

ESCALADO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA DE PLASMA BOVINO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN ANTIOXIDANTE DE ORIGEN BIOLÓGICO.

SCALE UP OF ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCESS OF BOVINE PLASMA PROTEIN FOR PRODUCING A BIOLOGICAL ANTIOXIDANT.

Gómez Nathalia¹, Zapata José E.¹, Montes Julio¹.

¹Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

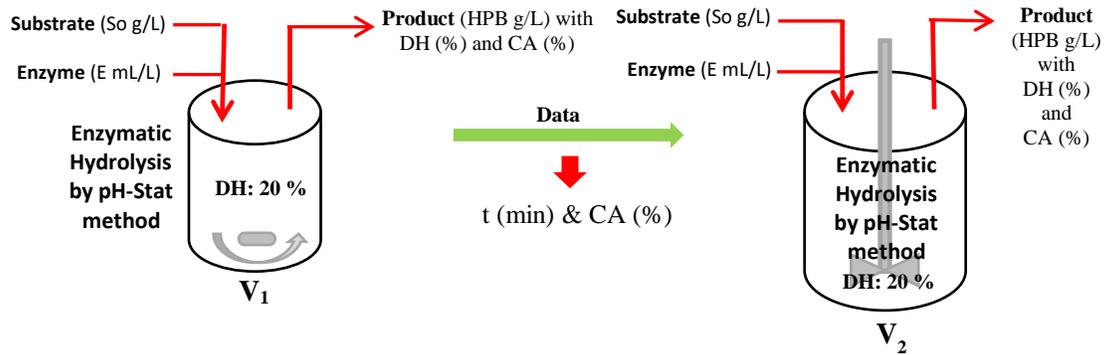
Resumen

La sociedad moderna ha tomado conciencia de la relación entre la dieta y la salud. Razón por la cual se ha empezado a regular el uso de los antioxidantes sintéticos en la industria de alimentos, debido a los efectos secundarios sobre la salud del consumidor final, lo cual ha incentivado la tendencia al consumo de productos de origen natural. Una de las alternativas para satisfacer la demanda de este tipo de productos, es el desarrollo de antioxidantes de fuentes biológicas, tal como la producción de antioxidante hidrolizado de plasma bovino, una fracción de la sangre que es un subproducto de las plantas de beneficio bovino. En este estudio, se usó una metodología de escalado por similitud de comportamiento para obtener un hidrolizado enzimático con condiciones similares y propiedades idénticas al hidrolizado obtenido en un reactor de 1 L. La hidrólisis fue llevada a cabo en un reactor de 1 L controlado por un Titrando 842, un titulador automático (Metrohm, Suiza) con Alcalasa 2.4L, a un pH 9.0 y 61,5°C. Las condiciones óptimas obtenidas en el reactor de 1L fueron escaladas a 5L, en un reactor BioFlo 310 (New Brunswick, EU). El hidrolizado en ambos procesos se obtuvo con un tiempo máximo de 16,53 ± 0,43 min con un grado de hidrólisis de 20%, una concentración de sustrato máxima de 78,22 ± 1,95 g/L, una relación de E/So de 22% y una actividad antioxidante de 70,75 ± 2,46 %.

Abstract

In modern society, there is an increasing awareness of the relationship between diet and health. Reason why the use of synthetic antioxidants in the food industry is regulated, due to the side effects on consumer health, which has created the trend of consumption of products of natural origin. One of the alternatives to satisfy this demand is the search for antioxidants from natural sources, such as the production of hydrolyzed antioxidant from bovine plasma, a fraction of the blood produced in the plants. In the present study, a scaling methodology by behavioral similarity was used to obtain an enzymatic hydrolyzate with similar conditions and identical properties for to obtain the hydrolyzate obtained in a 1 L reactor. The hydrolysis was carried out in a 1 L reactor controlled by a Titrando 842, an automatic titrator (Metrohm, Switzerland) with Alcalasa 2.4L, at pH 9.0 and 61.5 °C. The optimum conditions obtained in the 1L reactor were scaled to 5L in a BioFlo 310 reactor (New Brunswick, EU). The hydrolyzate in both processes was obtained with a maximum time of 16.53 ± 0.43 min with a degree of hydrolysis of 20%, a maximum substrate concentration of 78,22 ± 1,95 g/L, an E/So ratio of 22% and an activity antioxidant of 70,75 ± 2.46%.

Resumen gráfico (Graphical abstract)



Key words: Protein hydrolysates, natural antioxidants, oxygen radical absorbance capacity.

Palabras claves: Antioxidantes naturales, capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno, hidrolizados de proteína.

Introducción.

En los últimos años la sociedad se ha concientizado de la estrecha relación que existe entre dieta y salud, como consecuencia de ello, han irrumpido con fuerza en el sector alimentario y en el sector salud, los productos funcionales, los cuales han cobrado un gran interés, tanto de la comunidad científica, como de la industria alimentaria, y son definidos como aquellos alimentos o sustancias que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo [1].

Las investigaciones realizadas están enfocadas en obtener este tipo de productos y han dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta [2]. Muchas proteínas de origen natural son usadas como fuente para producir hidrolizados proteicos con propiedades bioactivas y desde el punto de vista de protección del medio ambiente y con un enfoque económico, es aprovechar el uso de materiales de subproductos para la generación de productos para industria alimentaria. La sangre animal producida durante el sacrificio es una valiosa y económica fuente de proteínas [3], y se ha encontrado que puede producir diferentes tipos de péptidos bioactivos [4, 5, 6, 7, 8, 9].

En Colombia, según reportes de DANE y su estrategia ESAG (2016), al año se sacrifican aproximadamente 2 millones de cabezas de ganado vacuno, que equivalen a aproximadamente 62.275 toneladas de sangre con un alto contenido de proteínas de alto valor biológico y nutricional [10], sin embargo 65 % de las plantas de sacrificio no hacen ningún uso de la de la sangre resultante del proceso del sacrificio de los animales [11]. De esta manera, la alta producción de la sangre de

bovino en relación con la escasa demanda señala una subutilización de este producto, lo que la convierte en un gran problema medioambiental dado que gran parte de este subproducto es arrojado a las fuentes de agua, lo que es alarmante considerando que la sangre representa una sustancia potencialmente contaminante del medio ambiente [12].

Dada la importancia de buscar nuevas alternativas para la utilización del plasma animal, este trabajo de investigación tiene como objetivo escalar el proceso para obtener un hidrolizado de plasma de bovino con actividad biológica, y que sirva en futuras aplicaciones en la industria alimentaria.

Objetivo.

Obtener un hidrolizado enzimático a partir del plasma de bovino en un reactor de 5L con condiciones y propiedades antioxidantes similares a las obtenidas con el hidrolizado obtenido en un reactor de 1L.

Metodología

Materiales

Plasma bovino con un contenido de proteína de $7,0 \pm 0,9\%$ que fue comprado a un proveedor comercial en Colombia. Enzima proteolítica Alcalasa 2.4 L grado alimenticio (E.C. 3.4.21.62 con una actividad específica de $2,45 \pm 0,07$ AU/g enzima obtenida de *Bacillus licheniformis*, Novo Nordisk Co., Dinamarca). Hidróxido de sodio (NaOH) 2M, grado analítico. Albumina de suero bovino estándar A7030, EC No. 232-936-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Químicos de prueba, como Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbóxico), un análogo soluble de la vitamina E y ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todos los otros químicos y reactivos usados fueron grado analítico.

Métodos

Determinación del contenido de proteína

La concentración de proteína del plasma y del hidrolizado fue determinada por el método de Biuret [13]. La curva estándar fue desarrollada usando Albumina bovina. Las medidas se hicieron en un espectrofotómetro Genesys 10S. La absorbancia fue medida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una longitud de onda de 540 nm.

Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis (GH) está definido como la relación la relación del número de enlaces peptídicos rotos y se expresa como hidrólisis equivalentes (h), en relación con el total de enlaces peptídicos antes del proceso de hidrólisis (h_{tot}).

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

El GH durante la reacción enzimática del plasma bovino con Alcasa 2.4L fue medido por el método de pH-estado. El consumo de base usada puede ser relacionada con el porcentaje del GH por medio de la siguiente ecuación [13]:

$$DH (\%) = \frac{V_B N_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

V_B – Volumen de base consumida (L), N_B – Concentración de la base (eqv/L), M_P – Masa de la proteína (kg) y α - el grado de disociación de los grupos α -NH (Grupos amino liberados en la reacción). Este valor es dado como una función del pH y la temperatura de la reacción (K). El valor usado es 0,9918 y es calculado con la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{10^{\left(\frac{T \cdot pH + 2400 - 0,2537T}{T}\right)}}{1 + 10^{\left(\frac{T \cdot pH + 2400 - 0,2537T}{T}\right)}} \quad (3)$$

El h_{tot} – es calculado por medio de un análisis de aminoácidos y sumando los mmoles de cada aminoácido individual por gramo de plasma bovino, en este caso se usó un valor que se ha reportado para proteínas sanguíneas de 8,3 eqv/kg [14].

Hidrólisis enzimática de las proteínas de plasma bovino

El plasma bovino fue disuelto en agua destilada a diferentes concentraciones de proteína (entre 22 - 80 g/L). Los hidrolizados fueron preparados de acuerdo con el método descrito por Liu y colaboradores (2009) [15]. La reacción de hidrólisis fue realizada inicialmente en un bioreactor con un volumen de 1 L, adicionando una relación de enzima/sustrato (E/S) de 22 % de Alcalasa 2.4L/g de sustrato a 61,5 °C por medio de un diseño óptimo de experimentos. Un pH de 9 fue mantenido estable con la adición de una solución NaOH 2 M usando un titulador potenciométrico automático, Titrando 842 (Metrohm, Siuzo), controlado por un sistema de adquisición de datos (Software Tiamo 1.2.1). La reacción enzimática se llevó a cabo hasta que el grado de hidrólisis fue del 20% [16], luego se inactivó y desnaturizó térmicamente la proteasa a 85°C en un baño de agua por 10 m después de la hidrólisis [14]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Capacidad de absorción de radicales ABTS*

Este método fue usado como fue descrito por Re y colaboradores (1999) [17], basado en la capacidad de una muestra para inhibir los radicales ABTS* comparada con una solución de Trolox® que es un antioxidante químico de referencia estándar. Luego la absorción fue medida a una longitud de onda de 732 nm. Los resultados fueron reportados en % de capacidad antioxidante o capacidad de inhibir la formación de radicales ABTS*.

Diseño experimental para evaluar la obtención de condiciones similares

Un diseño experimental óptimo de un factor para generar los ensayos necesarios para producir un hidrolizado con buena capacidad antioxidante en el proceso por medio de 12 corridas experimentales variando la concentración de sustrato entre 22 y 80 g/L, todos los ensayos se llevaron a cabo hasta obtener un grado de hidrólisis de 20%. El diseño de experimentos se realizó con el objetivo de verificar que las condiciones ensayadas obtenidas en el sistema de hidrólisis de 1L eran reproducibles de forma similar o igual en el biorreactor de 5L.

Escalado del proceso de hidrólisis enzimática de reactor de 1l a reactor de 5L

En el escalado del sistema de reacción, primero se obtuvo un modelo del proceso, que permitió el correspondiente análisis del comportamiento con base en balances macroscópicos y datos experimentales [18]. Se ensayó el funcionamiento del modelo en el reactor de 1L y se comprobó que dicho funcionamiento fuera igual o similar al esperado en el prototipo de 5L. Esto con el objetivo de que el cambio de escala no afectará el comportamiento observado en el modelo y que la similitud del proceso modelo con el prototipo, solo se diferenciará por el error intrínseco del diseño. Los dos sistemas (modelo y prototipo) tenían una similitud geométrica en sus dimensiones y características geométricas, por lo cual este escalado se realizó con la metodología de similitud de comportamiento, donde las variables dependen del fenómeno dinámico. Por lo tanto, el cambio de escala se llevó a cabo con funciones lineales, simples y homogéneas, que vinculaban las variables dependientes e independientes del modelo y el prototipo, con la siguiente ecuación:

$$X_M = \lambda_x \cdot X_P \quad (4)$$

Donde: X_M : es el valor de una propiedad o condición del modelo; λ_x : es el correspondiente factor de escala y X_P : es del valor de la propiedad o condición evaluada u obtenida en el prototipo [19, 20].

Análisis estadístico

Todos los ensayos para la determinación del tiempo de producción de cada hidrolizado (GH: 20%) y capacidad antioxidante fueron realizadas por triplicado. Los resultados de los datos de la capacidad ABTS* son presentados como la media \pm la desviación estándar. Se uso un software Design-Expert® 8.0.5 (Stat-Ease, E.U.) para la generación de los ensayos a realizar, de forma que se aseguró la aleatoriedad e independencia de los ensayos. Se analizaron los resultados del tiempo y de capacidad antioxidante, por medio de la t-student para dos variables independientes con un nivel de significancia de 95% [21].

Resultados

Diseño de experimentos para la obtención de condiciones y capacidad antioxidante

Todos los ensayos realizados en la hidrólisis enzimática de plasma bovino se desarrollaron hasta obtener un grado de hidrólisis de 20%, condición en la que la

presenta la mayor capacidad antioxidante (Tabla 1) [resultados propios, 18] y es confirmado con los resultados de otros autores [22].

Table 1. Actividad antioxidante (ABTS) a diferentes GH

GH (%)	CA ($\mu\text{mol ET/g}$)
0.0	12.53 \pm 0.09 ^a
3.8	53.63 \pm 1.90 ^b
6.7	62.28 \pm 0.26 ^c
10.8	62.96 \pm 0.25 ^c
15.3	65.43 \pm 0.58 ^d
20.0	65.71 \pm 1.12 ^d

^{a-d} Cada superíndice tiene un nivel de significancia diferente ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos en el diseño de un solo factor realizado en el Titrande de 1L, donde la concentración de sustrato varió entre 22 y 80 g de proteína/L se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados del diseño experimental de un factor en reactor de 1L.

Sustrato (g/L)	Tiempo (min)	CA ($\mu\text{mol ET/g}$)
22,00	8,29 \pm 0,06	67,09 \pm 0,10
22,00	8,07 \pm 0,03	67,37 \pm 0,05
31,86	9,52 \pm 0,02	61,70 \pm 0,02
41,43	10,63 \pm 0,07	64,21 \pm 0,10
51,00	12,16 \pm 0,04	62,83 \pm 0,04
51,00	12,46 \pm 0,33	68,79 \pm 0,08
51,00	12,38 \pm 0,03	64,21 \pm 0,02
58,54	13,12 \pm 0,50	62,53 \pm 0,06
65,50	14,19 \pm 0,02	64,78 \pm 0,06
72,75	12,96 \pm 0,12	68,74 \pm 0,05
80,00	16,17 \pm 0,34	69,11 \pm 0,06
80,00	16,10 \pm 0,05	74,23 \pm 0,14

Escalado del proceso de hidrólisis enzimática de reactor de 1L al reactor de 5L

El reactor de 1L fue agitado por un sistema de agitación magnético, que comprendía una plancha de agitación y una barra de agitación. La velocidad de agitación que se usó para agitar el proceso de hidrólisis en el reactor de 1L fue de 5,74 rps, las cuales fueron optimizadas en estudios previos [16]. Ambos sistemas de reacción eran

homogéneos y mantenían una similitud geométrica, como requerimiento para el escalamiento de cualquier bioproceso. El criterio que se utilizó para escalar el proceso fue asegurar una similitud hidrodinámica para los dos sistemas, con el mantenimiento del número de Reynolds en ambos sistemas, de forma tal que en ambos sistemas fuera constante. La condición de conformidad para lograr la similitud hidrodinámica fue:

$$Re_M = Re_P \rightarrow \left(\frac{N \cdot D_i \cdot \rho}{\mu} \right)_M = \left(\frac{N \cdot D_i \cdot \rho}{\mu} \right)_P \quad (5)$$

Donde Re_x es el número de Reynolds para el modelo o para el prototipo; N es la velocidad de agitación (rps); D_i es el diámetro del impulsor (m); ρ es la densidad (kg/L) y μ es la viscosidad del medio (Pa).

En el proceso de escalado, se supuso que la densidad y la viscosidad del medio permanece constante en el sistema, y que la única variación se presenta en el diámetro de los impulsores en ambos sistemas, por consiguiente, la velocidad del impulsor es diferente y la ecuación que expresa este fenómeno se muestra a continuación:

$$(N \cdot D_i)_M = (N \cdot D_i)_P \rightarrow N_P = \frac{(N \cdot D_i)_M}{D_{iP}} \quad (6)$$

El diámetro del impulsor del reactor de 5L usado fue de 0,075 m y el respectivo diámetro de la barra de agitación que impulsa el fluido en el sistema de reacción de 1L fue de 0,05 m. Entonces, la velocidad del impulsor del prototipo fue establecido como 3,83 rps.

Otro criterio que se usó para verificar el cálculo anterior fue la estimación del valor de la velocidad de la punta del impulsor en el prototipo, que se calculó con la siguiente ecuación:

$$N_{pi} = \pi \cdot N_i \cdot D_i \rightarrow (N_{pi})_M = (N_{pi})_P \rightarrow (N \cdot D_i)_M = (N \cdot D_i)_P \quad (7)$$

Donde N_{pi} es la velocidad de la punta del impulsor (rps). Con este procedimiento se determinó la misma ecuación y por lo tanto un valor igual a 3,83 rps para la velocidad del impulsor, siendo este valor del factor de escala entre los dos sistemas de hidrólisis enzimática ($\lambda_x:3,83$). Una vez, establecidas las condiciones del sistema de hidrólisis enzimática en el reactor de 5L, se validaron algunas de las condiciones ensayas en el reactor de 1L y se obtuvieron valores similares (Tabla No. 3)

Tabla 3. Valores obtenidos de ensayos en el reactor de 5L.

Sustrato (g/L)	Tiempo (min)	CA ($\mu\text{mol ET/g}$)
22,00	7,71 \pm 0,23	67,83 \pm 0,68
41,43	10,39 \pm 0,18	65,80 \pm 0,64
51,00	11,64 \pm 0,15	67,54 \pm 0,57
72,75	13,44 \pm 0,33	68,47 \pm 0,14
80,00	17,06 \pm 0,62	68,92 \pm 0,15

En ambos sistemas se evaluaron la viscosidad y la densidad del medio de reacción y del hidrolizado obtenido, propiedades que fueron iguales en los dos sistemas (no se presentan datos).

Discusión

En el cálculo del número de Reynolds del recipiente no se usó la fórmula del número de Reynolds del impulsor en un reactor agitado, con el fin de que la hidrodinámica de los recipientes de forma cilíndrica y con similitudes geométricas, fuera igual, por lo tanto, en este caso se usó la ecuación del número de Reynolds para un sistema cilíndrico con una sección circular [23]. El resultado de la velocidad del impulsor fue corroborado usando el modelo de medición con el cual se calcula la velocidad del impulsor.

En los datos de capacidad antioxidante se ve que el parámetro influyente no es el sistema de reacción, ni los parámetros geométricos si no el GH. Pues entre los resultados obtenidos en ambos sistemas, a un mismo GH la capacidad antioxidante no tienen diferencias significativas.

Los productos obtenidos en ambos sistemas de hidrólisis enzimática tienen la misma capacidad antioxidante y se produce en tiempo similares, en el análisis de comparación de medias por la prueba de t-student, no hay diferencias significativas, por lo tanto, el escalado del proceso fue validado experimentalmente.

Conclusiones

- ✓ Se logró determinar un factor de escala entre los dos sistemas de producción de hidrolizados enzimáticos y fue validado con resultados experimentales.
- ✓ La capacidad antioxidante del producto biológico obtenido depende fuertemente del grado de hidrólisis obtenido a las condiciones de pH, temperatura y concentraciones de sustrato y la relación enzima/sustrato establecidas, por lo tanto, la velocidad de agitación y el cambio de escala no afectan esta propiedad.
- ✓ Este trabajo tiene un gran aporte en la producción de este tipo de productos biológicos enzimáticos, en el cual se deja la posibilidad de seguir escalando el proceso a un mayor volumen de producción y lo hace más factible para la industria de aditivos alimentarios.

Agradecimientos

Los autores agradecen al “Comité para el desarrollo de la Investigación” (CODI) a través de su programa de Gestión Tecnológica (PGT) en la convocatoria de “Fondo de Innovación 2016” de la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero entregado para la ejecución del proyecto.

Bibliografía.

- [1]. Burdock, G. A., Carabin, I. G. & Griffiths, J. C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221, 17-27
- [2]. Pellegrini, A. 2003. Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1225-1238.

- [3]. Wanasundara, J., Pegg, R., & Shand, P. Value added applications for plasma proteins from the beef processing industry. Canadian Meat Science Association, (2003) 10-15.
- [4]. Catiau, L., Traisnel, J., Chihib, N. E., Le Flem, G., Blanpain, A., Melnyk, O., Guillochon, D., and Nedjar-Arroume, N. (2011). RYH: a minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides* 32, 1463–1468
- [5]. Wu, Z., Pan, D., Zhen, X., & Cao, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*(93), (2013) 1331-1337.
- [6]. Naso, L., Lezama, L., Valcarel, M., Salado, C., Villacé, P., Kortazar, D. Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of and oxidovanadium (IV) complex with luteoin. *Journal of Inorganic Biochemistry*(157), (2016) 80 - 93.
- [7]. Adoui, F., Boughera, F., Chataigne, G., Chihib, N.-E., El Hameur, H., Dhulster, P. A Simple Method to Separate the Antimicrobial Peptides from Complex Peptic Casein Hydrolysate and Identification of a Novel Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine Alfa-Casein. *International Review of Chemical Engineering*, 5(2), (2013) 179-187.
- [8]. Park, K., & Hyun, C. Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, (2002) 633-638.
- [9]. Salgado, P.R; Fernández, G.B.; Drago, S.R.; Mauri A.N. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 1433-1440
- [10]. DANE (24/8/2016). Encuesta de Sacrificio de Ganado, II trimestre de 2016. Recuperado el 17 de Octubre de 2016, disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/sacrificio/bol_sacrif_IItrim16.pdf
- [11]. Castrillon Franco, D. (2016) Informe: El reto de certificar una planta de beneficio en Colombia. Fedegan-Contexto ganadero.
- [12]. Konieczny et al., 2005, Chau, G., Rojas, G., Bolaños, L. (2009) Producción más limpia y viabilidad de tratamiento biológico para efluentes de mataderos en pequeñas localidades. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 7 (1):102-114.
- [13]. Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), (2000) 79-89.
- [14]. Adler-Nissen, J. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, (1986).
- [15]. Liu, Q., Kong, B., Jiang, L., Cui, X., & Lui, J. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *LWT - Food Science and Technology* (42), (2009) 956 - 962.
- [16]. Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa 2.4 L. *Información tecnológica*, 24, 33-42.
- [17]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*(26), (1999) 1231-1237.

- [18]. Nosotros en review.
- [19]. Banerjee, G., Car, S., Liu, T., Williams, D.L., López, S., Walton, J., Hodge, D. (2011) Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and ethanolic fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 922-931.
- [20]. Palmqvist, B., Kadie, A., Hagglund, K., Petersson, A., Liden, G. (2016) Scale-up of high-solid enzymatic hydrolysis of steam-pretreatment softwood: the effects of reactor flow conditions. *Biomass conv. Bioref* 6: 173-180.
- [21]. Miller, J.N.; Miller, J.C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth Edition. Prentice Hall by Pearson (2010).
- [22]. Seo, H.-W., Jung, E.-Y., Go, G.-w., Kim, G.-D., Joo, S.-T., & Yang, H.-S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry* (185), (2015) 106-111.
- [23]. Pauline M. Doran. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press (2012).