

# Sacarificación enzimática para la producción de jarabe glucosado

*Olga Elena Flórez Franco\* y Nora Dabeiba Uribe Restrepo\*\**

## Resumen

En este trabajo se evaluó la producción de jarabe glucosado a partir de la sacarificación de maltodextrina con enzima glucoamilasa libre, para tres concentraciones de maltodextrina (20, 40 y 60 g/l) y tres concentraciones de enzima glucoamilasa (0,75000; 0,43125 y 0,11250 AGU/ml), con un diseño experimental tres factorial, a temperatura de 60 °C y pH 4,3. El propósito era encontrar las concentraciones óptimas de producción de glucosa, teniendo como variables de respuesta el equivalente de dextrosa final, el porcentaje de conversión y la velocidad inicial de reacción.

Se trabajó la sacarificación con enzima inmovilizada tanto de la maltodextrina como de la maltosa en el punto óptimo de las concentraciones halladas en la sacarificación con enzima libre, en un sistema de reacción por lotes sucesivos hasta observar poco rendimiento en la producción de azúcares reductores y glucosa, respectivamente, se logró en cada caso trabajar cinco lotes de sacarificación reutilizando la enzima, y se observó que las variables de respuesta (equivalente de dextrosa final o concentración de glucosa, porcentaje de conversión y velocidad inicial de reacción) disminuyen su valor lote a lote.

----- *Palabras clave:* maltodextrina, glucoamilasa, sacarificación, jarabe glucosado, inmovilización.

## Abstract

In the present work the production of glucose syrup was evaluated starting from the maltodextrine saccharification with free glucoamylase enzyme, for three maltodextrine concentrations (20, 40 y 60 g/l) and three glucoamylase enzyme concentrations (0,75000; 0,43125 y 0,11250 AGU/ml), with an experimental design three factorial, at temperature 60 °C and at pH 4,3. The purpose was to find the best concentrations of glucose production, having as response variables the dextrose equivalent final, the conversion efficiency and the initial reaction velocity.

The saccharification with immobilized enzyme was worked to maltodextrine and maltose in the best concentrations found in the saccharification with free enzyme, in a reaction system for successive lots until little yield was observed in the production of reducing sugars and glucose respectively, being achieved in each case to carry out five saccharification lots reutilizing the enzyme, and

---

\* Estudiante de ingeniería química de la Universidad de Antioquia. E-mail: oleflofra@hotmail.com.

\*\* Estudiante de ingeniería química de la Universidad de Antioquia. E-mail: endur853@udea.edu.co.

observing that the response variables (dextrose equivalent final or glucose concentration, conversion efficiency and reaction velocity initial) diminish their value lot to lot.

----- *Key words:* maltodextryne, glucoamylase, saccharification, glucose syrop, immobilization.

## Introducción

Con el creciente avance de la ciencia y la tecnología, se han podido desarrollar nuevos procesos para satisfacer las necesidades de la sociedad, por tal razón, en las últimas décadas la biotecnología y sus aplicaciones en bioprocesos se han presentado como una gran opción adicional a los procesos tradicionales. La biotecnología ofrece ventajas significativas en la transformación de desechos, descontaminación de agua, transformación de productos vegetales en medicinas, mejoramiento productivo del sector agrícola, etc.

Una industria de gran auge en el mundo es la producción de edulcorantes, tanto calóricos como no calóricos, que entran a competir con la sacarosa, en algunas ocasiones por su poder edulcorante y en otras por sus menores costos de producción [1].

Un producto biotecnológico de gran demanda a escala mundial (aproximadamente 18 millones de ton/año en 1996) son los jarabes fructosados [2]. El proceso biotecnológico de producción de jarabes fructosados y glucosados a partir de almidón es un proceso que se ha establecido en el mundo desde principios del decenio de 1970, primero en Japón y luego en los Estados Unidos, y a mediados del decenio de 1980 Canadá y la Comunidad Europea incursionaron en esta línea de producción; en nuestro país a pesar de que la biotecnología para este tipo de procesos ya existe, no se producen estos jarabes ni tampoco se importan, aunque pueden ser ampliamente utilizados en la industria [3].

El jarabe fructosado se usa como endulzante sustituto de la sacarosa primordialmente en la industria de bebidas refrescantes. El jarabe de glucosa es de suma importancia para la industria, ya que tiene aplicación en procesos de producción de etanol y elaboración de cerveza, en la industria de alimentos (repostería, confitería, etc.), además, impide la cristalización de la sacarosa y otros azúcares, tiene la capacidad de bajar el punto de congelación de algunas soluciones, posee buena higroscopicidad, también

controla la coloración morena de los azúcares reductores en la superficie durante la cocción. Así que es un producto altamente requerido en la industria y por tanto es de suma importancia su producción [4].

Este proyecto evaluó la etapa de sacarificación del proceso de obtención de jarabe glucosado, usando la enzima glucoamilasa libre e inmovilizada y como matriz de inmovilización alginato de calcio.

## Materiales y métodos

### *Materia prima*

Se empleó maltodextrina (Nestlé) como materia prima en la sacarificación.

### *Enzima*

La enzima glucoamilasa utilizada fue la AMG 300 I (amyloglucosidase Novo), con actividad enzimática de 300 AGU/ml. Una unidad de actividad glucoamilásica Novo (1 AGU) es la cantidad de enzima que hidroliza 1 mol de maltosa por minuto a condiciones estándar (temperatura de 25 °C y pH 4,3) [5].

### *Determinación del equivalente de dextrosa (DE)*

El DE se le determinó a una solución de maltodextrina al 35% (P/V) por el método de ácido-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Gail Lorenz Miller [6], empleando como patrón solución de glucosa al 2% (P/V).

### *Determinación de la actividad enzimática*

La actividad enzimática se determinó con la medida de la velocidad inicial de reacción en la hidrólisis de maltosa, a las siguientes condiciones: solución de maltosa al 2% (P/V), a pH 4,3, temperatura de 25 °C y durante un tiempo de 30 minutos, para tres concentraciones diferentes de enzima (15,00; 1,50 y 0,15 AGU/ml), en un volumen de reacción de 2 ml, según el método analítico descrito por Industrias Novo [5].

### ***Sacarificación de maltodextrina con enzima glucoamilasa libre***

Se realizó la sacarificación de maltodextrina con enzima libre por lotes en un volumen de reacción de 251 ml (250 ml de solución de maltodextrina más 1 ml de solución enzimática) en erlenmeyers de 500 ml, a pH 4,3 proporcionado por solución buffer de acetato y temperatura de 60 °C proporcionada por un baño termostático Cole Parmer, modelo 1105.

La reacción se llevó a cabo durante un tiempo de 15 horas, para tres concentraciones diferentes de maltodextrina (20, 40 y 60 g/l) y tres concentraciones de enzima (0,75000, 0,43125 y 0,11250 AGU/ml) determinadas según reportes encontrados en la literatura para la sacarificación de almidón de yuca en la producción de jarabe glucosado [7].

Adicionalmente, se hizo un experimento sin enzima, simultáneo con la secuencia experimental, para tener un control de referencia que permita concluir si la formación de azúcares reductores se debe precisamente a la acción de la enzima o a una posible autohidrólisis de la maltodextrina.

La secuencia de experimentos se realizó aleatoriamente y con réplicas en el punto central, según un diseño experimental tres factorial que incluye dos variables a tres niveles de concentración diferentes obtenidas del software Design-Expert 5 desarrollado por Stat-Ease Corporation en 1996; del cual se seleccionaron las mejores concentraciones para realizar la sacarificación con enzima inmovilizada.

A la reacción se le hizo seguimiento de la producción de azúcares reductores determinados por el método del DNS.

### ***Inmovilización de la glucoamilasa***

Se realizó la inmovilización de la glucoamilasa en alginato de calcio, preparando una suspensión de alginato de sodio al 12% (P/V) y una solución de cloruro de calcio al 8% (P/V), de acuerdo con el protocolo descrito por Nan Sun

Wang [8]. El protocolo se modificó adicionando el polímero carbopol al 2% (P/V) mezclado en la suspensión de alginato de sodio para mejorar la retención de la enzima en las esferas de gel de alginato [9].

### ***Sacarificación de maltodextrina con enzima glucoamilasa inmovilizada***

Se realizó la sacarificación de maltodextrina con enzima inmovilizada en erlenmeyers de 500 ml para un volumen de reacción de 280 ml, donde 250 ml corresponden a la solución de maltodextrina al 60% (P/V) y 30 ml al volumen ocupado por las esferas con enzima inmovilizada, para tener una concentración de 0,75 AGU/ml, la reacción se llevó a cabo durante cuatro horas por lotes, debido a que en la sacarificación con enzima libre se observaba que, a partir de este tiempo la producción de glucosa era mínima. Al finalizar la primera sacarificación la enzima inmovilizada se pasó a un segundo lote a las mismas condiciones del anterior y así sucesivamente hasta obtener porcentajes de conversión poco significativos. En la preparación de la solución de maltodextrina se adicionó cloruro de calcio al 1% (P/V) para evitar el deterioro de las esferas que contienen la enzima.

A la reacción se le hizo seguimiento de la producción de azúcares reductores determinados por el método del DNS.

### ***Sacarificación de maltosa con glucoamilasa inmovilizada***

Se hizo una sacarificación de maltosa al 60% (P/V) con enzima inmovilizada, a las mismas condiciones que con maltodextrina, en erlenmeyers de 500 ml para volumen de reacción de 280 ml por lotes sucesivos hasta observar poco rendimiento en la producción de glucosa, a este medio se le adicionó cloruro de calcio al 1% (P/V).

A la reacción se le hizo seguimiento de la producción de glucosa determinada por el método enzimático de glucosa oxidasa descrito por la casa Bayer.

### Determinación de proteínas

Se tomaron muestras al iniciar y al finalizar las sacarificaciones de maltodextrina y maltosa con enzima inmovilizada. Esto se desarrolló para determinar la presencia de proteínas en estas soluciones, como indicativo de que hay liberación de la enzima en las esferas de gel de alginato; se hizo cualitativamente con ácido tricloroacético al 35% (P/V) y cuantitativamente por espectrofotometría a 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 2PC.

## Resultados y discusión

### Equivalente de dextrosa para la maltodextrina

Se determinó que la solución de maltodextrina al 35% tenía un DE igual a  $10,0 \pm 0,2$  g/l, que corresponde a un porcentaje de DE =  $28,4 \pm 0,7\%$  en la maltodextrina empleada.

### Actividad enzimática de la glucoamilasa

En la tabla 1 se reportan los resultados de la actividad enzimática de la glucoamilasa con maltosa y en la figura 1 se observa el efecto de la concentración de enzima en la actividad enzimática.

**Tabla 1** Determinación de la actividad enzimática de la glucoamilasa con maltosa

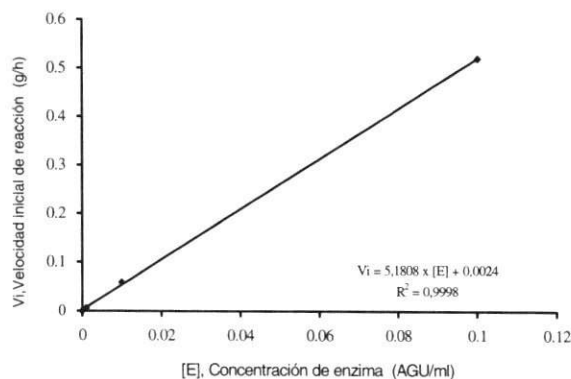
|                              |                     |                     |                     |        |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| [E] (AGU/mL)                 | 15,0                | 1,5                 | 0,15                | 0,0000 |
| Vi (g/h)                     | $5,2 \cdot 10^{-1}$ | $5,9 \cdot 10^{-2}$ | $5,6 \cdot 10^{-3}$ | 0,000  |
| [G] (g/L)                    | 129,0               | 14,8                | 1,4                 | 0,0    |
| a ( $\mu\text{mol/ml/min}$ ) | 238,6               | 273,8               | 259,0               | 0,000  |

[E]: Concentración de enzima  
Vi: Velocidad inicial de reacción  
[G]: Concentración de glucosa  
a: Actividad enzimática

Los resultados del experimento con maltosa muestran que la velocidad inicial de reacción aumenta proporcionalmente con la concentración de enzima (véase figura1).

Al comparar la actividad enzimática hallada por este método, 257,1 AGU/ml, con la de la enzima

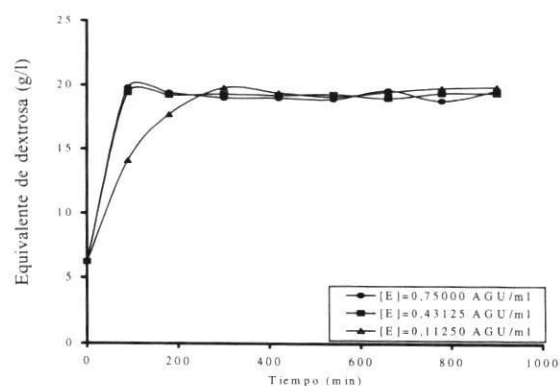
comercial, 300 AGU/ml, se observó que es inferior a la reportada.



**Figura 1** Efecto de la concentración de enzima en la actividad enzimática

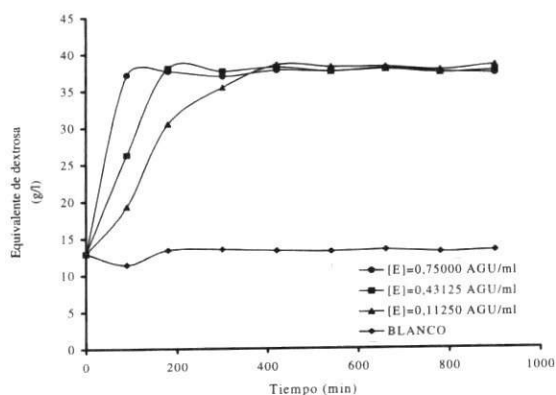
### Evaluación de la sacarificación en la solución de maltodextrina con glucoamilasa libre

Los resultados del seguimiento de la secuencia experimental, expresados en forma de DE, se muestran en las figuras 2, 3 y 4, para las concentraciones de maltodextrina 20, 40 y 60 g/l con sus respectivas concentraciones de enzima; como en el punto central se hicieron cinco experimentos estos se promediaron para representarlos en una sola línea, y se adicionó la correspondiente tendencia del experimento que se realizó sin enzima.



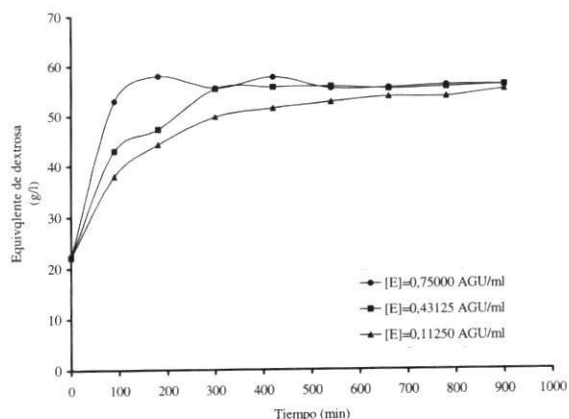
**Figura 2** Sacarificación de maltodextrina al 20% (P/V) a distintas concentraciones de enzima

En la figura 2 se puede observar que la velocidad inicial de reacción para las concentraciones de enzima de 0,75000 y 0,43125 AGU/ml es prácticamente igual y alcanzan un mismo grado de conversión en tiempos similares de 90 min, superiores al de concentración de enzima 0,11250 AGU/ml que alcanza el mismo grado de conversión del 100% con respecto a la hidrólisis ácida pero a los 300 min.



**Figura 3** Sacarificación de maltodextrina al 40% (P/V) a distintas concentraciones de enzima

En la figura 3 se puede observar que la velocidad inicial de reacción para la concentración de enzima 0,75000 AGU/ml es la más alta, siguiéndole la de 0,43125 AGU/ml y por último la de 0,11250 AGU/ml, porque a estas tres concentraciones de enzima se alcanza un grado de con-



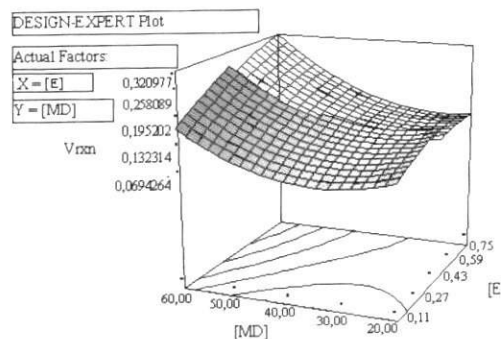
**Figura 4** Sacarificación de maltodextrina al 60% (P/V) a distintas concentraciones de enzima

versión similar pero a diferentes tiempos: 90, 180 y 420 min respectivamente. El experimento sin enzima, evidencia que no se presentó autohidrólisis de maltodextrina, ya que no cambió su DE en el tiempo transcurrido en la experimentación.

En la figura 4 se observa que el comportamiento de los experimentos frente a la velocidad inicial de reacción es igual que para la concentración de maltodextrina al 40% (P/V), pero difiere en los tiempos empleados para alcanzar dicha conversión: 180, 300 y 540 min, lo que se atribuye a que se tiene mayor concentración de maltodextrina.

En la tabla 2 se reportan los resultados de tres variables de respuesta, DE (g/l), porcentaje de conversión y velocidad inicial de reacción (g/l/min), para la secuencia experimental completa.

En la figura 5 se observa que, para el rango de concentraciones de enzima y de maltodextrina trabajadas, hay un punto óptimo de máxima velocidad inicial de reacción (0,34 g/l/min) se obtiene a una concentración de enzima igual a 0,75000 AGU/ml y una concentración de maltodextrina igual a 60 g/l. El programa Design-Expert 5 arroja también la ecuación de velocidad inicial de reacción para un modelo cuadrático en donde se tienen en cuenta cinco factores ([E], [MD], [E]<sup>2</sup>, [MD]<sup>2</sup> y [E][MD]), siendo [E] = Concentración de enzima en AGU/ml y [MD] = Concentración de maltodextrina en g/l, los de-



**Figura 5** Modelo gráfico del Design-Expert 5 para sacarificación con enzima libre

**Tabla 2** Respuestas del diseño experimental de sacarificación con enzima libre

| Corrida | Orden aleatorio | Factor A:<br>[E]<br>(AGU/ml) | Factor B:<br>[MD]<br>(g/l) | R <sub>1</sub> /:<br>DE <sub>f</sub><br>(g/l) | R <sub>2</sub> /:<br>%<br>Conv | R <sub>3</sub> /:<br>V <sub>RXN</sub><br>(g/l/min) |
|---------|-----------------|------------------------------|----------------------------|---|--------------------------------|--|
| 1       | 13              | 0,43125                      | 40                         | 37,5  | 98,8                           | 0,15   |
| 2       | 12              | 0,43125                      | 40                         | 38,0  | 100,0                          | 0,15   |
| 3       | 5               | 0,43125                      | 40                         | 37,4  | 98,4                           | 0,15   |
| 4       | 10              | 0,43125                      | 40                         | 32,3  | 77,9                           | 0,14   |
| 5       | 7               | 0,11250                      | 60                         | 55,1  | 99,7                           | 0,18   |
| 6       | 9               | 0,75000                      | 60                         | 56,0  | 100,0                          | 0,34   |
| 7       | 3               | 0,75000                      | 20                         | 19,6  | 100,0                          | 0,15   |
| 8       | 11              | 0,43125                      | 40                         | 37,5  | 98,8                           | 0,15   |
| 9       | 4               | 0,11250                      | 40                         | 38,4  | 100,0                          | 0,07   |
| 10      | 1               | 0,11250                      | 20                         | 19,9  | 100,0                          | 0,09   |
| 11      | 2               | 0,43125                      | 20                         | 19,4  | 100,0                          | 0,15   |
| 12      | 6               | 0,75000                      | 40                         | 37,3  | 98,0                           | 0,16   |
| 13      | 8               | 0,43125                      | 60                         | 56,0  | 100,0                          | 0,23   |

más corresponden a la interacción entre estos factores, esta ecuación permite predecir la velocidad inicial de reacción para otras concentraciones de enzima y maltodextrina diferentes a las estudiadas, dentro del mismo rango.

Ecuación para el cálculo de la velocidad inicial de reacción arrojada por el programa Design Expert 5.

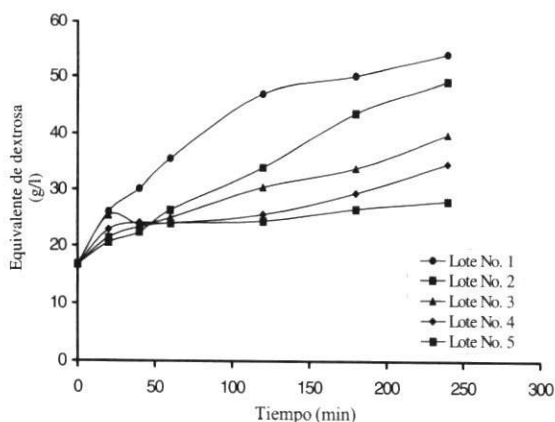
$$V_{rxn} = 0,22 + 0,15 * [E] - 0,010 * [MD] - 0,17 * [E]^2 + 1,448 * 10^{-04} * [MD]^2 + 3,906 * 10^{-08} * [E] * [MD]$$

**Evaluación de la sacarificación de la solución de maltodextrina con enzima inmovilizada**

Se realizaron cinco lotes sucesivos de sacarificación de cuatro horas cada uno, los cuales arrojaron en el análisis cualitativo de proteínas turbidez en todas las muestras, comprobando la liberación de enzima de las esferas de alginato, lo que hace que al pasar las esferas de un lote al

siguiente se pierda enzima y se tenga menor concentración de enzima en este lote.

Los resultados del seguimiento de producción de azúcares reductores expresados en forma de DE se muestran en la figura 6, y en la tabla 3 se listan los resultados de las variables de respuesta equivalente de dextrosa, porcentaje de conversión y velocidad inicial de reacción.



**Figura 6** Lotes de sacarificación de maltodextrina con enzima inmovilizada



**Tabla 3** Respuestas de la sacarificación de maltodextrina con enzima inmovilizada

| Lote                       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    |
|----------------------------|------|------|------|------|------|
| DE (g/l)                   | 54,2 | 49,3 | 39,8 | 34,6 | 28,0 |
| % Conv.                    | 95,8 | 83,0 | 59,0 | 45,8 | 28,8 |
| V <sub>rxn</sub> (g/l/min) | 0,36 | 0,19 | 0,42 | 0,30 | 0,23 |

Para calcular el porcentaje de conversión se utilizó la siguiente ecuación, donde los subíndices f, i y t significan final, inicial y total respectivamente.

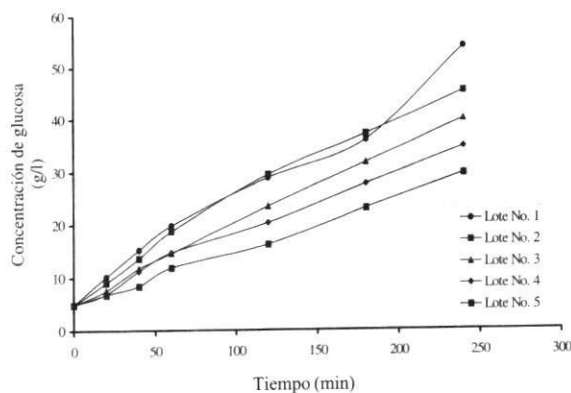
$$\% \text{ Conversión} = \left( \frac{DE_f - DE_i}{DE_t - DE_i} \right) * 100$$

Del comportamiento de los lotes se puede observar que las variables de respuesta tienen tendencia a disminuir lote a lote debido a la pérdida de enzima que se libera del medio inmovilizante.

### Evaluación de la sacarificación en la solución de maltosa con enzima inmovilizada

Al igual que con maltodextrina se realizaron cinco lotes sucesivos de sacarificación de cuatro horas cada uno, comprobándose también la liberación de enzima de las esferas de alginato en el análisis cualitativo de proteínas.

Los resultados del seguimiento de producción de glucosa se muestran en la figura 7, y en la tabla 4 se listan los resultados de las variables de res-



**Figura 7** Lotes de sacarificación de maltosa con enzima inmovilizada

**Tabla 4** Respuestas de la sacarificación de maltosa con enzima inmovilizada

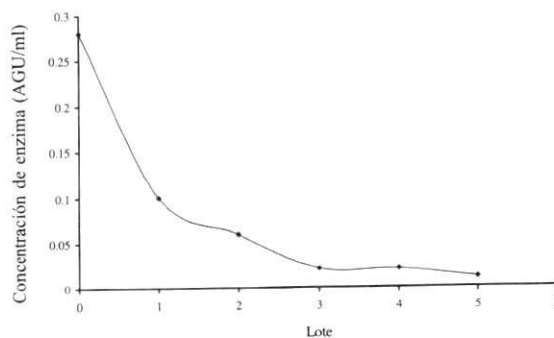
| Lote                       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    |
|----------------------------|------|------|------|------|------|
| [G] (g/l)                  | 54,0 | 45,3 | 39,9 | 34,7 | 29,6 |
| % Conv.                    | 96,5 | 79,4 | 68,8 | 58,5 | 48,5 |
| V <sub>rxn</sub> (g/l/min) | 0,20 | 0,23 | 0,16 | 0,16 | 0,12 |

puesta DE, porcentaje de conversión y velocidad inicial de reacción.

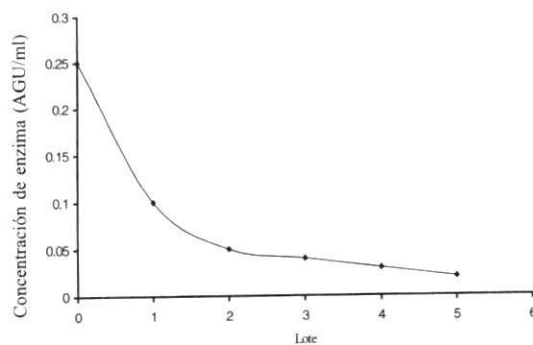
Del comportamiento de los lotes se ve que, al igual que con maltodextrina, las variables de respuesta tienen tendencia a disminuir lote a lote por la pérdida de la enzima.

### Determinación de proteínas por espectrofotometría

Los resultados del análisis cuantitativo de proteínas se muestran en las figuras 8 y 9 que incluyen además la concentración de proteínas en la solución sobrenadante de cloruro de calcio como lote cero.



**Figura 8** Liberación de enzima en la sacarificación de maltodextrina



**Figura 9** Liberación de enzima en la sacarificación de maltosa



Al analizar las figuras 8 y 9 se encontró que en los sobrenadantes de la solución de cloruro de calcio se perdió 37,3 y 33,3% de la enzima inmovilizada para las sacarificaciones de maltodextrina y maltosa respectivamente, que al finalizar el quinto lote se había perdido ya 65,3% de la enzima total en ambas sacarificaciones, esto debido a la pérdida de resistencia de las esferas de alginato, lo que influye en la disminución del porcentaje de conversión lote a lote, estos valores se obtienen al tomar la concentración de enzima 0,75 AGU/ml en la sacarificación con enzima libre como el 100%.

### Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la sacarificación de maltodextrinas con enzima libre puede dar mejores resultados en la velocidad inicial de reacción a medida que se aumentan las concentraciones de maltodextrina y enzima.

Los resultados experimentales nos indican que la técnica de inmovilización ensayada es adecuada si se aumentan las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio y si se adiciona un agente polimerizante como el carbopol que mejore la resistencia de las esferas de alginato; además, que es recomendable adicionar a la solución de maltodextrina cloruro de calcio al 1% (P/V) porque evita el deterioro de las esferas en la sacarificación.

En la evaluación de la sacarificación de maltodextrinas con enzima inmovilizada en el primer lote, se encontró que la producción de azúcares reductores era prácticamente igual a la hallada en la sacarificación con enzima libre, lo que nos permite concluir que no se presentaron problemas difusionales debidos al tamaño del poro del gel de alginato.

### Recomendaciones

Al realizar la técnica de DNS las muestras tomadas se encontraban en solución buffer a pH ácido y como la reacción con el DNS se da en

medio básico se vio la necesidad de adicionar NaOH para evitar la formación de precipitado, además se debe ser muy preciso en su adición ya que altera significativamente la lectura de absorbancia.

También se encontró que es adecuado utilizar agua destilada-desmineralizada en la preparación de todos los reactivos y soluciones con los cuales va a tener contacto la enzima, ya que algunos preensayos realizados con agua destilada dieron rendimientos menores, razón por la cual no se continuó su uso.

Se considera muy importante que en la sacarificación tanto con enzima libre como inmovilizada, se proporcione una agitación permanente para mantener homogénea la solución y así permitir mejor reacción con la enzima.

Al preparar la solución de alginato se recomienda usar agua estéril, pero sin esterilizar en el autoclave la solución preparada, ya que el alginato se licua y hace difícil la formación de esferas, además, implica usar concentraciones mayores de alginato.

Para hacer un estudio más riguroso de la producción de jarabe glucosado se debería utilizar el método de determinación enzimático de glucosa oxidasa para toda la secuencia de experimentación, con maltodextrina tanto libre como inmovilizada, con el fin de obtener directamente la concentración de glucosa, en lugar del método de determinación de azúcares reductores con DNS en el que se miden también otros azúcares presentes en la solución.

Sugerimos para posteriores trabajos que se evalúe otro intervalo de concentraciones de maltodextrina y concentraciones de enzima para hallar el punto óptimo de producción de jarabe glucosado.

### Referencias

1. Cheftel, Jean Claude. *et al. Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos*. Zaragoza. Acribia. 1976. p. 119.

2. Quintero, Rodolfo. *Los bioprocesos y la diversificación de la industria azucarera: Un solo camino*. México D. F. Instituto de Biotecnología UNAM. 1997. p. 582.
3. López, Alfonso. *et al. Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina*. México D. F. Limusa. 1987. p. 123.
4. Oullette, Robert. *Introducción a la química orgánica*. México D. F. Harla. 1973. p. 357.
5. URL: <http://enzymes.novo.dk>.
6. Miller, Gail Lorenz. "Use of DNS for determination of reducing sugar". En: *Analytical Chemistry*. Vol. 31. No. 3. Marzo, 1959.
7. Chuzel, G. *Valorations des produits, sous/produits et dechets de la petite et moyenne industrie de transformation du manioc en Amerique Latine/amelioration des proprietes fonctionnelles des farines et amidons*. Francia. Cirad-Sar. 1992. p. 211.
8. URL: <http://mlab.ice.uec.ac.jp/mit/trans99/tecnichal.html>.
9. Sanromán, María Ángeles. *et al.* "Inmovilización de glucoamilasa en quitina: determinación de las condiciones óptimas, modelo cinético y limitaciones difusionales". En: *Afinidad*. Vol. 49. No. 440. Madrid. Julio, 1992.