

APROXIMACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO EN MEDIOS DE REACCIÓN ENZIMÁTICOS

Castaño, E^a, Rodríguez, D.S^a, Álvarez, C^b, & Ceballos, A^b. (2021).

^a Estudiante de Ingeniería Bioquímica, Facultad de ingeniería-Dpto. Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Calle 18 No. 122-135 Pance, Cali - Colombia

Abstract

Una de las estrategias más utilizadas para la cuantificación del ácido galacturónico en la hidrólisis de la pectina es el método colorimétrico utilizando como reactivo el m-hidroxifenil, que fue desarrollado por Blumenkrantz y Asboe-Hansen en el año 1973. Sin embargo, la falta de eliminación de subproductos remanentes, es un factor que afecta significativamente la medición de la cantidad del monómero liberado durante la reacción enzimática, pues, por la poca especificidad que presenta el reactivo puede ocasionar su sobreestimación. Además, el uso de ácidos fuertes como ácido sulfúrico concentrado, y temperaturas de reacción elevadas, provocan que la pectina presente en la muestra sufra degradación térmica y química. Por este motivo, se desarrolló una investigación experimental con la finalidad de eliminar las posibles interferencias presentes en los medios enzimáticos, el cual consiste en tratar la muestra a procesar con una relación de etanol 1:2 v/v, adición de sulfato de aluminio al 2,2% p/p, filtración de la solución con 0,2 μm , y por último evaporación total del volumen que posteriormente será restituido al volumen original con agua tipo I. Encontrando que, esta metodología posee alta eficiencia en la remoción de interferencia de pectina, y para la medición de ácidos urónicos como el ácido galacturónico, resulta específica, sensible y precisa para concentraciones entre 5-60 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Pectina; Hidrólisis enzimática; Ácido galacturónico; Metodología de medición.

1. Introducción

El desarrollo de la biotecnología ha propuesto el uso de biocatalizadores proteicos en los procesos industriales, pues estos agentes enzimáticos ofrecen ventajas significativas en comparación con los procesos químicos tradicionales. La catálisis basada en enzimas satisface las demandas de productos altamente selectivos, seguros y sostenibles. Además, funcionan a temperaturas bajas con un rango de operación de 25- 60°C, presiones atmosféricas, condiciones de pH en un rango de 4-8 y medios acuosos (Dominguez De María P., 2021; De la Mata, I. et al, 2014) lo que los convierte en procesos potencialmente escalables, pues ayudan a ahorrar costos y a lograr una mayor sostenibilidad.

Un ejemplo del uso que se le puede brindar a las enzimas en procesos industriales es la obtención de ácido galacturónico. Este monómero es el principal constituyente de la pectina y se distingue por tener diversas aplicaciones como agente bioactivo en la fabricación de

productos farmacéuticos, cosméticos e ingredientes alimentarios (Baciu and Jordening, 2004). Los coctéles enzimáticos más utilizados en estudios para mediar la hidrólisis de la pectina son Viscoenzyme L9, Naturalzyme 40XL, Pectinase-831L (Ghorbanpour et al, 2013; Bélafi-Bakó et al, 2007; Haikel et al, 2006; Kiss et al, 2009) y están conformados por biocatalizadores que se clasifican en tres grupos principales dependiendo de sus mecanismos de acción: enzimas des-esterificantes, enzimas despolimerizantes y liasas (Bélafi-Bako K, et al, 2007).

Autores como, Schimid A. et al, 2001; Santacoloma P. et al, 2011; Truppo M., 2017; Zaks, A., 2001, proponen hacer uso del ciclo de la biocatálisis que consiste en la investigación y selección de los agentes de biotransformación que tienen las mejores cualidades para obtener un proceso productivo económico y viable. no obstante, esta selección debe realizarse de manera sistemática, es por esto que se debe estudiar la cinética, las condiciones de reacción, la información estructural de las enzimas (Mettler-Toledo International, 2021) y reconocer el comportamiento que presenta el coctel enzimático que se está analizando.

El estudio de la cinética se basa en la cuantificación de la liberación de metabolitos como en este caso lo es el ácido galacturónico a través del tiempo, por lo cual, se debe utilizar métodos que permitan monitorear el avance de la reacción y metodologías colorimétricas estandarizadas como la del carbazol, m-hidroxifenil o la combinación de ambas son útiles para cuantificar este monómero, donde la coloración obtenida es proporcional a su concentración. Sin embargo, los reactivos son propensos a presentar interferencia por la poca especificidad y formar complejos colorados con los carbohidratos neutros que conforman la estructura de la pectina, generando dificultades al obtener mediciones fiables por la sobreestimación del producto de interés (Garna H. et al, 2006). Además, es importante mencionar que si la muestra a la que se le realizará la medición presenta pectina en su composición, es probable que esta se hidrolice por la exposición prolongada a temperatura alta y el uso de ácido concentrado, por lo que es necesario remover esta macromolécula y asegurar una medición precisa.

De esta manera, el tratamiento de las muestras es un paso crucial en la estimación correcta del cambio de la concentración del ácido galacturónico y se debe garantizar la eliminación de las posibles fuentes de interferencias que afecten significativamente la medición. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar una metodología reproducible para la cuantificación precisa del ácido galacturónico, que posibiliten la eliminación de moléculas como la pectina remanente y las enzimas utilizadas durante la hidrólisis.

2. Materiales

El D-ácido galacturónico se compró en Sigma Aldrich ® con una pureza de 98,5%, La pectina cítrica fue obtenida por Farmacia Droguería San Jorge ®, con un porcentaje de ácido galacturónico de aproximadamente de 74% y grupos metoxilos del 6,7%. Los químicos como: ácido sulfúrico concentrado al 96%, tetraborato de sodio, ácido sulfámico, agua destilada, m-hidroxidifenol, NaOH y KOH, se caracterizan por ser de grado analítico y el coctel enzimático NaturalEnzyme 40XL fue comprado en Proenzymas S.A.S donde las enzimas son provenientes del hongo *Aspergillus sp.*

2.1 Preparación de los reactivos

Soluciones para medición de ácido galacturónico

Solución de m-hidroxifenol: En un recipiente ámbar se adicionó 150 mg de m-hidroxidifenol en 100 ml de NaOH 0,125 N. La solución se refrigeró a 4 °C.

Solución de ácido sulfámico-sulfamato: se disolvió 3,9 mg de ácido sulfámico en 7 ml de agua y luego se le adicionó KOH saturado para ajustar pH a 1,6. Finalmente se diluyó la solución en 10 ml de agua para obtener una concentración final de 4 M.

Solución de tetraborato de sodio-ácido sulfúrico: Se mezcló 1,501 g de tetraborato de sodio con 90 ml de ácido sulfúrico concentrado. Una vez homogénea la solución, se refrigeró a 4°C.

2.2 Soluciones stock

Solución madre de ácido galacturónico: Se agregó 4 mg de ácido galacturónico en 40 mL de solución tampón citrato-fosfato 0,1 M pH 5, se refrigeró a 4 °C. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento utilizando como solvente agua tipo I.

Solución tampón McIlvaine: Se mezcló 1030ml de solución 0.2M de fosfato disódico con 970ml de la solución de 0.1M de ácido cítrico y se ajustó el pH a 5 con la adición de ácido cítrico.

Preparación del solvente eutéctico profundo y medio de la curva de calibración: En un frasco Schott se agregaron cloruro de colina con glicerol hasta alcanzar una relación molar 1:2. El recipiente se agitó constantemente a 375rpm a una temperatura de 70°C hasta obtener un líquido translúcido. Este se llevó a un calentamiento en horno vacío a 65 °C y 0,08 MPa por 2 horas. Finalmente, la mezcla se enfrió en desecador a temperatura ambiente. Para el medio de la curva de calibración, se disolvió 1mL de solvente colina-glicerol en 9mL de solución tampón McIlvaine y se refrigeró a 4 °C.

2.3 Curvas de calibración para ácido galacturónico

Para desarrollar las curvas de calibración a estudiar en los solventes: buffer citrato fosfato, agua tipo I y solución al 10% v/v de colina-glicerol, en diez tubos Eppendorf de 2 mL, se mezclaron alícuotas de solución madre de ácido galacturónico con una concentración de 100 µg/mL, para conseguir las concentraciones establecidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de diluciones para los puntos de concentración de la curva de calibración.

Concentración final (µg/mL)	SIn madre de ácido galacturónico (µL)	Solvente ^{a, b y c} (µL)
-----------------------------	---------------------------------------	-----------------------------------

0	0	1000
5	50	950
16,625	156	844
26,25	263	738
36,875	369	631
47,5	475	525
58,125	581	419
68,75	688	313
79,375	794	206
90	900	100

^a buffer citrato fosfato, ^b agua tipo I y ^c solución al 10% v/v de colina-glicerol

Adicionalmente, con el fin de conocer el efecto en la reproducibilidad del método de medición al agregar sustancias como la acetona y etanol, se desarrollaron 1 curvas de calibración con 2 réplicas para cada solvente evaluado, manteniendo relaciones de 1:1 v/v acetona y 1:2 v/v etanol, esto se realizó con el fin de asegurar que las muestras presentase el mismo pretratamiento que se le realiza a las alícuotas tomadas de reacciones enzimática. En la elaboración de una de las curvas de calibración, el conjunto de alícuotas fue sometido a un proceso de evaporación total y se restituyó el volumen correspondiente a la muestra. Por último, las muestras fueron cuantificadas con el método establecido por Laurence D. Melton y Bronwen G. Smith en 1998.

2.4 Tratamiento de las muestras

Para eliminar las interferencias de las muestras del medio de reacción, se tomaron 500 μ L del medio de reacción y se adicionó 2,2% p/p de sulfato de aluminio, una vez se disolvieron los cristales, se agregó 1 mL de etanol al 96% y se procedió a filtrar con jeringa de 2 mL y filtro Agilent Nylon de 0,22 μ m. La solución filtrada fue sometida a un proceso de evaporación en un rotaevaporador eppendorf Vacufuge 5305 Plus Concentrator Complete System a una temperatura de 60°C y la configuración V-HV hasta obtener los cristales de ácido galacturónico. Después, se restituyó al volumen original, con 500 μ L de agua tipo I y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

2.5 Medición de la concentración de ácido galacturónico

En microplato de fondo plano se depositó 20 μ L de las muestras tratadas, se adicionó 2 μ L de ácido sulfámico-sulfamato y se realizó reflujó con la micropipeta. Una vez obtenida una solución homogénea se añadieron 240 μ L de tetraborato de sodio-ácido sulfúrico y se mezcló por reflujó. Posteriormente, la muestra se llevó a baño María a 95°C durante 20 min, pasado el tiempo, se incubó en hielo durante 10 min. Finalmente, se adicionó 40 μ L de m-hidroxifenil agente que genera la coloración. Por último, se realizó la lectura por espectrofotometría con ayuda del Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode microplate reader a una longitud de onda de 525 nm (Melton L. & Bronwen G, 2001). El blanco fue procesado de la misma manera que las muestras mencionadas anteriormente, con la diferencia que la solución problema fue agua tipo I y se reemplazó el m-hidroxifenil por hidróxido de sodio.

2.6 Reacción enzimática

Para la hidrólisis de la pectina, se tomaron dos muestras de dos reacciones enzimáticas. En ambas reacciones se utilizaron 10 μL de Naturalzyme 40XL, 10 mL de solución de pectina, manteniendo una relación v/v de 0,012 enzima sustrato y se completó con buffer hasta alcanzar un volumen de 30 mL. Los montajes se realizaron con pH 4,8, tiempo de reacción de 90 minutos y temperatura de 50°C, metodología establecida por Ghitis B. y Sichel S en 2021. Durante la reacción se tomaron diversas muestras que posteriormente fueron analizadas a través de una cromatografía de HPLC.

2.7 Preparación de las muestras para HPLC

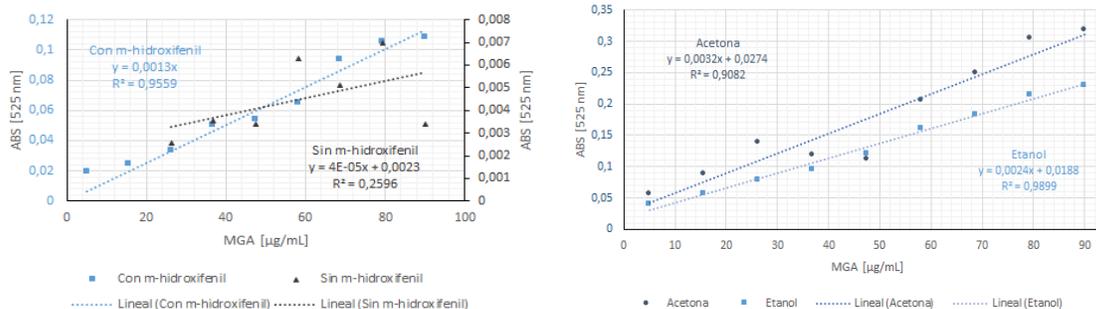
La muestra se mezcló con agua tipo I y se pasó por un filtro de 0,2 μm y se llevó aproximadamente 2 ml a viales de vidrio. Posteriormente, se analizó con UHPLC (Thermo Scientific Ultimate 3000) en una columna de resina Aminex® HPX-87-H (300 mm x 7.8 mm), horno a 60°C, empleando ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil con un flujo de 0,6 ml/min. Se inyectó 20 μL de muestra, con un tiempo de 16 min en cada corrida. Se utilizó un detector de índice de refracción (RI refractomax 520, Japón) a 55°C. El estándar preparado corresponde a ácido galacturónico (Ghitis B. y Sichel S., 2021).

3. Resultados

3.1 Curvas de calibración para ácido galacturónico

En la gráfica 1 se observa la absorbancia de la curva de calibración de 9 puntos donde se empleó la metodología de medición sin hacerle tratamiento a las muestras, esta curva de calibración se realizó empleando la solución tampón McIlvaine, los valores corresponden a las mediciones de absorbancia antes y después de agregar el reactivo colorante m-hidroxifenil.

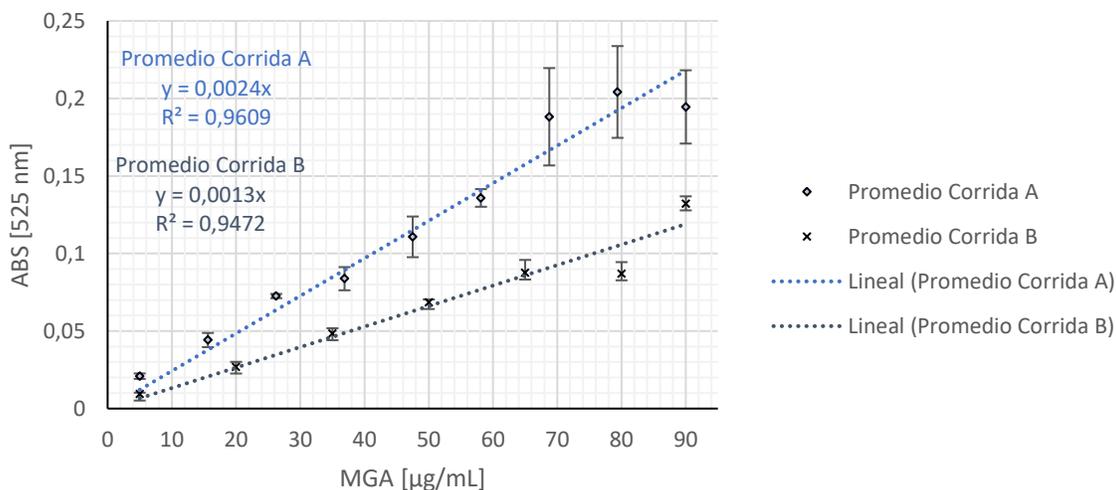
En la gráfica 2 se observa el comportamiento de la absorbancia de la curva de calibración de 9 puntos donde se empleó la metodología de medición y de tratamiento a las muestras, los valores corresponden a la medición final con m-hidroxifenil a los tratamientos de muestra empleando acetona y etanol con solución tampón McIlvaine.



Gráfica 1 y 2. 1) Curva de calibración para las diferentes concentraciones de ácido galacturónico en solución tampón McIlvaine, antes y después de añadir m-hidroxifenil. 2) Curva de calibración para las diferentes

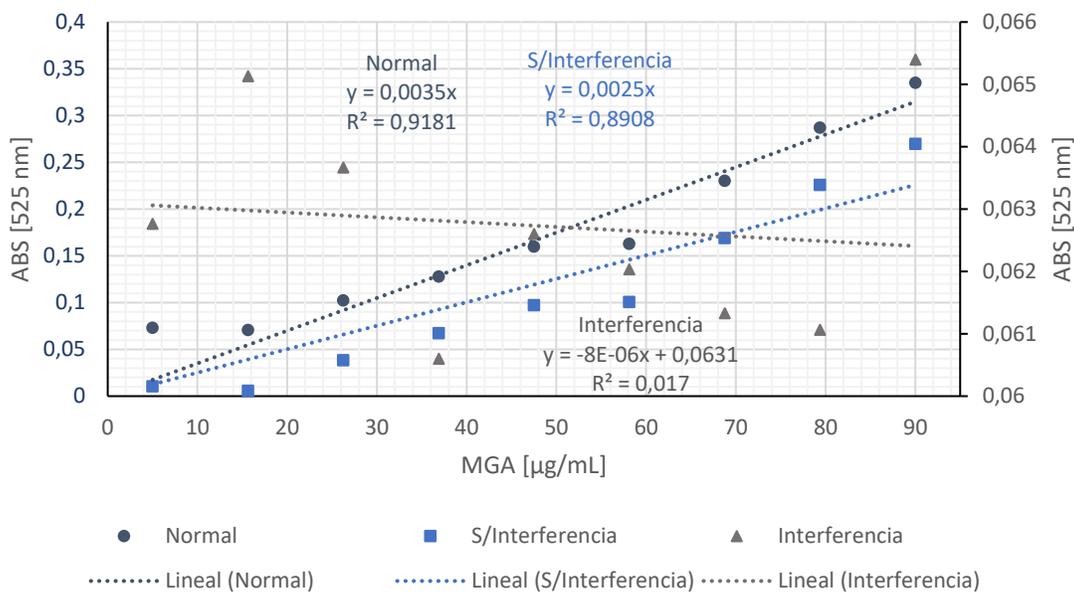
concentraciones de ácido galacturónico con tratamiento de muestras empleando de acetona y etanol con solución tampón McIlvaine.

En la gráfica 3 se observa el promedio del duplicado de la curva de 9 y 7 puntos, corridas A y B, respectivamente, empleando tratamiento con etanol en agua. Adicionalmente, se obtuvo la ecuación de regresión lineal pasando por cero para el promedio de cada corrida, con los respectivos coeficientes de regresión. Se graficaron las desviaciones para cada punto del gráfico.



Gráfica 3. Curvas de calibración para las diferentes concentraciones de ácido galacturónico en agua tipo I, con tratamiento de muestras empleando etanol.

Para la curva con ChCl-Glicerol (DES) al 10% v/v con solución tampón McIlvaine, se graficó la absorbancia antes y después de agregar el reactivo colorante m-hidroxifenil. Se calculó la diferencia entre estos dos valores y se graficó como la absorbancia sin interferencia (S/Interferencia). Así mismo, se obtuvo la ecuación de regresión lineal para cada uno de los conjuntos de datos, como se observa en la gráfica 4.



Gráfica 4. Curvas de calibración para ácido galacturónico en ChCl-Gli 10% v/v en solución tampón McIlvaine teniendo en cuenta la interferencia antes de agregar m-hidroxifenil.

El resumen de las ecuaciones de regresión lineal de los gráficos 1 al 4 se encuentran en la tabla 2 con características de calidad asociadas como coeficiente de correlación, coeficiente de correlación lineal y desviación estándar del conjunto de datos empleados para la generación de las mismas.

Tabla 2. Resumen de las ecuaciones de regresión lineal y características de calidad asociadas de las gráficas 1, 2, 3 y 4.

Curva	Descripción	Pendiente	Intercepto	Coficiente de correlación R^2	Coficiente de correlación lineal R	Desviación estándar promedio S
A	En solución McIlvaine sin tratamiento de muestras	0,0013	0	0,9559	0,9777	
B	En agua tratamiento con etanol (Promedio corrida A)	0,0024	0	0,9609	0,9803	0,0264
C	En agua tratamiento con etanol (Promedio corrida B)	0,0013	0	0,9472	0,9732	0,0086
D	En solución McIlvaine tratamiento con acetona	0,0032	0,0274	0,9082	0,953	

E	En solución McIlvaine tratamiento con etanol	0,0024	0,0188	0,9899	0,9949
F	En solución McIlvaine con ChCl-Glic 10% v/v	0,0035	0	0,9181	0,9582
G	En solución McIlvaine con ChCl-Glic 10% v/v sin interferencia	0,0025	0	0,8908	0,9438

3.2 Reacción enzimática

Se emplearon las curvas A, B y C para la cuantificación por espectrofotometría de ácido galacturónico de la reacción enzimática a 30 y 90 minutos por duplicado, además, se empleó como referencia la medición por cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) para la concentración de ácido galacturónico previamente inactivada a 4 °C, los valores se observan en la tabla 3, de esta forma, se calculó el error porcentual y la diferencia másica absoluta para cada uno con la referencia (HPLC) correspondiente, como se evidencia en la tabla 4.

Tabla 3. Valores de concentración de ácido galacturónico de la muestra enzimática a 30 y 90 minutos por cromatografía líquida de alta afinidad y empleando la curva de calibración A, B y C.

Tiempo [min]	Muestra	Concentración [$\mu\text{g/mL}$]				
		HPLC	Espectrofotometría (curva de calibración)			
			ABS	A	B	C
30	Replica 1	3,7799	0,0147	11,2981	6,1198	11,2981
	Replica 2		0,0137	10,5288	5,7031	10,5288
	Promedio		0,0142	10,9135	5,9115	10,9135
90	Replica 1	4,1677	0,0188	14,4904	7,8490	14,4904
	Replica 2		0,0132	10,1827	5,5156	10,1827
	Promedio		0,0160	12,3365	6,66823	12,3365

Tabla 4. Desviación porcentual, estándar y diferencia másica del método de medición por espectrofotometría con la curva A, B y C con referencia al valor medido por cromatografía líquida de alta afinidad de la tabla 1.

Tiempo [min]	Muestra	Desviación porcentual			Diferencia másica [μg]		
		A	B	C	A	B	C
30	Replica 1	199%	62%	199%	225,55	70,2	225,55
	Replica 2	179%	51%	179%	202,47	57,7	202,47
	Promedio	189%	56%	189%	214,01	63,95	214,01
90	Replica 1	248%	88%	248%	309,68	110,44	309,68
	Replica 2	144%	32%	144%	180,45	40,44	180,45
	Promedio	196%	60%	196%	245,07	75,44	245,07

4. Análisis de resultados

4.1 Curvas de calibración

El efecto que tiene la metodología de tratamiento de muestras puede evidenciarse comparando las gráficas 1 y 2, las cuales están en un medio de reacción convencional como la solución tampón McIlvaine específicamente para reacciones enzimáticas con pectina (Ghorbanpour, Miccio, y Ferrari, 2013). Puede notarse que el rango de absorción de luz a 525 nm es mayor para la curva con tratamiento de muestras, esto se corrobora por la magnitud de las pendientes de las ecuaciones de regresión de la tabla 2. Por otra parte, la curva sin tratamiento de muestras (A), tiene un coeficiente de regresión correlación de $0,95 < 0,98$, referente a la curva con tratamiento de etanol (E). Esta diferencia en la absorbancia puede deberse a la presencia de sales como el sulfato de aluminio, que tiene rendimientos cercanos al máximo ($\approx 99\%$) en precipitar la pectina (Murizia, et al, 2009), pero que en ausencia de pectina es capaz de solubilizarse y no retenerse en el filtrado. No obstante, la curva de calibración B y C muestran un comportamiento variado a pesar de tratarse de las mismas condiciones de medio y de tratamiento de muestras.

Estas diferencias significativas entre las curvas B y C se hacen notorias a medida que aumenta la concentración de ácido galacturónico, esto ha sido explorado por Pérez y colaboradores en 2015, quienes proponen el uso de un rango de 2-20 $\mu\text{g/mL}$ de ácido galacturónico para la medición por espectrofotometría empleando el método de m-hidroxifenil. Además, encontraron que el reactivo tetraborato de sodio en ácido sulfúrico presenta inestabilidad en la reactividad con el m-hidroxifenil posterior a un día de preparación. Lo anterior podría explicar la variabilidad en el comportamiento de lectura en la corrida A y B de la gráfica 3. Cabe destacar que para la curva B que tiene mejor coeficiente de correlación, presenta mayores desviaciones en comparación con C.

Por otra parte, para las curvas A y C, sin y con tratamiento de muestras, respectivamente, presentan la misma ecuación de correlación lineal entre los datos a pesar de que tienen diferentes coeficientes de correlación. Esto podría indicar que el tratamiento de muestras no tiene efectos de interferencia en el aumento de absorción de luz a 525 nm para la metodología de m-hidroxifenil, para la cuantificación de ácido galacturónico. Esto teniendo en cuenta que la curva C presentó menores desviaciones en comparación con su réplica (curva B).

En la elección del solvente más adecuado para el tratamiento de muestras se propone el uso de etanol, dado que este presenta mejor linealidad en comparación con la acetona, lo cual se refleja en el coeficiente de correlación, según la tabla 2. Estos solventes polares cumplen la función de precipitar las enzimas generando cambios estructurales en la morfología de la proteína, sin embargo, es necesario tener en cuenta que a mayor concentración de sales en el medio puede provocar que la estabilidad de la enzima sea menor y pierda actividad hidrolítica, imposibilitando así, la recuperación de las proteínas (Bauer, y Avigad, 1967). Cabe resaltar que el tratamiento de muestras con etanol toma mayor tiempo de evaporación, alrededor de 6 horas, esto debido a que el punto de ebullición de la mezcla es mayor, y por tener una relación volumen:volumen del doble en comparación con la acetona.

En orden de determinar si la elección de solvente para la reacción enzimática afecta la precisión y reproducibilidad del método se empleó ChCl-Gli al 10% con solución McIlvaine, mostrando un rango de absorción de luz de 0-0.35 como se observa en la gráfica 4. Cabe destacar que presentó coloración más pronunciada y amarilla para las muestras con menor cantidad de ácido galacturónico, esto puede deberse a la presencia de glicerol en la reacción de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocasionando un oscurecimiento de la solución y, por ende, alterando la lectura colorimétrica (López, et al, 2017), es por esto que se implementa la medición de absorbancia antes de agregar el reactivo colorante m-hidroxifenil como lo propone Amador en el 2005. En cambio, como se observa en la gráfica 1, teniendo en cuenta esta medición generaría valores negativos para una curva sin interferencia.

4.2 Reacción enzimática

Para validar si el método de tratamiento de muestras y su posterior metodología de medición posee exactitud y practicidad en reacciones enzimáticas, se cuantificó la concentración de ácido galacturónico pasados 30 y 90 minutos de reacción mediante HPLC. Para comparar se empleó la curva A, B y C, las cuales tienen afinidad a la lectura por la composición del medio. La curva A y C poseen la misma pendiente y, por tanto, no presentan diferencia significativa en los valores de comparación. Es necesario precisar que la curva A es la más afín a las muestras, esto debido a que cuenta con el mismo solvente que se empleó para la reacción enzimática. No obstante, pese a que la curva B es la que tiene menor error porcentual con un valor promedio del 60%, la metodología tiene un alto grado de sensibilidad y precisión, puesto que la diferencia másica es en promedio $70\text{ }\mu\text{g}$. Esta diferencia entre el valor obtenido por la curva de calibración B y la lectura por HPLC puede deberse a la no retención de la proteína precipitada en el filtrado, repercutiendo en una variable de interferencia en las lecturas de absorbancia por no estar incluida en la curva de calibración teniendo en cuenta la solución estándar/blanco.

5. Conclusiones

El etanol como solvente para la detención de la reacción enzimática junto con la precipitación parcial de la pectina posee mejores coeficientes de correlación en la generación de la ecuación lineal para la curva de calibración, siendo acorde con la Ley de Beer-Lambert, en comparación con la acetona.

El uso de la metodología de m-hidroxifenil para la medición de ácidos urónicos como el ácido galacturónico, resulta específica, sensible y precisa para concentraciones entre $5\text{-}60\text{ }\mu\text{g/mL}$.

La metodología propuesta en este artículo para la separación del ácido galacturónico de la pectina resulta precisa, y con menores costos asociados en comparación con HPLC.

La combinación de la metodología de separación de ácido galacturónico de pectina aquí propuesta, junto con la metodología de m-hidroxifenil para la cuantificación del mismo tiene potencial para escala laboratorio y se recomienda la implementación de una prueba de análisis estadísticos para validar reproducibilidad del método para futuras aplicaciones a escala industrial.

La metodología de m-hidroxifenil para la cuantificación de ácidos urónicos se ve limitada por los tipos de solventes empleados, solventes alternativos con alta presencia de compuestos

hidrocarbonados presentan alta interferencia por reacciones de oscurecimiento con el ácido sulfúrico a 95 °C.

6. Agradecimientos

De manera grupal deseamos agradecer al auxiliar del almacén de la facultad de Ingeniería Bioquímica, Rubén Darío Manquillo Lasso por su disposición, compromiso y apoyo al proceso de la realización de este proyecto.

Así mismo, expresamos nuestros agradecimientos a nuestros tutores, familiares, amigos cercanos y la universidad como institución, por el apoyo académico, logístico y emocional para la culminación de este proyecto.

7. Bibliografía

Wicker, Louise (1996). [*Progress in Biotechnology*] *Pectins and Pectinases, Proceedings of an International Symposium Volume 14 || Cations increase activity and enhance permeation of pectinesterase in ultrafiltration*, 475–484. doi:10.1016/S0921-0423(96)80277-2

Tullia M.C.C. Filisetti-Cozzi; Nicholas C. Carpita (1991). *Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars*. 197(1), 157–162. doi:10.1016/0003-2697(91)90372-z

Maurizia Seggiani; Monica Puccini; Maurizio Pierini; Samuele Giovando; Cristian Forneris (2009). *Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin*. , 44(3), 574–580. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01849.x

John T. Galambos (1967). *The reaction of carbazole with carbohydrates: I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars*. 19(1), 119–132. doi:10.1016/0003-2697(67)90141-8

Kimberley A. Taylor; Jock G. Buchanan-Smith (1992). *A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid*. 201(1), 190–196. doi:10.1016/0003-2697(92)90194-c

PAUL K. KINTNER III; JEROME P. VAN BUREN (1982). *Carbohydrate Interference and Its Correction in Pectin Analysis Using the m-Hydroxydiphenyl Method*, 47(3), 756–759. doi:10.1111/j.1365-2621.1982.tb12708.x

Haikel Garna; Nicolas Mabon; Katherine Nott; Bernard Wathelet; Michel Paquot (2006). *Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography*, 96(3), 477–484. doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.002

Ghorbanpour Khamseh, Ali Asghar; Miccio, Michele; Ferrari, Giovanna (2013). *OPTIMAL KINETIC PARAMETERS AND BATCH MODELING FOR PECTIN HYDROLYSIS TO GALACTURONIC ACID WITH PECTINEX ULTRA SP-L ENZYME*. *Chemical Engineering Communications*, 200(10), 1334–1346. doi:10.1080/00986445.2012.746673

Itziar Alkorta; Carlos Garbisu; María J. Llama; Juan L. Serra (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. 33(1), 21–28. doi:10.1016/s0032-9592(97)00046-0

Sakai, Takuo (1993). *[Advances in Applied Microbiology] Volume 39 // [Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. , (), 213–294. doi:10.1016/S0065-2164(08)70597-5*

Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., & Gubicza, L. (2007). Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 438-442. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.012>

Neidhart, S., Hannak, C., & Gierschner, K. (1996). Investigations of the influence of various cations on the rheological properties of high-esterified pectin gels. *Progress in Biotechnology*, 583-590. [https://doi.org/10.1016/s0921-0423\(96\)80289-9](https://doi.org/10.1016/s0921-0423(96)80289-9)

Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira Petkowicz, C. (2012). Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.018>

De la Mata, I., Arroyo, M., & Acebal, C. (2014b). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>.

K. Kiss; N. Nemestóthy; L. Gubicza; K. Bélafi-Bakó (2009). Vacuum assisted membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of pectin from various agro-wastes. , 241(1-3), 29–33. doi:10.1016/j.desal.2008.01.055

Ortega N., et al (2004). Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 631–639.

Santacoloma, P. A., Sin, G., Gernaey, K. V., & Woodley, J. M. (2011). Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 203–212. <https://doi.org/10.1021/op1002159>

Truppo, M. D. (2017). Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(5), 476–480. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00114>

Zaks, A. (2001). Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 130–136. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00181-2](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00181-2)

Mettler-Toledo International Inc. all rights reserved. (2021, 7 abril). Biocatálisis. https://www.mt.com/mx/es/home/applications/L1_AutoChem_Applications/fermentation/biocatalysis.html#applications

Domínguez de María, P. (2021). Biocatalysis, sustainability, and industrial applications: Show me the metrics. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 31, 100514. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100514>

De la Mata, I., Arroyo, M., & Acebal, C. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>

Bauer, S., y Avigad, G. (1967). Precipitation of Enzymes and their Stability in High Alcohol Concentrations. *Israel Journal of Chemistry*, Vol: 5, pp:117-120.

López, X., Taramuel, A., Arboleda, C., Segura, F., y Restrepo, L. F. (2017). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars. *Revista Cubana de Química*, Vol:29, No.2.

Ghittis B. y Sichel S., (2021). Evaluación de la producción de ácido galacturónico a partir de biomasa residual de chontaduro (*Bactris Gasipaes*).

Ghorbanpour, A., Miccio, M., y Ferrari, G. 2013. Optimal Kinetic Parameters and Batch modeling for Pectin Hydrolysis to Galacturonic Acid with Pectinex Ultra SP-L Enzyme. *Chemical Engineering Communications*, Vol: 200(10), pp: 1334-1346.

Pérez, M., Suárez, C., González, H., Achong, L., y Borrell, Y. 2015. Validation of the m-hydroxybiphenil method for the quantitation of uronic acid in purified *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides. *Revista Cubana de Farmacia*, Vol: 49 (2), pp: 232-244.

Amador, J. (Ed.). (2005). *Procedures for Analysis of Citrus Products (Vol. 4)*. FMC FoodTech.