virtud del trabajo realizado, y comprendiendo que aún hay aspectos a desarrollar con mayor profundidad, se plantean los siguientes temas a abordar en trabajos futuros:

- Actividad α -glucosidasa característica de las mieles de la región: incrementar el número de muestras a analizar a fin de lograr información representativa de las mieles de la región.
- Actividad α -glucosidasa como indicador de la adulteración de miel por el agregado de azúcares invertidos: ensayar otros adulterantes, combinaciones de diversos adulterantes y concentraciones de estos.
- Efecto de la temperatura en la cinética y estructura de la α -glucosidasa de la miel: purificar la enzima de la miel y comparar la actividad a distintas temperaturas de la enzima purificada con la actividad de la enzima en la miel. Determinar la fluorescencia intrínseca a diversas temperaturas de calentamiento y enfriamiento de la enzima purificada de la miel para comprobar la recuperación o no de la actividad enzimática.
- Composición de flavonoides en las mieles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E-S.M., Ziena, H.M., & Youssef, M.M. (1993). Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: Detection by different methods. *Food Chemistry*, 209-212.
- Adnan, N., Chua, L., & Sarmidi, M. (2014). Thermal treatment effect on free amino acids in honey samples. *Jurnal Teknologi*, 69(4), 29-33.
- Baglio, E. (2018). Chemistry and technology of honey production. En *Springer Briefs in Molecular Science: Chemistry of foods*. Springer.
- Balzarini, M., Di Rienzo, J., Tablada, M., Gonzalez, L., Bruno, C., Córdoba, M., . . . Casanoves, F. (2012). *Estadística y Biometría. Ilustraciones del uso de InfoStat en problemas de agronomía*. Córdoba, Argentina: Brujas.
- Baroni M.V., Arrua C., Nores M.L., Fayé P., Díaz M., Chiabrando G., & Wunderlin D. (2009). Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, 114, 727-733.
- Bio-Rad Protein Assay*. (s.f.). Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>
- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., & Gallmann P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 677-689.
- Bogdanov S., Lüllmann C., Martin P., von der Ohe W., Russmann H., Vorwohl G., . . . Vit P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee World*, 80(2), 61-69. doi:10.1080/0005772X.1999.11099428
- Bogdanov, E., & Martin, P. (2002). Honey authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93.
- Bogdanov, S., Martin, P., & Lüllman, C. (1997). Harmonised method of the European Honey Commission. *Apidologie (extra issue)*, 59.
- CAA. (1985). Res. 2256, 16.12.85 .
- CAA. (1995). Res. GMC N° 015/94 Reglamento Técnico MERCOSUR de identidad y calidad de miel.
- Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1233-1239. doi:10.1271/bbb.61.1233
- Chua, L. S., Adnan, N. A., Abdul-Rahaman, N. L., & Sarmidi, M. R. (2014). Effect of thermal treatment on the biochemical composition of tropical honey samples. *International Food Research Journal*, 2(21), 773-778.
- Codex Alimentarius . (2019). CXS 12-1981 enmienda 2019. Obtenido de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/es/>

- Costa, M. C., Loyola, M. J., Oses, V. R., & Kivatinitz, S. (2016). Marcadores polínicos en mieles del noroeste de la provincia de Córdoba, Argentina. *Darwiniana*, 4(2), 277-290.
- da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L., Oliveira Costa, A., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- Deutscher Imkerbund E.V. (consultado 2020). *Echter Deutscher Honig*. Obtenido de https://deutscherimkerbund.de/229-Echter_Deutscher_Honig_Qualitaetsrichtlinien
- Dimins, F., Kuka, P., Kuka, M., & Cakste, I. (2006). The criteria of honey quality and its changes during storage and thermal treatment. *LLU Raksti*, 16(311), 73-78.
- Dustmann, J.H., van Praagh, J.P., & Bote, K. (1985). Zur bestimmung von diastase, invertase und HMF in Honing. *Apidologie*, 16(1), 19-30.
- Escrache, I., Visquert, M., Carot, J., Doménech, E., & Fito, P. (2008). Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior tu pasteurization. *Food Sci Tech Int*, 14(5), 29-35. doi:10.1177/1082013208094580
- Escrache, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., & Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112, 329-338.
- Fattori, S.B., de Gandía, S.R., & Laferriere, M.E. (s.f.). *Investigación de dextrinas ajenas a la miel*. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica-Instituto Nacional de Alimentos, Buenos Aires. Obtenido de Apiservices: <https://www.apiservices.biz/es/articulos/por-fecha-arriba-en-linea/1151-investigacion-de-dextrinas-ajenas-a-la-miel>
- Fennema, O. (2010). *Fennema: química de los alimentos* (3a ed.). Acribia.
- García Girou, N. (2003). *Contaminación de la miel con alimentos artificiales*. Buenos Aires: SAGPyA.
- García, N. (2016). Análisis de las posibles causas de la baja del precio internacional de la miel. *American Bee Journal*, 882-887.
- Gurini, L., Apablaza, O., Ciappini, M., Fagúndez, G., Gaggiotti, M., Salgado, C., & Winter, J. (2019). *Guía para la caracterización de mieles argentinas*. Buenos Aires: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Gutierrez, A., Elizondo, A., Roa, R., Toyé, L., Bilbao, L., & Ladrón Montebello, F. (2011). Comparación entre indicadores de deterioro térmico a las temperaturas de procesamiento de mieles. *Apimondia*. Argentina.
- Hadorn H., Zürcher K., & Doevelaar F.H. (1962). Über Wärme und Lagerschädigungen von Bienenhoning. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters*(66), 191-229.

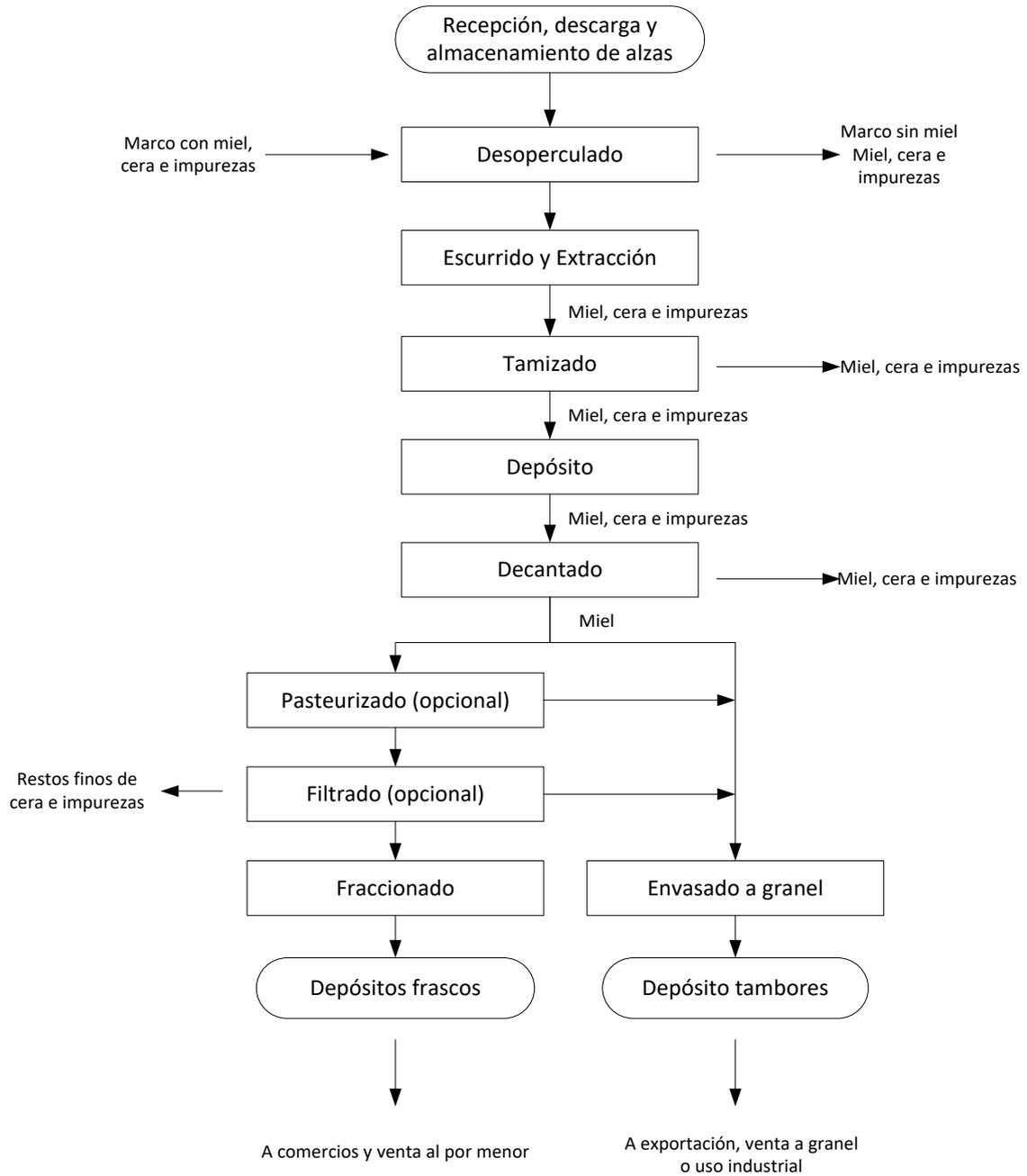
- Harmonised Methods of the International Honey Commission. (2009). *www.ihc-platforma.net*.
Obtenido de <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.*(316), 695-696.
- 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
- lio, M., Yoshioka, A., Imayoshi, Y., Koriyama, C., & Moriyama, A. (1984). Effect of flavonoids on α -glucosidase and β -fructosidase from yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 48(6), 1559-1563.
- INTI. (2009). *Programa: Pruebas de desempeño de productos. Informe de análisis de miel*. Buenos Aires: INTI.
- Karabournioti, S., & Zervalaki, P. (2001). The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta*, 4, 177-181.
- Kolthoff, I. M., Sandell E. B., Meehan E. J., & Stanley Bruckenstein. (1979). *Análisis químico cuantitativo* (5° ed.). Buenos Aires: Nigar S.R.L.
- Kubota M., Tsujil M., Nishimoto M., Wongchawalit J., Okuyama M., Mori H., . . . Chiba S. (2004). Localization of α -Glucosidases I, II, and III in organs of european honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of α -Glucosidase in Honey. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(11), 2346-2352.
- Lakowicz, J. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3° ed.). Springer science & business media.
- Lichtenberg-Kraag, B. (2012). Saccharose degradation over time in stored honey: influence of time, temperature, enzyme activity and botanical origin. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51(4), 217-224.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, D490-D495. doi:10.1093/nar/gkt1178
- Low N., Va Vong K., & Sporns P. (1986). A new enzyme, β -Glucosidase, in honey. *Journal of Apicultural Research*, 25(3), 178-181. doi:10.1080/00218839.1986.11100713
- Marini, V. (s.f.). *Manual de buenas prácticas apícolas con manejo orgánico*. Obtenido de Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca: https://magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_alimentos_y_bebidas/_pdf/Manual%20de%20Buena%20Practicas%20Apicolas%20con%20Manejo%20Organico.pdf

- Mehryar, L., & Esmaili, M. (2011). Honey & honey adulteration detection: a review. *Proceedings of 11th International Congress on Engineering and Food*.
- Miller, J.C., & Miller, J.N. (1993). *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamerican, S.A.
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2019). Obtenido de https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio_rural/boletin/07_apicultura.php
- Molino, F., Lázaro, R., Pérez, C., Bayarri, S., Corredera, L., & Herrera, A. (2011). Effect of pasteurization and storage on tetracycline levels in honey. *Apidologie*(42), 391-400. doi:10.1007/s13592-011-0015-y
- Nilsen, S. S. (2003). *Análisis de los alimentos*. Saragoza, España: Acribia S.A.
- 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.
- Oficina Internacional de Pesas y Medidas. (2008). *El Sistema Internacional de Unidades (SI)*. 2° en español.
- Orantes-Bermejo, F., & Torre Fernandez-Piñar, C. (2009). Evolution of invertase activity in honey from *Castanea sativa* and *Rosmarinus officinalis* collected in Granada. *Ars Pharm*, 50(3), 124-128.
- Patrignani, M., & Lupano, C. (2016). Actividad antioxidante de mieles argentinas de la provincia de Buenos Aires y la región Andino Patagónica. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Córdoba.
- Pontoh, J. (2001). Isolation, purification and characterization of glucosidases from three honey bee species (*Apis mellifera*, *A. cerana* and *A. dorsata*). *Tesis doctoral*. Department of Applied Microbiology and Food Science-University of Saskatchewan Saskatoon, Canada.
- RENAPA. (2019). Obtenido de Alimentos Argentinos: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apiicultura/renapa.php>
- SAGPyA-SENASA. (2006). Res. N° 870/2006 .
- Santos, J. (2009). *Proteínas. Estructuras fascinantes*. Buenos Aires.
- SENASA. (2003). *Resolución 186/03*. Obtenido de <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-1862003#:~:text=Apru%C3%A9banse%20los%20sistemas%20de%20control,destino%20a%20embarque%20para%20exportaci%C3%B3n>.

- SENSASA. (1998). *Resolución 121/1998*. Obtenido de <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-121-1998-senasa-servicio-nacional-de-salud-y-calidad-agroalimentaria>
- Siegenthaler, U. (1977). Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase (Saccharase) im Honig. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters.*, 68, 251-258.
- Sramek, M., Woerz, B., Horn, H., Weiss, J., & Kohlus, R. (2016). Inactivation kinetics of invertase in honey and honey-glucose formulations: effects of temperature and water activity. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1178-1184. doi:10.1002/jsfa.7846
- Subramanian R., Umesh Hebbar H., & Rastogi N.K. (2007). Processing of honey: a review. *International Journal of Food Properties*(10), 127-143.
- Tabata, S., Ide, T., Umemura, Y., & Torii, K. (1984). Purification and characterization of α -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797, 231-238.
- Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., & Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. (Elsevier, Ed.) *Food Chemistry*, 71-74.
- Tosi, E., Ré, E., Lucero, H., & Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. (Elsevier, Ed.) *Lebensm Wiss u Technol*(37), 669-678.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E., & Sedat Velioglu, Y. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. (Elsevier, Ed.) *Food Chemistry*(95), 653-657.
- Valega, O. (2005). Todo sobre la miel. Argentina.
- von Der Ohe, W., von Der Ohe, K., Raude Roberg, L., & Dustmann, J. H. (1999). Comparison of methods of determination of Saccharase activity in honey. *Apidologie*, 30(5).
- Vorlová L., & Pridal A. (2002). Invertase and diastase activity in honeys of Czech provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculture Mendelianae Bryebsusu*, N° 5, págs. 57-66.
- White J. W. (1979). La miel. En D. e. hijos, *La colmena y la abeja melífera* (págs. 636-681). Montevideo: Hemisferio Sur.
- White, J., Maher, J., & Maher, J. (1953). Transglucosidation by honey invertase. *Arch Biochem Biophys*, 42 (2), 360-7. doi:10.1016 / 0003-9861 (53) 90365-8
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., & Tabata, S. (2004). Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*, 271, 3414-3420. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04276.x

APÉNDICES

Apéndice 1: Diagrama de flujo de procesamiento y fraccionamiento de miel



Apéndice 2: Pasterurizador M3 marca Farli



Especificaciones

- En Acero Inoxidable AISI 304.
- Termostato digital para control de temperatura de trabajo.
- Termostato digital para el control de la temperatura de enfriamiento.
- Controlador de presión de filtrado digital.
- Bomba a paletas controlada por variador de velocidad electrónico.
- Calentamiento en intercambiador de calor eléctrico.
- Enfriado por intercambiador de calor a agua.
- Dos filtros en línea, uno de malla plisada de 80 micrones y el segundo de 5 micrones en tela no tejida de fibra poliéster.
- Alimentación eléctrica AC 220/380v 50/60Hz.
- Gabinete en Acero Inoxidable.

Nota: La imagen y las especificaciones fueron extraídas de la página Web del fabricante (<https://farli.com/>).

Apéndice 3: Tabla comparativa de requisitos mínimos establecidos para miles según el CAA, la Resolución GMC N° 015/94, CODEX STAN 12:1981 e IHC

PARÁMETRO	CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO Capítulo X	RESOLUCIÓN GMC N° 015/94 Incorporada por Resolución MSyAS N° 003, 11.01.95	CODEX ALIMENTARIUS CODEX STAN 12-1981
Humedad por refractometría	Máximo 18 g/100 g	Máximo 20 g/100 g	Máximo 20 g/100 g
Cenizas	A 550-600 °C Miel de flores: máx. 0,6 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 1,0 g/100 g	A 550-600 °C Miel de flores: máx. 0,6 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 1,0 g/100 g	No específica
Azúcares reductores	Calculados como azúcar invertido Miel de flores: mín. 65 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de flores: mín. 60 g/100 g	Calculados como azúcar invertido Miel de flores: mín. 65 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de flores: mín. 60 g/100 g	Calculados como la suma de glucosa y fructosa Miel de flores: mín. 60 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de flores: mín. 45 g/100 g
Sacarosa aparente	Miel de flores: máx. 8 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 10 g/100 g	Miel de flores: máx. 5 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 10 g/100 g	Miel de flores: máx. 5 g/100 g Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máx. 10 g/100 g
Acidez libre	Máximo 40 meq/kg	Máximo 40 meq/kg	Máximo 50 meq/kg
Actividad de la diastasa	Mínimo 8 unidades en la escala de Gothe Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Gothe (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)	Mínimo 8 unidades en la escala de Gothe Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Gothe (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)	Mínimo 8 unidades en la escala de Schade Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Schade (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)
Hidroximetilfurfural (HMF)	Máximo 40 mg/kg	Máximo 40 mg/kg	Máximo 40 mg/kg
Dextrinas totales	Miel de flores: máx. 3 g/100 g	No específica	No específica
Conductividad eléctrica	No específica	No específica	Miel de flores: máx. 0,8 mS/cm Miel de mielada: mín. 0,8 mS/cm
Sólidos insolubles en agua	Máximo 0,1 g/100 g Miel prensada máx. hasta 0,5 g/100 g	Máximo 0,1 g/100 g Miel prensada máx. hasta 0,5 g/100 g	Máximo 0,1 g/100 g Miel prensada máx. hasta 0,5 g/100 g

Apéndice 4: Efecto en la actividad enzimática de los tratamientos térmicos aplicados en cada miel (M1, M2, M3 y M4)

A continuación, se detalla el efecto en la actividad enzimática de los tratamientos aplicados en cada miel. Las medias muestrales de NI del control y todas las medias de NI de las mieles con tratamiento fueron graficadas y se confeccionaron tablas en orden decreciente de NI en función de los resultados experimentales.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se realizó un Análisis de Varianza con un diseño completamente aleatorio y test LSD Fisher (Balzarini, y otros, 2012).

Miel: M1

En la **Figura 22** se puede observar que la muestra control, con una media de NI 13,8, fue la muestra con mayor actividad α -glucosidasa y las muestras sometidas a tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) tuvieron un valor medio de NI inferior respecto al control y esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Tanto en las muestras tratadas a 60 °C como las tratadas a 70 °C se observó un descenso de la actividad enzimática cuanto mayor fue el tiempo de calentamiento. Las diferencias entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 min y 10 min, y 60 °C a 15 min y 20 min fueron estadísticamente significativas. No hubo diferencias significativas entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 min y 10 min. Las diferencias entre las medias de NI de las muestras tratadas a 70 °C por 1 min 30 s y 3 min no fueron estadísticamente significativos entre ellas. De igual modo las medias de NI de las muestras tratadas a 70 °C por 5 min y 10 min tampoco fueron estadísticamente significativos entre ellas. Finalmente, no hubo diferencias significativas de las medias de NI de las muestras tratadas a 70 °C por 15 min y 20 min. Esto se puede observar más claramente en la **Tabla 18**. Podemos decir que, los tratamientos a 60 °C por 20 min, 70 °C por 15 min y 70 °C por 20 min, con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min en la miel M1, implicaron una reducción de la actividad enzimática por debajo del valor recomendado internacionalmente (mínimo 10 NI) (Bogdanov S., *et al.*, 1999) con una disminución de la actividad en un 32,4 %, 52,1 % y 50,7 % respectivamente.

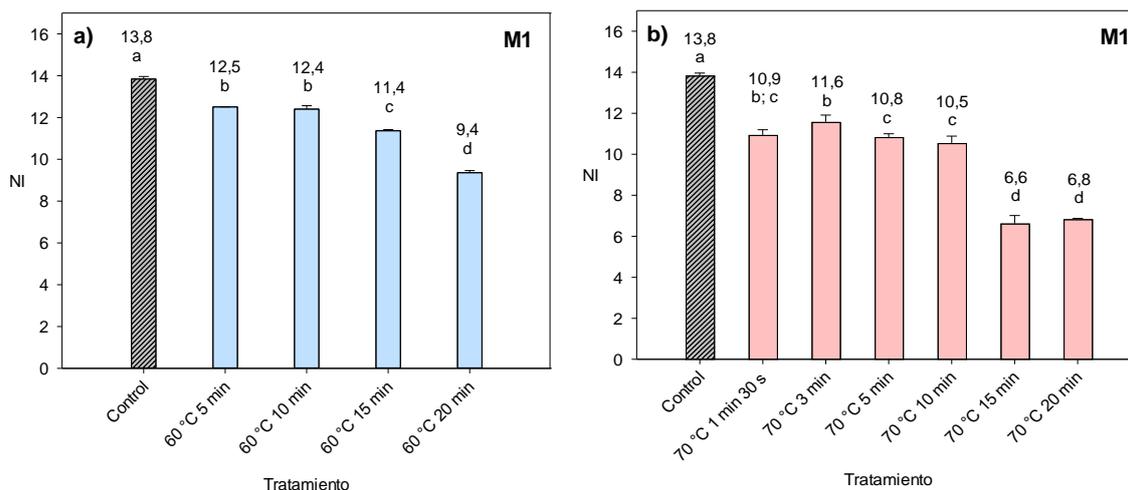


Figura 22: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M1. a) Tratamientos a 60 °C. Análisis de varianza ($R^2=0,98$ y $CV=1,91$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. b) Tratamiento a 70 °C ($R^2=0,98$ y $CV=3,81$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabla 18: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M1.

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M1	Control	(sin tratamiento)	13,8	0,2	a	0,0
M1	60 °C	5 min	12,5	0,2	b	9,4
M1	60 °C	10 min	12,4	0,1	b	10,1
M1	60 °C	15 min	11,4	0,1	c	17,6
M1	60 °C	20 min	9,4	0,1	d	32,2

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M1	Control	(sin tratamiento)	13,8	0,2	a	0,0
M1	70 °C	3 min	11,6	0,2	b	16,3
M1	70 °C	1 min 30 s	10,9	0,2	b; c	21,0
M1	70 °C	5 min	10,8	0,2	c	21,7
M1	70 °C	10 min	10,5	0,2	c	23,8
M1	70 °C	20 min	6,8	0,3	d	50,7
M1	70 °C	15 min	6,6	0,3	d	52,1

Nota: Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Miel: M2

En la **Figura 23** se puede observar que la muestra control (sin ningún tratamiento), con una media de NI 11,6, fue la muestra con mayor actividad α -glucosidasa y las muestras

sometidas a tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio tuvieron un valor medio de NI inferior respecto al control y esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Tanto en las muestras tratadas a 60 °C como en las tratadas a 70 °C se observó un descenso de la actividad enzimática cuanto mayor fue el tiempo de calentamiento. Las diferencias entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 min, 10 min y 15 min no fueron estadísticamente significativas, sin embargo, existieron diferencias significativas entre estas medias de NI y la media de NI de la muestra tratada a 60 °C por 20 min. Las diferencias de las medias de NI de las muestras tratadas a 70 °C fueron estadísticamente significativas con excepción de las tratadas a 70 °C por 15 min y 20 min. Podemos decir que, los tratamientos a 60 °C por 5, 10, 15 y 20 min; y los tratamientos a 70°C por 1 min 30 s, 3, 5, 10, 15 y 20 min, con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min en la miel M2, implicaron una reducción del NI por debajo del valor recomendado internacionalmente (mínimo 10 NI) (Bogdanov S., *et al.*, 1999). La máxima disminución de la actividad fue del 36,2 % para el tratamiento térmico de 60 °C por 20 min, y 39,8 % y 40,1 % para los tratamientos térmicos a 70 °C por 15 y 20 min respectivamente. Esto se puede ver más claramente en la **Tabla 19**.

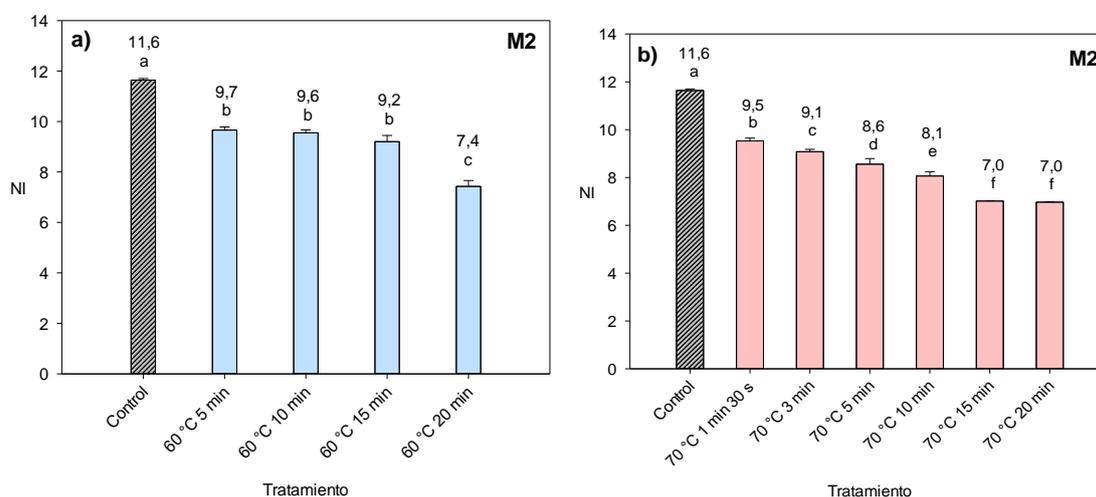


Figura 23: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M2. a) Tratamientos a 60 °C. Análisis de varianza ($R^2=0,97$ y $CV=2,72$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. b) Tratamiento a 70 °C ($R^2=0,98$ y $CV=3,81$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p\leq 0,05$).

Tabla 19: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M2.

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M2	Control	(sin tratamiento)	11,6	0,2	a	0,0
M2	60 °C	5 min	9,7	0,2	b	17,0
M2	60 °C	10 min	9,6	0,2	b	18,0
M2	60 °C	15 min	9,2	0,2	b	21,0
M2	60 °C	20 min	7,4	0,2	c	36,2

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M2	Control	(sin tratamiento)	11,6	0,1	a	0,0
M2	70 °C	1 min 30 s	9,5	0,1	b	18,1
M2	70 °C	3 min	9,1	0,1	c	22,0
M2	70 °C	5 min	8,6	0,1	d	26,5
M2	70 °C	10 min	8,1	0,1	e	30,8
M2	70 °C	15 min	7,0	0,2	f	39,8
M2	70 °C	20 min	7,0	0,2	f	40,1

Nota: Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Miel: M3

En la **Figura 24** se puede observar que la muestra control (sin ningún tratamiento), con una media de NI 15,9, fue la muestra con mayor actividad α -glucosidasa y las muestras sometidas a tratamientos térmicos (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio produjeron una reducción estadísticamente significativa del NI respecto al control.

Tanto en las muestras tratadas a 60 °C como en las tratadas a 70 °C se observó un descenso de la actividad enzimática cuanto mayor fue el tiempo de calentamiento. Las diferencias entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 min y 10 min no fue estadísticamente significativas, de igual modo ocurrió con las muestras tratadas a 60°C por 10 y 15 min. Si hubo diferencia significativa en las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 20 min y estos dos grupos. Para las muestras tratadas a 70 °C no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de NI a 1 min 30 s, 3, 5 y 10 min. Tampoco hubo diferencias significativas entre las medias de NI de las muestras tratadas a 70 °C por 15 min y 20 min pero sí entre estos dos grupos. Podemos decir que, los tratamientos a 60 °C por 20 min, con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min, implicó una reducción por debajo del valor recomendado internacionalmente (mínimo 10 NI)

(Bogdanov S., *et al.*, 1999), con una disminución del 40,1 % de la actividad. Esto no ocurrió para los tratamientos a 70 °C. Esto puede verse más claramente en la

Tabla 20.

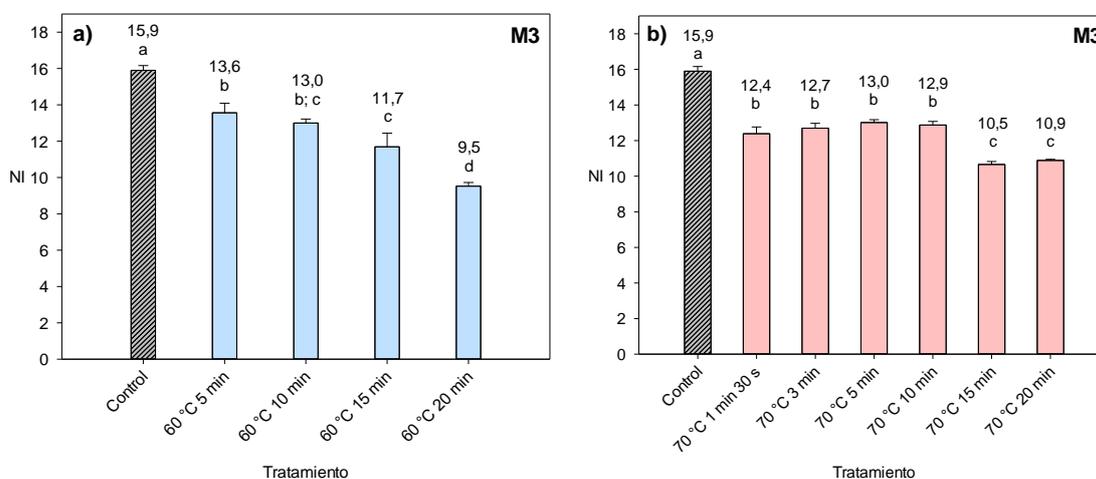


Figura 24: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M3. a) Tratamientos a 60 °C. Análisis de varianza ($R^2=0,93$ y $CV=5,65$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. b) Tratamiento a 70 °C ($R^2=0,96$ y $CV=3,42$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabla 20: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M3.

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M3	Control	(sin tratamiento)	15,9	0,4	a	0,0
M3	60 °C	5 min	13,6	0,5	b	14,7
M3	60 °C	10 min	13,0	0,4	b; c	18,2
M3	60 °C	15 min	11,7	0,4	c	26,5
M3	60 °C	20 min	9,5	0,4	d	40,1

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M3	Control	(sin tratamiento)	15,9	0,2	a	0,0
M3	70 °C	5 min	13,0	0,3	b	18,2
M3	70 °C	10 min	12,9	0,3	b	19,1
M3	70 °C	3 min	12,7	0,3	b	20,1
M3	70 °C	1 min 30 s	12,4	0,3	b	22,1
M3	70 °C	20 min	10,9	0,3	c	31,5
M3	70 °C	15 min	10,5	0,3	c	34,2

Nota: Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Miel: M4

En la **Figura 25** se puede observar que la muestra control (sin ningún tratamiento) con una media de NI 12,1, fue la muestra con mayor actividad α -glucosidasa y cualquier tratamiento térmico aplicado (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio produjeron una reducción estadísticamente significativa del NI respecto al control.

Tanto en las muestras tratadas a 60 °C como en las tratadas a 70 °C se observó un descenso de la actividad enzimática cuanto mayor fue el tiempo de calentamiento. Las diferencias entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 y 10 min fueron estadísticamente significativas. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 15 y 20 min, pero sí entre este grupo y las medias de NI de las muestras tratadas a 60 °C por 5 y 10 min. Las medias de NI para las muestras tratadas a 70 °C no mostraron diferencias significativas claras por lo que no se pueden tener conclusiones en base a los datos estadísticos. Podemos decir que, el tratamiento a 60 °C por 15 y 20 min, con un calentamiento previo a 50 °C por 30 min, implicó una reducción por debajo del valor recomendado internacionalmente (mínimo 10 NI) (Bogdanov S., *et al.*, 1999), con una disminución del 21.9 % de la actividad. Esto puede verse más claramente en la **Tabla 21**.

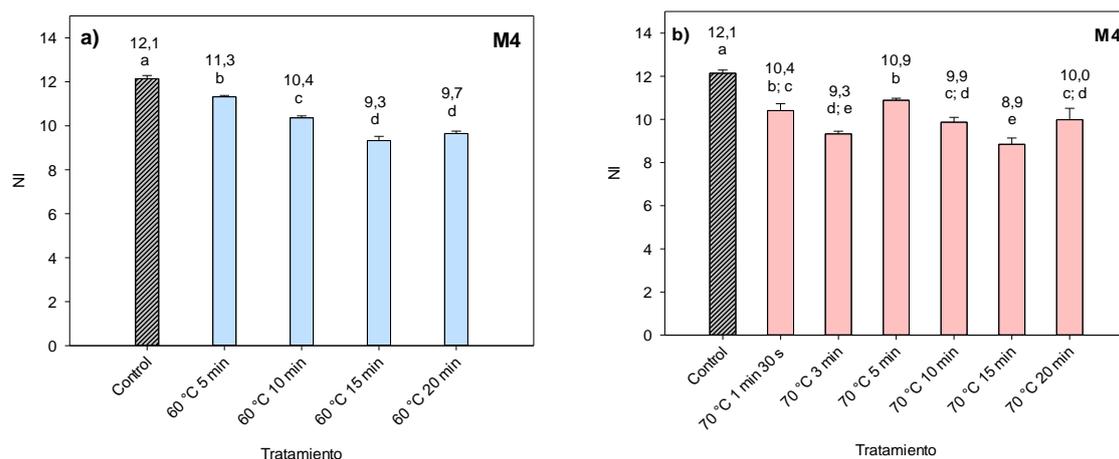


Figura 25: Gráfico de barra de NI para la muestra control y muestras con tratamiento térmico (combinación de temperatura y tiempo) simulados en laboratorio para la miel M4. a) Tratamientos a 60 °C. Análisis de varianza ($R^2=0,96$ y $CV=2,67$) y test “a posteriori” LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. b) Tratamiento a 70 °C ($R^2=0,92$ y $CV=3,80$) y test “a

posteriori" LSD de Fisher aplicado a los datos experimentales. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabla 21: NI de muestra control y porcentaje de disminución de NI respecto al control de muestras con tratamientos térmicos para la miel M4.

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M4	Control	(sin tratamiento)	12,1	0,1	a	0,0
M4	60 °C	5 min	11,3	0,2	b	6,8
M4	60 °C	10 min	10,4	0,2	c	14,7
M4	60 °C	15 min	9,7	0,2	d	20,5
M4	60 °C	20 min	9,3	0,2	d	23,2

Miel	Tratamiento		Media NI	EE	Significancia ($p \leq 0,05$)	Disminución de actividad (%)
	Temperatura	Tiempo				
M4	Control	(sin tratamiento)	12,1	0,2	a	0,0
M4	70 °C	5 min	10,9	0,2	b	10,3
M4	70 °C	1 min 30 s	10,4	0,2	b; c	14,3
M4	70 °C	20 min	10,0	0,3	c; d	17,7
M4	70 °C	10 min	9,9	0,2	c; d	18,7
M4	70 °C	3 min	9,3	0,2	d; e	23,1
M4	70 °C	15 min	8,9	0,3	e	27,1

Nota: Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Apéndice 5: Efecto de la adulteración con jarabe mezcla en la actividad α -glucosidasa en cada miel (M1, M2, M3 y M4)

En este apéndice se detalla el efecto de la adulteración en la actividad α -glucosidasa en cada miel. La actividad fue expresada como actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).

Miel M1

La mayor actividad enzimática se produjo a 40 °C, confirmando que esta también es la temperatura de mayor actividad de la α -glucosidasa como ya se vio con la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (punto 4.2.2). Por otro lado, la actividad decreció abruptamente a 50 °C y 60 °C donde la enzima comienza a desnaturalizarse como se vio con la enzima purificada (punto 4.2.2 y 4.2.3). La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada al 10 % P/P de jarabe y la misma dilución con agua destilada, no mostró diferencias estadísticamente significativas de las medias a 30, 40 y 50 °C. La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada al 20 % P/P con agua destilada, no mostró diferencias significativas de las medias, comportándose según lo esperado. Mientras que hubo diferencias significativas entre las medias de la muestra control y la mezcla con 20 % P/P de jarabe a 40 °C y a 50 °C. Si bien en ambas experiencias, se observaron diferencias significativas entre el control y las mezclas a 60 °C, no queda claro este comportamiento ya que solo se presentó en la miel M1, pudiendo deberse a problemas del método. Los resultados fueron graficados y se muestran en la **Figura 26**.

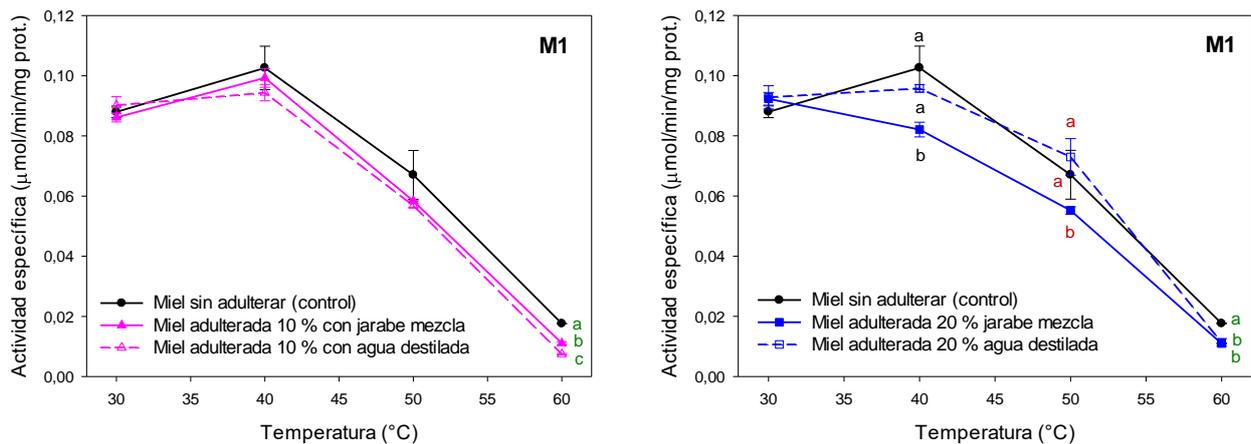


Figura 26: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M1 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P= 0,050$).

Miel M2

La mayor actividad enzimática se produjo a 40 °C, confirmando que esta también es la temperatura de mayor actividad de la α -glucosidasa como ya se vio con la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (punto 4.2.2). Por otro lado, la actividad decreció abruptamente a 50 °C y 60 °C donde la enzima comienza a desnaturalizarse como se vio con la enzima purificada (punto 4.2.2 y 4.2.3). La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 10 % P/P de jarabe y la miel rebajada con 10 % P/P de agua destilada, no mostraron diferencias estadísticamente significativas de las medias a 30, 40 y 60 °C. Se observó diferencias significativas en las medias entre el control y las mezclas a 50 °C en ambos casos. La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 20 % P/P de agua destilada, solo mostró diferencias significativas de las medias a los 50 °C. Mientras que hubo diferencias significativas entre las medias de la muestra control y la mezcla con 20 % P/P de jarabe a 30 °C y a 50 °C. Los resultados fueron graficados y se muestran en la **Figura 27**.

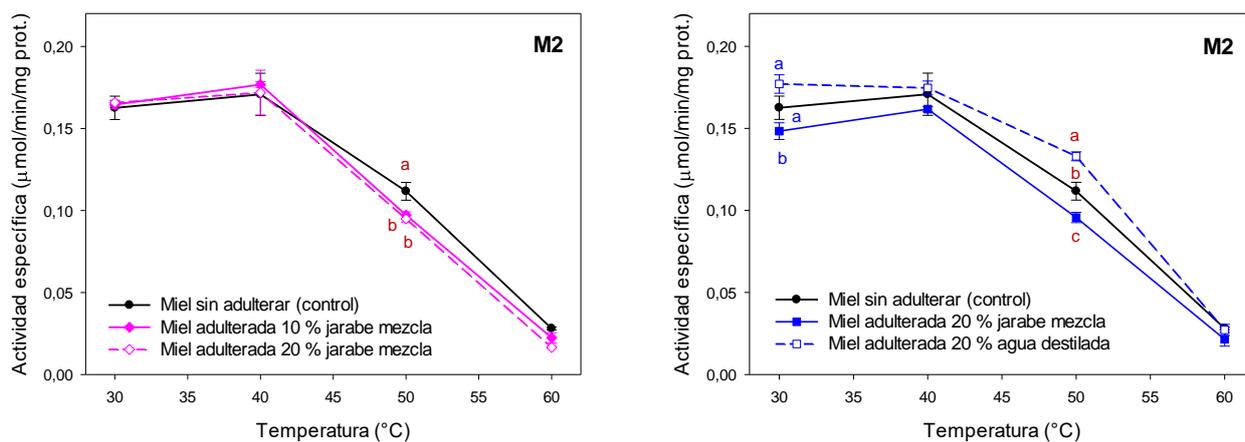


Figura 27: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M2 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P=0,050$).

Miel M3

La mayor actividad enzimática se produjo a 40 °C, confirmando que esta también es la temperatura de mayor actividad de la α -glucosidasa como ya se vio con la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (punto 4.2.2). Por otro lado, la actividad decreció abruptamente a 50 °C y 60 °C donde la enzima comienza a desnaturalizarse como se vio con la enzima purificada (punto 4.2.2 y 4.2.3). La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 10 % P/P de jarabe y miel rebajada con 10 % P/P de agua destilada, no mostró diferencias estadísticamente significativas de la media a 30, 40, 50 y 60 °C. La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 20 % P/P de agua destilada, no mostró diferencias estadísticamente significativas de la media a 30, 40, 50 y 60 °C, comportándose según lo esperado. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre las medias de la muestra control y la mezcla con 20 % P/P de jarabe a 30, 40 y 50 °C, y entre las medias de la mezcla con 20 % P/P de agua destilada y con la mezcla con 20 % P/P de jarabe a las mismas temperaturas. Los resultados fueron graficados y se muestran en la **Figura 28**.

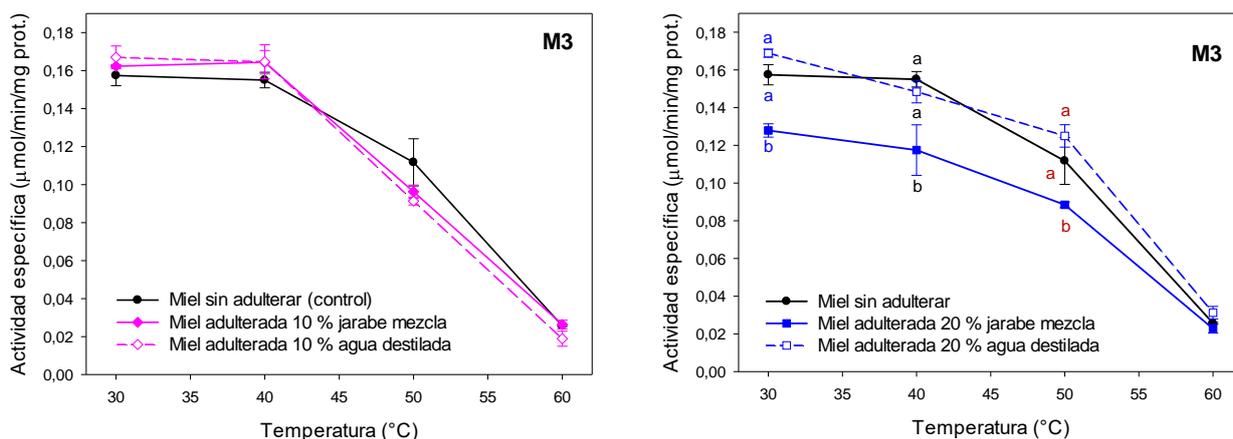


Figura 28: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M3 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P, y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P=0,050$).

Miel M4

La mayor actividad enzimática se produjo a 40 °C, confirmando que esta también es la temperatura de mayor actividad de la α -glucosidasa como ya se vio con la enzima purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (punto 4.2.2). Por otro lado, la actividad decreció abruptamente a 50 °C y 60 °C donde la enzima comienza a desnaturalizarse como se vio con la enzima purificada (punto 4.2.2 y 4.2.3). La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 10 % P/P de agua, no mostró diferencias estadísticamente significativas de las medias a 30, 40, 50 y 60 °C comportándose según lo esperado. Se observó a 30 °C diferencias significativas de las medias entre la muestra control y la mezcla con 10 % P/P de jarabe. La comparación de la actividad específica de la muestra control y la miel rebajada con 20 % P/P de agua, no mostró diferencias estadísticamente significativas de las medias a 30, 40, 50 y 60 °C, comportándose según lo esperado. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre las medias de la muestra control y la mezcla con 20 % P/P de jarabe a 30, 40 y 50 °C, y entre las medias de la mezcla con 20 % P/P de agua destilada y con 20 % P/P de jarabe a las mismas temperaturas. Los resultados fueron graficados y se muestran en la **Figura 29**.

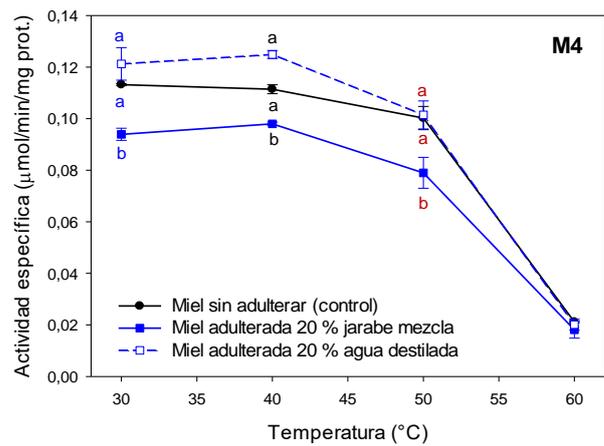
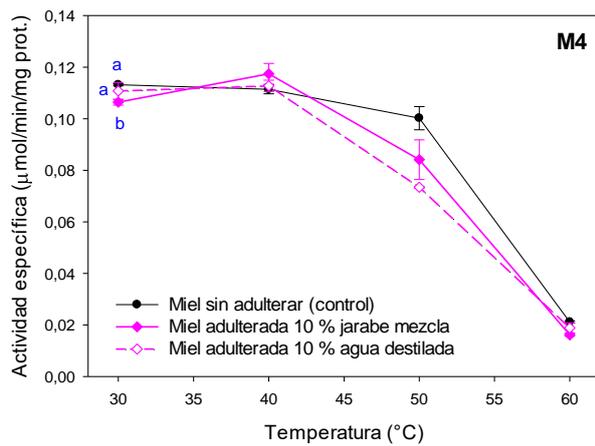


Figura 29: Gráfica de la actividad específica de α -glucosidasa de la miel M4 a distintas temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) para concentraciones de miel y jarabe mezcla de 10 % P/P y 20 % P/P, de miel y agua destilada de 10 % P/P y 20 % P/P y muestra control. Letras diferente y del mismo color corresponden a las medias de actividad específica que mostraron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el test de Student ($P= 0,050$).

Apéndice 6: Certificado de análisis del Jarabe Mezcla marca SucroDEX, de QUIMINSA

CERTIFICADO DE ANÁLISIS / PROTOCOLO DE CALIDAD	
SUCRODEX <i>(Jarabe Mezcla)</i>	
Análisis físico químico	
Sólido [% p/p]	77.3 – 78.3
SO ₂ [ppm]	≤ 30
pH (Solución 50 % p/p)	3.8 – 4.8
Dextrosa Equivalente [%]	75 - 82
Viscosidad a 40 °C [cP]	300 - 600 (Brookfield LVT, Spindle N°2)
Color (Solución %)	≤ 1.5
Distribución de azúcares [B.S.]	
Levulosa [%]	36 - 40
Dextrosa [%]	30 - 34
Maltosa [%]4 – 8
Maltotriosa + Azúcares Superiores [%]	Suma
Análisis Microbiológico	
Recuento total [ufc/g]	< 200
Levaduras [ufc/g]	< 50
Hongos [ufc/g]	< 10
Coliformes [ufc/g]	< 10

 QUIMINSA Químicas Industriales S.A.	Casa Matriz: Av. Maza 4019, Gutierrez, Malpá, Mendoza, Argentina (0261) 4930888 / 4930932 info@quiminsa.net	Sucursal San Martín +54 9 263 4543394 sanmartin@quiminsa.net	Sucursal San Rafael Av. Alberdi 3145 San Rafael, Mendoza, Argentina (0260) 4442772 quiminsasanrafael@gmail.com sanrafael@quiminsa.net	Sucursal San Juan Av. Benavidez 1050 (E) Chimbas, San Juan, Argentina (0264) 4310262 sanjuan@quiminsa.net
---	--	---	---	--

Apéndice 7: Presentación del trabajo en el VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina



**VII Congreso Internacional
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
de los ALIMENTOS 2018**
1 al 3 de octubre | Córdoba, Argentina

CFI CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES

Ministerio de CIENCIA Y TECNOLOGÍA

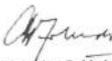
CABINETE PRODUCTIVO Córdoba

GOBIERNO DE CORDOBA

CERTIFICAMOS que el trabajo
"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INVERTASA EN MIELES DEL DEPARTAMENTO DE CRUZ DEL EJE (CÓRDOBA). TRATAMIENTO TÉRMICO Y POSIBLE ADULTERACIÓN."
de los autores
Federico M , Turina AV
ha sido presentado en modalidad POSTER en el VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos realizado los días 1, 2 y 3 de octubre de 2018 en la ciudad de Córdoba, Argentina.


Dr. Alberto Leon
Coordinador del Comité Científico-Tecnológico CICYTAC 2018.


Dra. Victoria Rosati
Directora de Vinculación Institucional y Sectorial Gobierno de Córdoba.


Dr. Walter Robledo
Ministro de Ciencia y Tecnología Gobierno de Córdoba

Firmado digitalmente por:
ROSATI, Victoria Rosa Gabriela