

# La región óptima para la hidrólisis enzimática en la producción de glucosa

Mariano Felipe Cortés-Falcón\*, Inés de la Caridad Alomá-Vicente, Omar Pérez-Navarro y Jorge Leyva-Mas  
Universidad central Marta Abreu, de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 51/2, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

marianocf@uclv.edu.cu

## RESUMEN

La glucosa es un edulcorante que se puede obtener a partir de la inversión ácida de la sacarosa, empleando ácido fosfórico al 85 %. Durante el proceso se originan productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados. En el presente trabajo se realiza el estudio de la inversión de la sacarosa por vía enzimática, se usa una enzima invertasa termorresistente producida por el Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ICIDCA), con el objetivo de determinar la región óptima para la hidrólisis enzimática, utilizando invertasa sumergida. Se realiza a escala de laboratorio la hidrólisis enzimática de la sacarosa, se emplea invertasa en un proceso sumergido, se planifican los experimentos a partir de la matriz de Plackett Burman, la variable respuesta seleccionada, la concentración de reductores totales, determinados a partir del método del ácido 3.5 dinitro salicílico (DNS) y se aplica el método del paso ascendente se optimizan las variables del proceso; siendo las más significativas la concentración de sacarosa, la concentración de enzima y la temperatura. Los mejores resultados obtenidos en el proceso de inversión de la sacarosa que emplea la enzima invertasa sumergida, son la concentración de sacarosa (70 %), concentración de enzima (14.64 mL/100g refino), pH (4.6) y temperatura (86 °C).

**Palabras clave:** azúcares reductores, enzima invertasa, hidrólisis enzimática, optimización, sacarosa.

## ABSTRACT

Glucose is a sweetener that can be obtained from the acid inversion of sucrose using 85 % phosphoric acid; during the process, colored products with the presence of ashes and unwanted by-products are produced. In the present work, the study of sucrose inversion by enzymatic route is carried out using a thermoresistant invertase enzyme produced by ICIDCA, in order to determine the optimal region for enzymatic hydrolysis using submerged invertase. The enzymatic hydrolysis of sucrose is performed at laboratory scale using submerged invertase. The experiments are planned based on Plackett Burman's matrix, the selected response variable, the concentration of total reducers, determined from the 3.5 dinitro salicylic acid (DNS) method, and applying the upstream method, the process variables are optimized, the most significant being sucrose concentration, enzyme concentration and temperature. The best results obtained in the sucrose inversion process using the submerged invertase enzyme are the sucrose concentration (70 %), enzyme concentration (14.64 mL/100 g refined), pH (4.6) and temperature (86 °C).

**Key words:** reducing sugars, invertase enzyme, enzymatic hydrolysis, optimization, sucrose.

## INTRODUCCIÓN

Los edulcorantes se encuentran entre los principales insumos de interés industrial y, dada su capacidad endulzante, son utilizados en la elaboración de una gran variedad de alimentos y bebidas; los tipos de edulcorantes más comunes y conocidos son los azúcares, que son producidos de una

gran variedad de plantas, también se encuentran en algunos productos como el aguamiel, la miel y la leche, según informa García *et al.* (1).

La sacarosa es un disacárido, formado por glucosa y fructosa, que por hidrólisis se transforma en estos monosacáridos, para obtener como producto el azúcar invertido (2, 3).

La glucosa, es el azúcar más importante en el metabolismo de las células vivas, su aporte calórico es de 4 kcal/g; es el azúcar más abundante encontrado en la sangre; está presente en muchas frutas, y es la unidad base de la celulosa, el almidón y el glucógeno; su poder edulcorante es menor al de la sacarosa y cuenta con un amplio mercado en el área de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos (4, 5).

La glucosa se puede obtener por inversión enzimática o por hidrólisis ácida del almidón o la sacarosa, que son las principales fuentes de energía presentes en materias primas tales como el plátano, el almidón de yuca, el almidón de maíz, la remolacha y el azúcar refinado (6).

En la obtención de la glucosa, la etapa fundamental del proceso es la inversión de la sacarosa, que se puede desarrollar por acción de un ácido a temperatura elevada; por vía enzimática, utilizando la enzima invertasa, y por intercambio iónico (7).

### **Inversión ácida de la sacarosa**

El proceso de inversión ácida de la sacarosa se lleva a cabo con una tecnología cubana que opera en régimen discontinuo. Desarrolla la producción de glucosa y sirope rico en fructosa, a partir del azúcar refinado, mediante la inversión ácida de la sacarosa. Este método de hidrólisis emplea ácidos tales como (clorhídrico, fosfórico, cítrico), a elevada temperatura (85-90 °C).

La sacarosa se invierte al incorporar una molécula de agua, lo que origina que el enlace glucosídico entre los dos monómeros que la forman, se hidrolice. Este proceso se realiza en un reactor del tipo tanque agitado.

### **Inversión de la sacarosa por enzima invertasa**

En este método, la disolución de sacarosa, se pone en contacto con la enzima invertasa también denominada  $\beta$  - fructosidasa, (EC 3.2.1.26), definida como enzima que hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa, su pH óptimo oscila de 4.5 a 5. La hidrólisis de la sacarosa catalizada por invertasa, presenta un mecanismo comparable al de la hidrólisis ácida, que se produce por el átomo de oxígeno glucosídico.

Las enzimas son sustancias macromoleculares, de naturaleza proteica, constituidas por largas cadenas de  $\alpha$ -L-aminoácidos, unidos covalentemente entre sí, por medio de enlaces tipo amida, denominados enlaces peptídicos (8). Estas cadenas polipeptídicas no son polímeros al azar, de longitud indefinida, cada cadena posee una composición química específica, una masa molar y una secuencia ordenada de aminoácidos estructurales; con una forma tridimensional característica, necesaria para su función biológica específica o para su actividad (9), que son capaces de incrementar la velocidad de las reacciones químicas, que por su naturaleza, nunca se verificarían en las condiciones existentes en el medio celular.

### **Inversión de la sacarosa por intercambio iónico**

En este método se emplean resinas de intercambio iónico catiónicas, fuertemente ácidas, que contienen ácido sulfónico. El interior de este tipo de resina hinchada con agua, puede considerarse como una disolución de ácido concentrado. Estas resinas producirán reacciones catalizadas por ácidos, tales como la inversión de la sacarosa. Esta propiedad puede utilizarse industrialmente, como una alternativa de la catálisis, mediante ácidos para invertir la sacarosa, y evitar reacciones colaterales no deseables, mediante el empleo de un catalizador de intercambio iónico.

En la actualidad, en Cuba, el grupo empresarial AZCUBA, produce la glucosa por inversión ácida de la sacarosa, y emplea como materia prima el azúcar refino C. La calidad y rendimiento de la glucosa obtenida depende, en gran medida, de la calidad del refino insumido, que debe cumplir con la norma NC 377-2013. De igual forma, la calidad de ese refino producido estará en dependencia de la calidad del azúcar crudo que se procesa. Este método de hidrólisis tiene como inconveniente el empleo de ácidos, a elevada temperatura lo que puede originar productos coloreados, con presencia de cenizas, bajo porcentaje de inversión, alto consumo de sacarosa, corrosión y presencia de residuos ácidos en el producto, que representa un problema de salud, según los reportes de investigaciones realizadas por varios autores (8 - 11). Teniendo en cuenta estos resultados, Gómez (7) investigó el proceso de inversión de la sacarosa, por vía enzimática, empleó la enzima invertasa inmovilizada, y demostró que, con este proceso, se logran los siguientes beneficios:

- Se incrementa el rendimiento en glucosa.
- Se logra continuidad del proceso.
- Se logran varios ciclos de reuso para la enzima.
- Estabilidad operacional de la enzima.

### **Diseños factoriales parciales**

Los problemas prácticos dependen, usualmente, de muchas variables, esto incrementa el número de ensayos a realizar, es posible reducirlos se utilizan los diseños factoriales parciales, siendo su forma indicada  $2^{k-p}$ .

### **Diseños factoriales parciales saturados**

Pueden investigarse  $(n-1)$  variables, mediante experimentos. El propósito fundamental en la aplicación del diseño altamente fraccionado, es su capacidad para estudiar todas las variables posibles, que afectan el sistema.

En general, el desarrollo del plan experimental Plackett-Bürman, es considerado como un buen programa para iniciar el estudio del comportamiento de sistemas, con más de cinco variables de entrada.

### **Método de Plackett-Bürman**

El primer paso de este método es relacionar las variables, que el estudio preliminar del proceso ha permitido determinar como independientes y dependientes. Las variables independientes se estudian a dos niveles, un nivel bajo y un nivel alto, la selección de los niveles debe permitir lograr cambios significativos en las variables independientes.

El segundo paso, es seleccionar el mejor plan experimental para estudiar el efecto de las variables independientes.

El tercer paso, es desarrollar la matriz del plan experimental, lo que puede lograrse conociendo la primera fila de cada plan, según el número de variables independientes (10).

El método para generar la matriz de diseño, conociendo la primera fila, consiste en correr, cíclicamente, un lugar a la izquierda  $(N-2)$  veces y se añade una última fila de valores negativos; los experimentos se realizan con  $(N-3)$  o  $(N-4)$  variables, por lo que las  $(N-1)$  que permiten considerar el diseño, dos o tres serán falsas variables; es decir, que no toman valores reales en los experimentos y se incluyen solo en el proceso de cálculo.

Con estos tipos de diseño se obtiene el efecto de las interacciones, que es importante, pero no se puede conocer si existe una relación no lineal entre los factores y la respuesta que se mide (12, 13).

En el presente trabajo se realiza el estudio de la inversión de la sacarosa por vía enzimática se emplea una enzima invertasa termorresistente, producida por el ICIDCA, con el objetivo de determinar la región óptima para la hidrólisis enzimática de la sacarosa, si se emplea invertasa sumergida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Enzima invertasa

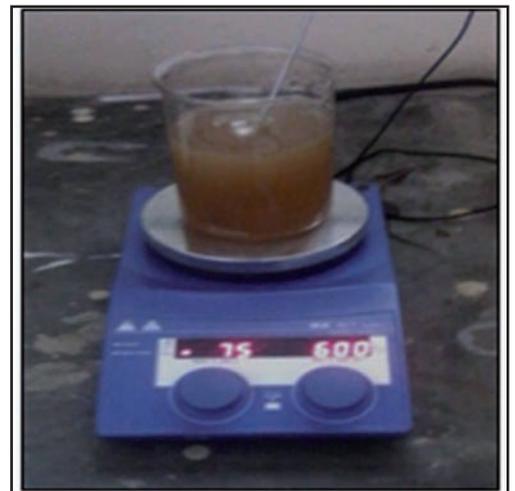
La enzima empleada es una invertasa, termorresistente, obtenida por el ICIDCA, en sus dependencias de CUBA 10, emplea un medio de cultivo de bajo costo, de producción nacional. La enzima se caracteriza por tener una actividad 100 U/mL y ser termoestable.

### Sacarosa

Se utiliza azúcar refino C, producida en el central Chiquitico Fabregat, para la preparación de las diferentes disoluciones empleadas en los ensayos.

### Equipo experimental

En la figura 1 se presenta el equipamiento que se utiliza para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de la sacarosa, en un proceso discontinuo, empleando la enzima invertasa sumergida. La disolución se trasvasa al vaso de precipitado de 900 mL, con agitación magnética y un sensor, para mantener constante la temperatura al valor requerido.



**Figura 1.** Equipo experimental para la hidrólisis de sacarosa.

### Métodos de análisis

#### *Preparación del reactivo del ácido 3.5 dinitrosalicílico*

Se pesan 5 g de ácido 3.5 dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua y se añade en agitación el tartrato de Na-K, lentamente. Se completa con agua destilada hasta 400 mL y se comienza a añadir lentamente el ácido 3.5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 mL y se filtra (14).

#### *Desarrollo de la reacción del DNS*

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 0.5 mL de muestra y 0.5 mL del reactivo de DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100 °C durante 5 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 5 mL de agua destilada. Se agita y se realiza la lectura a 540 nm, con espectrofotómetro modelo Genesys-20.

#### *Diseño factorial*

En la investigación se parte de un diseño factorial completo Plackett Burman, que permite analizar el efecto de diferentes variables, en los parámetros finales establecidos, minimizando las réplicas y los gastos experimentales (15, 16).

#### *Estudios de optimización*

El proceso de optimización comienza con la identificación de las variables que tienen efecto positivo sobre la variable de respuesta (concentración de azúcares reductores totales), mediante un

diseño Plackett- Burman. Se incrementan los valores de las variables, con el fin de direccionar el modelo hacia una región óptima, (método de paso ascendente), y se identifican las combinaciones que optimizan la concentración de reductores totales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de los niveles de las variables

Para llevar a cabo el proceso experimental se planifican los experimentos, se seleccionan los niveles para cada variable, según se reportan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Valores de los niveles de las variables seleccionadas en el diseño experimental

Factores	Nivel bajo	Nivel alto
$X_1$ (Conc. sacarosa) (%)	25	30
$X_2$ (Conc. enzima) (mL/100 g refino)	5	10
$X_3$ (pH)	4.2	4.6
$X_5$ (Temperatura) (°C)	45	70
$X_6$ (Tiempo) (h)	2	4

A partir de la variable respuesta obtenida se conforma la matriz experimental de Plackett-Bürman, que permite obtener el modelo del diseño experimental, en función de las variables seleccionadas, según se reporta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Matriz experimental y resultados del diseño Plackett-Bürman

N	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4(X_{f1})$	$X_5$	$X_6$	$X_7(X_{f2})$	Y
1	+	+	+	-	+	-	-	590.0
2	+	+	-	+	-	-	+	644.33
3	+	-	+	-	-	+	+	117.44
4	-	+	-	-	+	+	+	525.35
5	+	-	-	+	+	+	-	529.96
6	-	-	+	+	+	-	+	229.96
7	-	+	+	+	-	+	-	309.81
8	-	-	-	-	-	-	-	164.77

( $X_4$  y  $X_7$ : falsas variables; Y: concentración de reductores totales, g/L)

### Obtención del modelo del diseño experimental

Con los resultados experimentales obtenidos en el diseño se determinan los coeficientes del modelo, representado por la ecuación 1.

$$Y = E_0 + E_1 X_1 + E_2 X_2 + E_3 X_3 + E_4 X_4 + E_5 X_5 + E_6 X_6 + E_7 X_7 \quad \text{Ec. 1}$$

Siendo,

$$E_0 = \frac{\sum Y_i}{8} \quad \text{Ec. 2}$$

$$E_i = \frac{\sum X_i Y_i}{8} \quad (i=1, \dots, 7) \quad \text{Ec. 3}$$

Se calculan los coeficientes del modelo y se obtiene como resultado:

$$Y = 370.260 + 162.860 X_1 + 256.990 X_2 - 154.540 X_3 - 79.025 X_4 + 159.839 X_5 - 36.520 X_6 - 19.215 X_7$$

Para evaluar la significación de las variables, se identifica el efecto (ecuación 4) y la variación (ecuación 5) de las falsas variables.

Luego, el efecto de las falsas variables ( $S_{bj}$ ) será:

$$S_{bj} = \pm \sqrt{\frac{\sum (\text{Coefic falsas variables})^2}{2}} \quad \text{Ec. 4}$$

$$S_{bj} = \pm 57.20$$

La variación de las falsas variables ( $b_j$ ) será:

$$b_j = \pm S_{bj} * t (\rho; gl) \quad \text{Ec. 5}$$

Se trabaja para probabilidades de 90 y 95 % y dos grados de libertad ( $gl$ ).

$$\begin{aligned} \text{Para } t(95; 2) &= 2.92 & b_j &= 167.08 \\ t(90; 2) &= 1.886 & b_j &= 107.379 \end{aligned}$$

Se obtiene que para un 95 % de probabilidad solo es significativa la variable concentración de enzima, mientras que para un 90% de probabilidad son significativas las siguientes variables: concentración de sacarosa ( $X_1$ ), concentración de enzima ( $X_2$ ), pH ( $X_3$ ) y temperatura ( $X_5$ ).

Por lo tanto, las falsas variables no son significativas y tampoco lo será para ese rango de variación, la variable tiempo ( $X_6$ ). Por lo que se decide efectuar el proceso de optimización al trabajar con un nivel de probabilidad del 90 %.

Se puede apreciar que para este nivel de probabilidad, la concentración de reductores totales se incrementa, a medida que se eleva la concentración de sacarosa, la concentración de enzima y la temperatura.

Respecto al pH, se aprecia que a niveles bajos de este indicador, la concentración de reductores se incrementa, lo que indica que la hidrólisis por vía ácida interfiere en el proceso enzimático.

### Transformación del diseño Plackett-Bürman al modelo de Box- Hunter

Una vez identificadas las variables significativas obtenidas a través del modelo, según el diseño Plackett-Bürman, se transforma al modelo de Box- Hunter, factorial  $2^{4-1}$ , cuya relación de confusión es  $X_5 = X_1 X_2 X_3$ .

Se confecciona la matriz experimental, que se reporta en la tabla 3 en la que se resume la influencia de las variables significativas y sus interacciones en la concentración de reductores totales y sus réplicas ( $Y_1$ ;  $Y_2$ ); además, se determina el valor medio y la varianza a las corridas.

**Tabla3.** Matriz experimental del modelo de Box- Hunter

N	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_5$	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_1 X_5$	$Y_1$	$Y_2$	$\bar{Y}$	$Si^2$
1	+	+	+	+	+	+	+	590.0	566.4	578.2	189.24
2	+	+	-	-	+	-	-	644.33	625.0	634.66	93.41
3	+	-	+	-	-	+	-	117.44	115.09	116.26	1.38
4	-	+	-	+	-	+	-	525.85	510.07	517.96	62.25
5	+	-	-	+	-	-	+	529.96	502.79	516.37	184.55
6	-	-	+	+	+	-	-	229.96	221.91	225.93	16.16
7	-	+	+	-	-	-	+	309.81	312.86	311.34	2.31
8	-	-	-	-	+	+	+	164.77	161.47	163.12	2.73

Para demostrar la homogeneidad de la varianza, se efectuó la prueba de Fisher,

$$F(1,1)_{calc} = \frac{Si_{max}^2}{Si_{obs}} = 133,73 < F(1,1,95)_{tab} = 161$$

Por lo tanto las varianzas son homogéneas y se puede realizar el cálculo del diseño, siendo:

$$S(y)^2 = \frac{\sum si}{N} = \frac{502.03}{8} = 62,75375$$

$$Sy^2 = 62.75375$$

$$Sy = \pm 7.92148$$

$$\Delta bj = \pm Sbj \cdot t_{95} \quad t_{95} = 1.86$$

$$\Delta bj = \pm 7.92148 \cdot 1.86 = 14.734$$

$$\Delta bj = \pm Sbj \cdot t_{85} \quad t_{85} = 1.119$$

$$\Delta bj = \pm 7.92148 \cdot 1.119 = 8.8641$$

Patrón de confusión:

$$X_5 = X_1 X_2 X_3$$

Relación generada:

$$1 = X_1 X_2 X_3 X_5$$

Siendo el modelo del Box – Hunter:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_5 X_5 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{15} X_1 X_5 \quad \text{Ec. 6}$$

Se determinan los coeficientes del modelo obteniéndose como resultado:

$$Y = 382.9618 + 73.3918X_1 + 127.56X_2 - 75.05X_3 - 79.025X_4 + 76.634X_5 + 17.24X_1X_2 - 39.0968X_1X_3 + 9.2881X_1X_5 \quad \text{Ec. 7}$$

### Verificación de la adecuación del Modelo de Box- Hunter

Para verificar la adecuación del modelo, se valoran las variables significativas del proceso en la ecuación 7, posteriormente se determinan los valores de reductores totales predichos por el modelo ( $\hat{Y}$ ) y la varianza, según se aprecia en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valores predictivos de la concentración de reductores totales según el modelo de Box –Hunte.

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>5</sub>	$\bar{Y}$	$\hat{Y}$	$(\bar{Y} - \hat{Y})^2$
1	+	+	+	+	578.2	577.94	0.0629
2	+	+	-	-	634.666	634.39	0.0718
3	+	-	+	-	116.26	115.50	0.05968
4	-	+	-	+	517.96	518.20	0.06215
5	+	-	-	+	516.37	516.64	0.0716632
6	-	-	+	+	225.93	225.66	0.07140625
7	-	+	+	-	311.37	311.81	0.019404
8	-	-	-	-	163.12	162.90	0.04541
$\sum (\bar{y} - \hat{y})^2$							0.4644

$$S(ad)^2 = \frac{\sum si^2}{N - (F + 1)} = \frac{0,4644}{8 - (4 + 1)} = 0,15$$

$$F(3,8) \text{ cal} = \frac{0,15}{62,75375} = 0,00239 < F(3,8,95) \text{ tab} = 4,07$$

Según la prueba efectuada, el modelo es adecuado (18) y se puede proceder a la aplicación del método de optimización de paso ascendente, variando los factores según se muestra a continuación:

$X_1$  = Paso Positivo;  $X_2$  = Paso Positivo;  $X_3$  = se mantiene constante para minimizar la acción de la acidez;  $X_5$  = Paso Positivo

Los resultados experimentales obtenidos y expresados en la tabla 5 indican que a medida que se incrementa la concentración de sacarosa, la concentración de enzima y la temperatura, a pH constante, se favorece la concentración de azúcares reductores totales y se obtienen los mejores resultados en la corrida 6.

**Tabla 5.** Resultados experimentales del proceso de paso ascendente

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_5$	Y
1	38.1	12.7	4.6	70	770.62
2	39.93	13.31	4.6	74	860.25
3	41.92	13.93	4.6	78	912.76
4	43.92	14.64	4.6	78	1042.10
5	60	14.64	4.6	82	1062.27
6	70	14.64	4.6	86	1102.34

## CONCLUSIONES

1. Las variables que influyen significativamente, en el intervalo estudiado, en el proceso de inversión de la sacarosa con el empleo de la enzima invertasa sumergida son: concentración de sacarosa, concentración de enzima, pH y temperatura.
2. Los mejores resultados obtenidos, una vez realizada la búsqueda de la región óptima, en el proceso de inversión de la sacarosa, empleando la enzima invertasa sumergida son: concentración de sacarosa (70 %), concentración de enzima (14.64 mL/ 100 g refino), pH (4.6) y temperatura (86 °C).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García, G. M.; López, M. C.; Quintero, R. R. 2000. Biotecnología de alimentos, México.
2. Monserrath, M.; Molina, L. Gerardo, M. Evaluación del efecto de la temperatura, concentración y flujo volumétrico en la hidrólisis de sacarosa mediante una invertasa inmovilizada en un reactor esférico. Revista Ingeniería. Inii.ucr.ac.cr/revista. www.ucr.ac.cr. ISSN 1409-2441. Enero-Julio 2011 – Volumen 2(1). Editorial UCR.
3. Herrera, C.; Bolaños, N. & Lutz, G. (2003). Química de alimentos: manual de Laboratorio. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
4. Scriban, R. 1985. Biotecnología; segunda edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México. 167-378.
5. Vandamme, E. J.; Derycke, D. J. 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. Laskin A. I. Adv. In Appl. Microb. , 139-176.
6. Ruíz, I. (2018). Propuesta de modificaciones a la producción de glucosa por vía enzimática en la UEB "Chiquitico Fabregat". Tesis en opción del Título en Ingeniería Química. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba. 5-6.
7. Gómez, L. (2015). Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad de Matanzas. 23.

8. Duarte, E. 1997. Siropes Invertidos. Pasado y presente. Revista ATAC., 47.
9. Albertini, A.; Cadena, P.; Silva, J.; Nascimento, G.; Reis, A.; Freire, V.; *et al.* 2012. Performance of invertase immobilized on glass–ceramic supports in batch bioreactor Chemical Engineering Journal 187, 341-350.
10. Eisenhaber, F.; Bork, P. (1999) Biotechnology. Second Edition. Volume 5a. Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic Genes. Sequence and Structure of proteins.
11. Lehninger, A. L. 2005. Biochemistry. Second edition; eighth printing. Worth publisher, INC; USA. 1089.
12. Kurup, A. S.; Subramani, H. J.; Hidajat, K. & Ray, A.K. 2005. Optimal design and operation of SMB bioreactor for sucrose inversion. Chemical Engineering Journal. , 108, 19–33.
13. Nasef, M. M.; Saidi, H. & Senna M. 2005. Hydrolysis of sucrose by radiation grafted sulfonic acid membranes. Chemical Engineering Journal, 108, 13–17.
14. Plackett, R.; Búrman, J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiment. Biometrika, 33: 305-325.
15. Akahnazarova, S.; Kafarov, V. (1982). Experiment optimization in chemistry and Chemical Engineering. MIR, Moscow, 240-293.
16. Sumner, J. B. ; Sisler, E. B., Arch. Biochem 4, 333, 1944.
17. Sheaffer, R. y Mc Clare, J. Probabilidad y Estadística para Ingeniería. Grupo Editorial Panamericana. 2 Ed. 1990.
18. González, E. Aspectos técnicos-económicos de los estudios previos inversionistas para la producción de etanol de azúcar, Universidad de Jaén, España, 2012.



