



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

**AMILASAS PRODUCIDAS POR MALTEO DE SEMILLAS
DE CEBADA Y FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

GABRIEL VEGA RAMÍREZ

Bajo la supervisión de: SALVADOR VALLE GUADARRAMA, DR.



Chapingo, Estado de México, enero de 2026

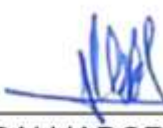


AMILASAS PRODUCIDAS POR MALTEO DE SEMILLAS DE CEBADA Y FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Tesis realizada por **GABRIEL VEGA RAMÍREZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



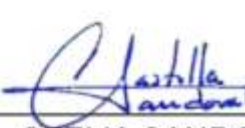
DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESORA:



DRA. BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ
RODRÍGUEZ

ASESORA:



DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA

LECTOR EXTERNO:



DRA. LETICIA GARCÍA CRUZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis.....	3
1.4. Organización de la tesis	3
1.5. Literatura citada	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Cebada	6
2.1.1 Estructura de la semilla	6
2.2 Almidón	7
2.3 Malteo tradicional de cebada	7
2.3.1 Remojo	8
2.3.2 Germinación	8
2.3.3 Secado.....	8

2.4	Amilasas	9
2.4.1	Clasificación	9
2.5	Fuentes de producción de amilasas	10
2.6	Aplicaciones de las amilasas	11
2.7	Fermentación en estado sólido	12
2.8	Métodos de purificación de amilasas	13
2.9	Extracción acuosa en dos fases	14
2.10	Literatura citada	16
3	AMYLASES FROM MALTED BARLEY (<i>Hordeum vulgare</i>) SEEDS SEPARATED BY AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION	20
3.1	Introduction	22
3.2	Materials and methods	24
3.2.1	Plant material	24
3.2.2	Protein and enzymatic activity during germination	24
3.2.3	Binodal diagram	25
3.2.4	Separation of amylases with ATPE	27
3.2.5	Effect of temperature, pH and substrate concentration	28
3.2.6	Kinetic behavior of enzymes	28
3.2.7	Evaluation of variables	30
3.2.8	Molecular weight estimation	30
3.2.9	Data análisis	31
3.3	Results and discussion	32
3.3.1	Starch, protein, and enzymatic activity during germination	32
3.3.2	Binodal phase diagram	35
3.3.3	Characterization of amylase purification	36

3.3.4	Effect of temperature, pH, and substrate concentration	37
3.3.5	Molecular weight of amylases	40
3.4	Conclusions.....	43
3.5	Acknowledgment.....	43
3.6	References	43
4	FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO ASISTIDA POR EXTRACCIÓN BIFÁSICA ACUOSA: UN PROCEDIMIENTO EFICAZ PARA PRODUCIR Y PURIFICAR AMILASAS	51
	Resumen.....	51
4.1	Introducción.....	54
4.2	Materiales y Métodos	55
4.2.1	Microorganismos y condiciones de cultivo	55
4.2.2	Extracción de almidón	56
4.2.3	Fermentación en medio sólido (FES)	56
4.2.4	Separación mediante extracción bifásica acuosa.....	57
4.2.5	Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la actividad amilasa	59
4.2.6	Análisis de electroforesis y zimograma	60
4.2.7	Análisis de datos	60
4.3	Resultados y discusión	61
4.3.1	Fermentación en estado sólido	61
4.3.2	Separación de enzimas mediante sistemas acuosos bifásicos	63
4.3.3	Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la actividad amilasa	66
4.3.4	Análisis de electroforesis y zimograma	68

4.4	Conclusiones.....	69
4.5	Literatura citada	70
5	EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CEBADA	75
	Resumen.....	75
5.1	Introducción.....	77
5.2	Materiales y métodos	78
5.2.1	Productos químicos	78
5.2.2	Material vegetal y extracto enzimático	78
5.2.3	Preparación de las semillas	78
5.2.4	Porcentaje de germinación	79
5.2.5	Preparación de extracto	79
5.2.6	Contenido de almidón	79
5.2.7	Azúcares totales	79
5.2.8	Actividad amilasa	80
5.2.9	Proteína insoluble	80
5.2.10	Análisis estadístico.....	80
5.3	Resultados y discusión	80
5.3.1	Germinación	80
5.3.2	Almidón y azúcares totales	81
5.3.3	Actividad específica	81
5.3.4	Proteína soluble.....	82
5.4	Conclusiones.....	83
5.5	Literatura citada	83
6	CONCLUSIONES GENERALES.....	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de la purificación de amilasas con PEG 2000 y fosfato de potasio.	65
Cuadro 2. Resumen de la caracterización de la germinación de semillas de cebada.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sección longitudinal de una semilla de cebada (izquierda) y capas exteriores (derecha).	6
Figura 2. Formas del almidón.....	7
Figura 3. Efecto catalizador de la α -amilasa endo-activa y de la β -amilasa exo-activa sobre el almidón.....	10
Fig. 4. Starch content (a), protein content (b), and amylase enzyme activity (c) in barley seeds during germination.....	34
Fig. 5. Binodal phase diagram of the PEG 2000 and potassium phosphate system. A, B, ..., F: evaluated biphasic systems.	35
Fig. 6. Effect of temperature (a), pH (b), and substrate concentration (c) on amylase enzyme activity.	40
Fig. 7. Analysis of amylases by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis..	41
Figura 8. Variación de los parámetros fisicoquímicos durante la fermentación.	63
Figura 9. Diagrama binodal para la mezcla de fosfato de potasio y polietilenglicol 2000.....	66
Figura 10. Efecto del pH (a), la temperatura (b) y la concentración de almidón (c) sobre la actividad amilasa.....	67
Figura 11. Relación entre la velocidad de reacción enzimática y la concentración del sustrato.	68
Figura 12. Análisis de las amilasas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y nativa..	69

DEDICATORIA

*Dedicado a mi mamá, Carmen Ramírez Méndez, por el amor
y apoyo incondicionalmente siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado y de integrarme a esta valiosa comunidad académica.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama, mi director, por su apoyo, orientación y confianza, fundamentales para la realización de esta investigación.

A las Doctoras, Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez y Ofelia Sandoval Castilla, por compartir generosamente sus conocimientos y experiencias, que fueron fundamentales durante el desarrollo y culminación de la presente investigación.

A mi familia, por siempre apoyarme y por acompañarme.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por un ambiente ameno y enriquecedor.

A quien realizo este proyecto, por su paciencia, esfuerzo y dedicación en cada etapa de la realización y culminación de este trabajo.

¡GRACIAS!

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre	Vega Ramírez Gabriel
Fecha de nacimiento	febrero de 1993
Lugar de nacimiento	Caxhuacan, Puebla
Profesión	Ingeniero Agroindustrial
Cédula profesional	11910238



FORMACIÓN ACADÉMICA

Maestría	Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

Amilasas producidas por malteo de semillas de cebada y fermentación en estado sólido

Las amilasas son enzimas hidrolíticas de importancia para la industria agroalimentaria, con aplicaciones relevantes en la producción de jarabes, productos de panificación, cervecería y otros derivados del almidón. En el presente trabajo se evaluaron amilasas obtenidas mediante el malteo de semillas de cebada (var. Esperanza) y por fermentación en estado sólido (FES), utilizando *Aspergillus niger* como microorganismo productor. Durante la primera etapa experimental, se llevó a cabo el malteo de las semillas por un periodo de 84 h y se monitoreó la síntesis de proteínas y la actividad enzimática. En la segunda etapa se desarrolló la FES, sobre agrolita impregnada con almidón de cebada, durante 72 h. Las amilasas obtenidas en ambos procesos fueron posteriormente purificadas parcialmente mediante extracción acuosa en dos fases, empleando polietilenglicol 2000 y una mezcla de sales de fosfato de potasio (monobásico y dibásico). La caracterización bioquímica se realizó con la fase superior o polimérica del sistema de extracción. Se evaluó la actividad enzimática en diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de almidón, así como la estimación del peso molecular. Finalmente, se determinó el efecto de las amilasas obtenidas por FES sobre la germinación de semillas de cebada. Durante el malteo, se observó un incremento sostenido tanto en el contenido proteico como en la actividad amilasa, alcanzando valores máximos de 26.73 mg mL⁻¹ y 11.42 UI mL⁻¹ a las 42 h, respectivamente. En la FES, la mayor actividad amilasa (7.42 ± 0.13 UI mg⁻¹) se obtuvo a las 24 h. En ambos casos, las enzimas mostraron preferencia por la fase polimérica del sistema de extracción, con coeficientes de partición enzimática de 2.12 ± 0.01 (malteo) y 3.06 ± 1.06 (FES). Las amilasas sintetizadas de malteo presentaron óptimos de actividad a 40 °C y pH 5, mientras que las de FES lo hicieron a 50 y 60 °C y pH 5 y 6. La aplicación de amilasas exógenas promovió una mayor tasa de germinación, este incremento significativamente de 81.00 ± 2.00 % a 85.67 ± 2.08 %. Se demostró la factibilidad de separar amilasas para su aplicación en el malteo de semillas de cebada.

Palabras clave: amilasas, germinación, fermentación en estado sólido, extracción acuosa en dos fases, caracterización cinética.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Director de Tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

GENERAL ABSTRACT

Amylases produced by malting barley seeds and solid-state fermentation

Amylases are hydrolytic enzymes that are important for the agri-food industry, with relevant applications in the production of syrups, bakery products, beer and other starch derivatives. In this study, amylases obtained by malting barley seeds (var. Esperanza) and by solid-state fermentation (SSF) using *Aspergillus niger* as the producing microorganism were evaluated. During the first experimental stage, seed malting was carried out for a period of 84 h, and protein synthesis and enzymatic activity were monitored. In the second stage, SSF was developed for 72 h, on agrolite impregnated with barley starch. The amylases obtained from both processes were subsequently partially purified by two-phase aqueous extraction using polyethylene glycol 2000 and a mixture of potassium phosphate salts (monobasic and dibasic). Biochemical characterization was performed with the top or polymeric phase of the extraction system. Enzymatic activity was evaluated under different conditions of temperature, pH and starch concentration, and molecular weight was estimated. Finally, the effect of amylases obtained by SSF on barley seed germination was determined. During malting, a sustained increase in both protein content and amylase activity was observed, reaching maximum values of 26.73 mg mL⁻¹ and 11.42 UI mL⁻¹ at 42 h, respectively. In SSF, the highest amylase activity (7.42 ± 0.13 UI mg⁻¹) was obtained at 24 h. In both cases, the enzymes showed a preference for the polymeric phase of the extraction system, with enzyme partition coefficients of 2.12 ± 0.01 (malting) and 1.44 ± 0.02 (SSF). The amylases synthesized from malting showed optimal activity at 40 °C and pH 5, while those from SSF did so at 50 and 60 °C and pH 5 and 6. The application of exogenous amylases promoted a higher germination rate, which increased significantly from 81.00 ± 2.00 % to 85.67 ± 2.08 %. The feasibility of separating amylases for application in barley seed malting was demonstrated.

Keywords: amylases, germination, solid-state fermentation, aqueous two-phase extraction, biochemical characterization

Doctoral Thesis. Graduate Program in Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Thesis director: Dr. Salvador Valle Guadarrama

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Las amilasas son enzimas hidrolíticas que desempeñan un rol fundamental en la escisión del almidón y otros polisacáridos, convirtiéndolos en azúcares más simples, como la glucosa y la maltosa (Choton et al., 2024). Estas enzimas pertenecen al grupo de las glicohidrolasas, actúan sobre los enlaces glicosídicos presentes en los carbohidratos (Patel et al., 2023). Son enzimas de gran valor en diversas industrias, como la cervecera, la panadería, los textiles, los detergentes y la fabricación de jarabes (Far et al., 2020).

La optimización de la producción y el uso de las amilasas, debido a su extensa variedad de usos, continúa siendo un campo de interés constante en la investigación biotecnológica (Ali et al., 2024). En este contexto, se han reconocido y utilizado técnicas naturales de alta eficiencia, como la germinación de semillas y la fermentación en estado sólido (FES) (Somadder et al., 2025; Chang et al., 2025). Los dos procesos suceden espontáneamente en la naturaleza cuando se dan las condiciones ideales de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes. A lo largo de la germinación, las semillas ponen en marcha diversos procesos biológicos que estimulan la producción de amilasas, fundamentales para transformar el almidón (Aljayan et al., 2025). En cambio, la fermentación en estado sólido (FES), que utiliza microorganismos como *Aspergillus niger*, ha probado ser un procedimiento muy eficaz para producir enzimas (Perwez & Asheh, 2024). Asimismo, posibilita el aprovechamiento de desechos agroindustriales o subproductos provenientes del sector agroalimentario, lo cual representa una opción sustentable para la producción enzimática.

En la actualidad, la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales empleados en la industria de alimentos tienen su origen en microorganismos.

Esto se debe a que estos son capaces de generar enzimas con propiedades fisicoquímicas más estables, costos menores y rendimientos elevados (Guerrand, 2018). El interés en encontrar métodos diferentes para concentrar y purificar las enzimas ha aumentado debido a la demanda creciente de estas por parte de los sectores industriales. Para preservar la actividad funcional de las enzimas y asegurar su uso efectivo, es crucial seleccionar el método de purificación.

Los métodos tradicionales para recuperar enzimas, que incluyen la cromatografía, la precipitación por sales, la separación por membranas y la ultrafiltración, requieren de varios pasos y generan gastos operativos elevados (El-Fakharany et al., 2024). Por otro lado, el proceso de extracción acuosa en dos fases ha demostrado ser un método eficaz para purificar biomoléculas, como las enzimas, sin afectar su actividad funcional (Guimarães et al., 2025). Esta técnica se fundamenta en el principio de disolución diferencial entre dos fases líquidas que no se mezclan, las cuales suelen estar formadas por una sal y un polímero. La mezcla se separa espontáneamente en dos fases, cada una con una composición química distinta, lo que posibilita una interacción selectiva con las proteínas y otras biomoléculas de la muestra (Zhu et al., 2025). Esta separación se lleva a cabo según las características fisicoquímicas de las proteínas, como su carga, tamaño y afinidad hacia los componentes de cada fase (Guo et al., 2025). En este trabajo, se busca producir amilasas a través del malteo de semillas de cebada y fermentación en estado sólido, para luego ser purificadas utilizando un sistema acuoso bifásico compuesto por polietilenglicol 2000 y sales de fosfato de potasio. Asimismo, conocer las características cinéticas de ambas enzimas y evaluar el efecto de las amilasas sintetizadas por FES sobre la germinación de cebada. En este contexto, el presente trabajo se llevó a cabo con los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Evaluar y comparar la capacidad hidrolítica de amilasas producidas a través del malteo de semillas de cebada y fermentación en estado sólido (FES), mediante

su caracterización bioquímica y parámetros cinéticos, e identificar la fuente enzimática más adecuada para su aplicación en procesos agroindustriales, como la producción de malta.

1.2. Objetivos específicos

- Producir amilasas mediante malteo de semillas de cebada y fermentación en estado sólido.
- Aplicar la metodología de extracción acuosa en dos fases para concentrar y purificar parcialmente las amilasas.
- Evaluar la actividad, cinética y estabilidad de las amilasas en diferente pH, temperatura y concentración de almidón.
- Determinar los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) y el peso molecular de las amilasas.
- Evaluar el efecto de las amilasas sobre el proceso de germinación de semillas de cebada.

1.3. Hipótesis

La incorporación de enzimas exógenas, producidas por fermentación en estado sólido, al proceso de germinación de semillas de cebada tiene el potencial de optimizar la tasa y calidad de germinación, acelerar la conversión de nutrientes y mejorar el rendimiento de los procesos agroindustriales posteriores, como el malteado.

1.4. Organización de la tesis

Este trabajo se estructuró de la siguiente manera: el primer capítulo corresponde a la introducción general, el segundo capítulo a la revisión de literatura, el tercer capítulo comprende la producción, purificación parcial y caracterización de amilasas del malteo de semillas de cebada, el cuarto capítulo aborda la producción, purificación parcial y caracterización de amilasas de fermentación en

estado sólido y en el quinto capítulo se evaluó el efecto de las amilasas obtenidas del proceso de fermentación, sobre la germinación de semillas de cebada.

1.5. Literatura citada

- Ali, Z., Abdullah, M., Yasin, M. T., Amanat, K., Sultan, M., Rahim, A., & Sarwar, F. (2024). Recent Trends in Production and potential applications of microbial amylases: A comprehensive review. *Protein Expression and Purification*, 106640. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106640>
- Aljayan, L. N., Astatkie, T., Erickson, S., Cantrell, C. L., & Zheljaskov, V. D. (2025). Effect of 11 essential oils on seed germination, radicle development, and seedling growth in wheat and barley. *Journal of Agriculture and Food Research*, 101944. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101944>
- Chang, Y., Chen, H., & Jiao, Y. (2025). Improvement in textural, structural and digestive characteristics of maize gruel using malt amylase obtained by germination and ultrasonic extraction. *LWT*, 117576. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117576>
- Choton, S., Bandral, J. D., Singh, J., Bhat, A., Sood, M., Gupta, N., Reshi, M., & Kaur, D. (2024). Enzymatic Modification of Starch: a review. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 10(01), 1–8. <https://doi.org/10.36348/sjmps.2024.v10i01.001>
- El-Fakharany, E. M., Saleh, A. K., El-Maradny, Y. A., El-Sayed, M. H., Alali, I., Alsirhani, A. M., Alalawy, A. I., Alhawiti, A. S., Alatawi, I. S., Mazi, W., & El-Gendi, H. (2024). Comprehensive insight into recent algal enzymes production and purification advances: Toward effective commercial applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137783. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137783>
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase production: Progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350–358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>
- Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes. In *Elsevier eBooks* (pp. 487–514). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805419-2.00026-5>
- Guimarães, M. B., Helbourn, C. C. B. R., Pereira, J. F. B., & Magalhães, P. O. (2025). Production, extraction, and purification of L-asparaginase from *Penicillium sizovae*: aqueous biphasic systems as an effective pre-concentration strategy. *Separation and Purification Technology*, 378, 134547. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.134547>
- Guo, X., Xie, W., Hu, H., Gu, F., Chen, F., Guo, X., Jiao, B., & Wang, Q. (2025). Quality characteristics and structure-function relationships of peanut proteins from different phase sources by aqueous enzymatic extraction. *Food Chemistry*, 144163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144163>

- Patel, A. K., Dong, C., Chen, C., Pandey, A., & Singhania, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Elsevier eBooks* (pp. 25–57). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-19059-9.00019-0>
- Perwez, M., & Asheh, S. A. (2024). Valorization of Agro-Industrial waste through Solid-State Fermentation: Mini Review. *Biotechnology Reports*, 45, e00873. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>
- Somadder, P. D., Trzcinski, A., Chen, G., Chow, Y., & Manan, M. A. (2025). Fermentation of sorghum with *Aspergillus* strains: A promising and sustainable pathway to enzyme production- comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 213, 115456. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.115456>
- Zhu, Y., Li, M., Yang, M., Xu, J., Ren, M., Zhao, Z., Wang, L., Yang, J., Liu, J., & Zhang, M. (2025). Extraction of walnut protein using deep eutectic solvent aqueous two-phase system: Investigation of structural and functional properties. *Food Chemistry X*, 102546. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102546>

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea anual, perteneciente a la familia de las poáceas o gramíneas, es un cereal de gran importancia agrícola y agroindustrial, sin embargo, solo el 2 % de la producción mundial se destina al consumo humano, mientras que la mayor parte, el 98 %, se destina a la alimentación animal y al malteado (Gebre et al., 2025).

2.1.1 Estructura de la semilla

La semilla de cebada está compuesta por diversas capas de tejido protector, entre las que se encuentran una cáscara exterior, el pericarpio y la testa, que rodean al embrión y a un gran endospermo amiláceo. Este último contiene un escutelo, que es un cotiledón modificado, y actúa como separación entre el embrión y el endospermo.

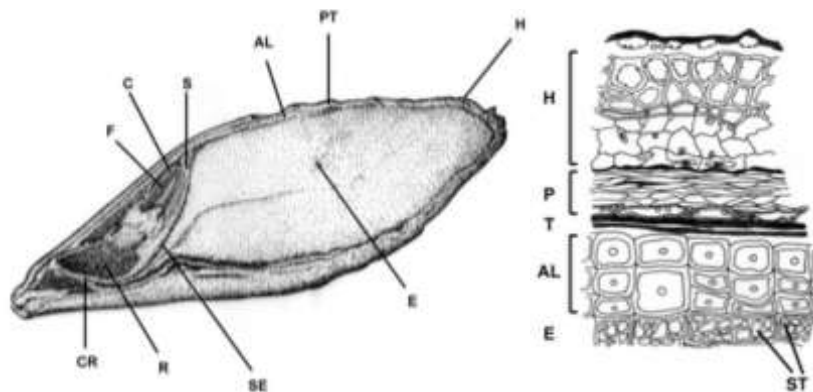


Figura 1. Sección longitudinal de una semilla de cebada (izquierda) y capas exteriores (derecha). **Izquierda:** coleóptilos (C), brote foliar (F), coleorhiza (CR), raíz (R), escutelo (S), células epiteliales escutelares (SE), cáscara (H), pericarpio-testa (PT), capa de aleurona (AL) y endospermo amiláceo (E). **Derecha:** capas exteriores de la semilla, cáscara (H), pericarpio (P), testa (T), células de la aleurona (AL), endospermo amiláceo (E) y granulos de almidón (ST) (Delcour y Hosney, 2010).

Desde la perspectiva de la industria cervecera, el endospermo es la estructura de mayor interés, ya que almacena los nutrientes esenciales de la semilla que son extraídos para alimentar y promover el crecimiento de la levadura durante la fermentación (Delcour y Hoskeney, 2010; Feng et al., 2024).

2.2 Almidón

El almidón, clasificado como un polisacárido, es una de las cuatro principales moléculas biológicamente activas, junto con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Tiene dos formas, la amilosa, un polímero lineal que tiene principalmente subunidades de glucosa unidas en enlaces α -1, y la amilopectina, que tiene como base, unidades de glucosa enlazados con α , 1-4, que tienen ramificaciones α , 1-6 enlazadas cada 24-30 subunidades (Hör & Gastl, 2025).

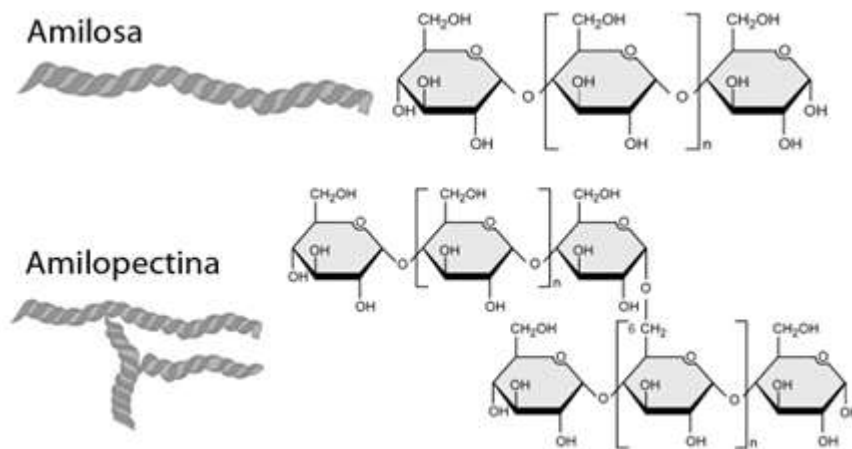


Figura 2. Formas del almidón (Bertoft, 2017).

2.3 Malteo tradicional de cebada

El malteo es un proceso que aprovecha la germinación natural de las semillas de cebada para transformarlas en semillas más frágiles y accesibles al almidón, facilitando así su uso en la elaboración de cerveza. Este proceso implica la degradación controlada de los componentes de la pared celular del endospermo, lo que permite liberar los gránulos de almidón y activar el desarrollo de enzimas hidrolíticas esenciales para la fermentación (Rani et al., 2025). Este proceso consta de varias etapas:

2.3.1 Remojo

El objetivo es introducir agua al interior de la semilla, hasta alcanzar un contenido de humedad óptima de 40-45 %. Este nivel de humedad es un valor de equilibrio, pues es el punto en el que la presión hidrostática en la célula es igual a la presión osmótica generada por la savia celular. Es importante que la humedad penetre hasta el centro de la semilla, dado que la difusión es el mecanismo por el que esto ocurre y es un proceso lento (Almaguer et al., 2024).

2.3.2 Germinación

Cuando el remojo finaliza, se escurre el agua y se colocan las semillas en lechos de 2 cm de altura para que germine, se mantienen a humedad y temperatura controlada durante 4 a 5 días. Desde el punto de vista fisiológico, la germinación es el proceso por el que comienza a formarse una nueva planta, con la formación de raicillas y el acrospire. Cuando la nueva planta comienza a desarrollarse, un gran número de enzimas se sintetizan (α -amilasa) o se activan (β -amilasa). Las enzimas hidrolíticas y proteolíticas comienzan a degradar los componentes de la pared celular y la matriz proteica, lo que aumenta la accesibilidad de los gránulos de almidón para las enzimas hidrolizadoras del almidón. Este proceso se conoce como modificación del endospermo (De Schepper & Courtin, 2024).

2.3.3 Secado

La semilla germinada resultante se denomina malta verde, se seca gradualmente mediante un flujo de aire caliente a temperatura creciente, proceso conocido como secado al horno. Tiene por objetivo detener el crecimiento, un producto estable al almacenamiento y desarrollar el sabor y el color característicos de la malta. Uno de los principales retos del secado es eliminar la humedad de la malta verde y producir un sabor deseable sin perder demasiada actividad enzimática, necesaria en el proceso de elaboración de la cerveza (Rani & Whitcomb, 2024).

2.4 Amilasas

Son un grupo de enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces 1-4 del glucógeno y el almidón, liberando con ello unidades de glucosa. Estas enzimas son producidas por animales, plantas y microorganismos, como bacterias y hongos filamentosos (Patil et al., 2021).

2.4.1 Clasificación

2.4.1.1 Hidrolasas endo-activas

Comprenden un grupo de enzimas con dos características comunes: la retención de la configuración anomérica del grupo hidroxilo en los átomos C₄ y C₁ en el extremo no reductor de las dextrinas y los oligosacáridos recién formados, respectivamente, y un endo-mecanismo de ataque a las moléculas derivadas del almidón en los residuos de glucosa de las partes interiores. La hidrolasa de acción endo más conocida es la enzima α -amilasa (EC 3.2.1.1) que hidroliza los enlaces α ,1-4 en la parte interior del polímero de almidón de forma aleatoria (Figura 3), lo que lleva a la formación de oligosacáridos lineales y ramificados, o dextrinas α -limitadas (Ali et al., 2024).

2.4.1.2 Hidrolasas exo-activas

Incluyen un grupo de enzimas con un mecanismo exo que actúan sobre los extremos no reductores de las cadenas de polímeros de almidón y el glucógeno (Figura 3). Algunas de estas enzimas exo poseen capacidad de inversión cambiando la configuración anomérica del grupo hidroxilo en la posición C₄ de α a β y, por tanto, dando lugar a oligosacáridos con configuración β . Según su capacidad de inversión, estas enzimas pueden agruparse en dos grupos, el primero comprende las β -hidrolasas de acción exógena (β -, EC 3.2.1.2) y glucoamilasa, también llamada amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3), que liberan β -maltosa y β -glucosa respectivamente. Por su parte, el segundo grupo comprende las α -hidrolasas de acción exógena, formadas por la α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) y la α -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), que liberan glucosa y maltosa en su

α -configuración respectivamente y las amilasas que producen productos específicos de maltodextrina (Ali et al., 2024).

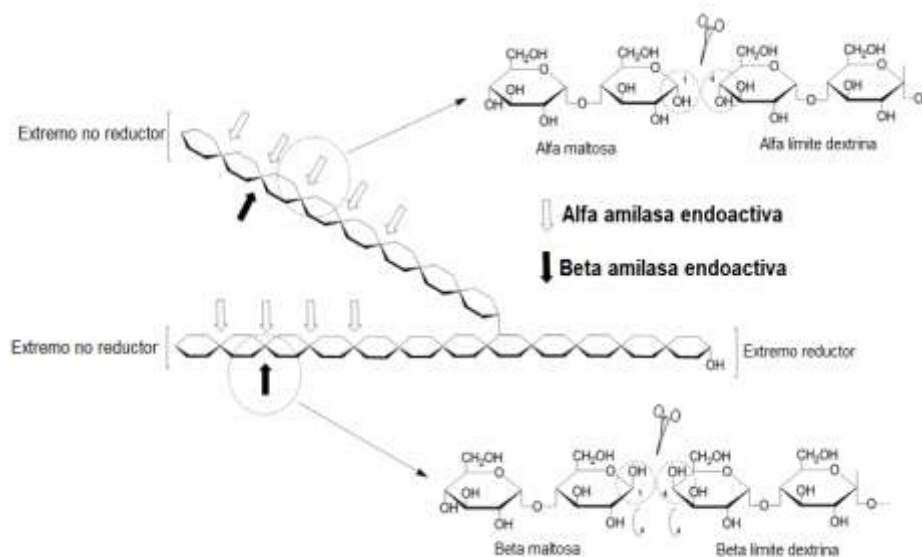


Figura 3. Efecto catalizador de la α -amilasa endo-activa y de la β -amilasa exo-activa sobre el almidón (Ramesh & Rosell, 2017).

2.5 Fuentes de producción de amilasas

Las plantas, los animales y los microorganismos son capaces de producir enzimas fisiológicamente activas. La germinación de las semillas es un proceso natural en el que se sintetizan amilasas, sin embargo, las amilasas microbianas son preferidas en la industria debido a su fácil aislamiento, rentabilidad y estabilidad en condiciones adversas. En los últimos años, la investigación se ha centrado en la producción microbiana de amilasas, ya que las especies bacterianas tienen una alta tasa de multiplicación, lo que acelera la producción de estas enzimas. Comparadas con los animales y las plantas, las bacterias y los hongos son más fáciles de manejar, requieren menos espacio y son más económicos. Además, las especies bacterianas pueden ser modificadas con facilidad mediante ingeniería genética u otros métodos. La producción óptima de amilasas se puede lograr mediante la mejora de cepas, mutaciones y otras modificaciones genéticas, lo que permite una mayor eficiencia en su obtención (Ali et al., 2024).

Entre las bacterias, las especies de *Bacillus* son ampliamente conocidas por la producción de amilasas. Especies como *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* son conocidos por ser buenos productores de alfa amilasa. Otras especies que se han explorado para la producción de la enzima son *B. cereus* y *B. subtilis* (Agrawal, 2024).

Los hongos filamentosos se han utilizado ampliamente para la producción de amilasas. Al ser prolíficos productores de proteínas extracelulares, son ampliamente explotados para la producción de diferentes enzimas, incluidas las alfa amilasas. Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* han sido los más empleados para la producción de α -amilasa. La producción de enzimas por fermentación en estado sólido utilizando estos microorganismos se convirtió en una técnica de producción rentable (Mageed et al., 2022).

2.6 Aplicaciones de las amilasas

El principal mercado de las amilasas (hidrolasas) reside en la conversión de hidrolizados de almidón (glucosa, jarabes, glucosa cristalina, jarabes de maíz de alta fructosa, jarabes de maltosa o reducción de su viscosidad), aunque las industrias panificadora y cervecera también son significativas (Ali et al., 2024).

- Industria alimentaria

Estas enzimas pueden emplearse para sustituir a aditivos químicos como el bromato de potasio, prohibido en varios países. Las amilasas pueden degradar el almidón y producir dextrinas, que permite que la levadura trabaje continuamente durante la fermentación de la masa y la fase inicial de la cocción. El resultado es una mejora del volumen del pan y de la textura de la miga (Mabrouk et al., 2024).

- Fermentación

Las α -amilasas pueden convertir el almidón presente en los cereales en azúcares fermentables en alcohol etílico. La bioconversión del almidón en etanol implica la

licuefacción y la sacarificación, donde el almidón se convierte en azúcar utilizando un microorganismo amilolítico o enzimas como la α -amilasa, seguida de la fermentación, en la que el azúcar se convierte en etanol mediante un microorganismo fermentador de etanol, como la levadura *Saccharomyces* (Matias et al., 2025).

- Industria de detergentes

La incorporación de enzimas en las formulaciones de detergentes mejora su capacidad para eliminar manchas persistentes, además de contribuir a que el producto sea ecológicamente más seguro. Las amilasas son el segundo tipo de enzimas más utilizado en la fabricación de detergentes enzimáticos (Gupta et al., 2023).

2.7 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es una tecnología que ha ganado relevancia en los últimos años. Es un proceso biotecnológico en el que se cultivan microorganismos sobre un sustrato sólido y húmedo, sin la presencia de agua libre (Barreto et al., 2025), se divide en tres etapas: aguas arriba, intermedio y aguas abajo (upstream, midstream y downstream). La fase upstream incluye el pretratamiento y esterilización del sustrato, la preparación del medio de cultivo y el inóculo microbiano. En la fase midstream, se lleva a cabo la fermentación en estado sólido, durante la cual los microorganismos se incuban con el sustrato y se monitorean diversas condiciones de pH, temperatura, humedad y flujo de aireación para optimizar el proceso. Finalmente, en la fase downstream, el producto formado se extrae, se purifica y se envasa para su posterior uso (Perwez & Asheh, 2024). La fermentación en estado sólido (FES) se prefiere frente a la sumergida debido a su menor consumo de energía, menor riesgo de contaminación, la simplicidad de la maquinaria, menor formación de efluentes, mayor producción volumétrica y una mayor concentración del producto. Sin embargo, la transferencia de masa y calor en el sustrato sólido representa un desafío importante cuando se trata de escalar el proceso.

2.8 Métodos de purificación de amilasas

La purificación de las amilasas es una fase crucial en el uso industrial de la enzima, ya que mejora su actividad y estabilidad. Para garantizar su pureza sin pérdida de funcionalidad, se han desarrollado diferentes métodos, entre los cuales están:

2.8.1.1 Precipitación con sulfato de amonio

Es el método más utilizado para la purificación preliminar de las amilasas. Se basa en las diferencias en la solubilidad de las proteínas en soluciones salinas; con la adición gradual de sulfato de amonio a un extracto enzimático crudo, así, las proteínas pueden precipitarse a niveles de saturación definidos (Kaur et al., 2024).

2.8.1.2 Filtración y ultrafiltración

Permite separar las amilasas de partículas grandes o contaminantes celulares. La ultrafiltración usa membranas semipermeables para separar las enzimas en función de su tamaño molecular. Es un método no destructivo, sin embargo, no se logra una purificación completa, ya que puede haber contaminantes residuales (Dai et al., 2025).

2.8.1.3 Centrifugación

Permite separar las amilasas de otros componentes celulares mediante la aplicación de fuerzas centrífugas. Es un método rápido y eficaz para separar las células o los residuos grandes de las enzimas, sin embargo, debe combinarse con otros métodos para lograr una purificación total (Isabel & Premalatha, 2025).

2.8.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

Utiliza columnas cargadas que atrae y retiene moléculas con carga opuesta a medida que la solución pasa a través de ella. La amilasa se retiene en la columna y luego se eluye utilizando un gradiente de sal. Permite la purificación de amilasas

basadas en su carga iónica, con una buena resolución, sin embargo, requiere de equipamiento especializado y suele ser costoso (Zhong et al., 2024).

2.9 Extracción acuosa en dos fases

El método de extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) se ha establecido como un procedimiento eficiente, asequible y respetuoso con el medio ambiente para la purificación parcial de biomoléculas, particularmente las enzimas. Se fundamenta en la formación espontánea de dos fases líquidas acuosas que no se mezclan, por lo general mezclando polímeros hidrosolubles, como el polietilenglicol (PEG), con sales inorgánicas, como el fosfato de potasio, o con otros polímeros, bajo condiciones específicas de concentración, el peso molecular, el tipo de sal, pH y temperatura (Zhang et al., 2025). Esta separación suave mantiene la actividad de las enzimas y resulta particularmente interesante para enzimas sensibles, como las amilasas (Segaran & Chua, 2024). La necesidad de técnicas rentables y eficaces para la purificación de enzimas ha impulsado numerosos estudios que utilizan ATPE para su purificación, haciendo uso de las características fisicoquímicas específicas de estas proteínas, tales como la carga superficial, el peso molecular y la afinidad con elementos poliméricos.

Varios estudios han probado la efectividad del sistema ATPE para extraer amilasas de diversas procedencias biológicas. Santos et al. (2020) realizaron estudios utilizando amilasas extracelulares de *Aspergillus niger*, basado en sistemas con PEG (4000 y 6000 g mol⁻¹) y Li₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ o Na₂SO₄ a pH 6.5 y 25 °C. Encontraron que los sistemas formados por (NH₄)₂SO₄ y PEG 4000 presentaron el mejor resultado de coeficiente de partición enzimática (3.421) y una recuperación teórica del 80.35 %. Las fuentes vegetales también han sido estudiadas con éxito. Mediante un sistema formado por etanol y citrato de sodio, Girón-Orozco et al. (2023) consiguieron separar α-amilasa y β-amilasa a partir de semillas de triticale germinada con 30 % de alcohol y 18 % de citrato de sodio. Consiguieron una recuperación enzimática de α-amilasa predominantemente en la fase inferior y β-amilasa en la fase superior.

Algunos de los factores fundamentales que afectan la eficacia de estos sistemas son el pH del medio, la concentración y el tipo de sal, el peso molecular y la concentración del polímero, así como la relación entre volúmenes de fase y la temperatura en ciertos. Estos elementos tienen un impacto directo en el coeficiente de partición de la enzima, además de influir sobre su estabilidad estructural y funcional a lo largo del proceso (Yang et al., 2025). En términos generales, se ha observado que la mayor parte de las amilasas tienden a repartirse principalmente en la fase rica en PEG, según su naturaleza hidrofílica o hidrofóbica y las condiciones del sistema.

Una ventaja importante de ATPE es que es compatible con condiciones suaves que no desnaturalizan las enzimas, lo cual posibilita la recuperación de proteínas activas. Asimismo, la técnica tiene la ventaja de ser escalable con facilidad y de tener costos operativos más bajos y tiempos de procesamiento reducidos en comparación con los métodos convencionales, como es el caso de la cromatografía (Zhang et al., 2025).

Desde un enfoque mecanístico, las interacciones termodinámicas complejas determinan cómo se comporta la partición de las amilasas en ATPE. El coeficiente de partición, que señala la afinidad relativa de una enzima por una fase determinada, está afectado por factores como el efecto *salting-in* o *salting-out* de las sales presentes, la fuerza iónica y la alteración del estado de hidratación proteica debido a los polímeros. Además, el pH es relevante porque tiene el potencial de cambiar la carga neta de la enzima y, por ende, su comportamiento en el sistema (Zhang et al., 2025).

En relación con las tendencias actuales, se nota un interés cada vez mayor por emplear ATPE en procesos integrados de biorrefinería, utilizando esta tecnología con desechos agroindustriales o plantaciones alternativas (Santos et al., 2023). Además, se están creando sistemas más sustentables que emplean disolventes reciclables o polímeros biodegradables, lo que aumenta la capacidad de la técnica para ser amigable con el medio ambiente (Álvarez et al., 2024). En el ámbito de la investigación, se están utilizando modelos matemáticos y

simulaciones con el fin de prever cómo las proteínas se comportan en ATPE, para disminuir la cantidad de pruebas empíricas extensivas que se requieren (Xu et al., 2025).

2.10 Literatura citada

- Agrawal, R. (2024). Production of Microbial Enzymes. In: Textbook of Industrial Microbiology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-9582-6_11
- Ali, Z., Abdullah, M., Yasin, M. T., Amanat, K., Sultan, M., Rahim, A., & Sarwar, F. (2024). Recent Trends in Production and potential applications of microbial amylases: A comprehensive review. *Protein Expression and Purification*, 106640. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106640>
- Almaguer, C., Kollmannsberger, H., Gastl, M., & Becker, T. (2024). Influence of the malting conditions on the modification and variation in the physicochemical properties and volatile composition of barley (*Hordeum vulgare* L.), rye (*Secale cereale* L.), and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) malts. *Food Research International*, 196, 114965. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114965>
- Álvarez, M. S., Deive, F. J., Rodríguez, A., & Longo, M. A. (2024). Designing biodegradable aqueous biphasic systems for the selective separation of enzymes. *Separation and Purification Technology*, 353, 128508. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.128508>
- Barreto, M. S., De Castro, A. M., Santos, A. F. D., Kachrimanidou, V., Koutinas, A. A., & Freire, D. M. G. (2025). Solid-state fermentation to produce proteases and amylases and their application in nutrient medium production. In *Elsevier eBooks* (pp. 259–281). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-27624-8.00016-6>
- Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy*, 7 (56), 237-346. [10.3390/agronomy7030056](https://doi.org/10.3390/agronomy7030056)
- Dai, S., Eyles, A., Li, C., Wu, Q., & Close, D. C. (2025). Isolation and structural characterization of a novel β -fructan with potent α -amylase inhibitory activity from *Polygonatum multiflorum*. *Carbohydrate Polymers*, 124307. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124307>
- De Schepper, C. F., & Courtin, C. M. (2024). Reassessing the importance of barley starch and amylolytic enzyme properties in malting and brewing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(6). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70069>
- Delcour J. & Hoskeney R. (2010). Principles of Cereal Science and Technology. 3 ed. AACC Internacional. EEUU.

- Feng, Q., Zhang, S., Lin, J., Yang, J., Zhang, Y., Shen, Q., Zhong, F., Hou, D., & Zhou, S. (2024). Valorization of barley (*Hordeum vulgare* L.) brans from the sustainable perspective: A comprehensive review of bioactive compounds and health benefits with emphasis on their potential applications. *Food Chemistry*, 460, 140772. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140772>
- Gebre, B. A., Zhang, X., Kinki, A. B., Ma, M., Mekonnen, S. A., Sui, Z., & Corke, H. (2025). Enzymatic susceptibility of barley starch and its impact on starch structure. *Food Hydrocolloids*, 111868. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111868>
- Girón-Orozco, D., Mariezcurrena-Berasain, M. D., Aguilar, O., Ramírez-Dávila, J. F., & Heredia-Olea, E. (2023). Recovery of amylolytic enzymes from triticale malt (X. *Triticosecale* Wittmack) using two-phase aqueous systems. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2468244/v1>
- Gupta, N., Paul, J. S., & Jadhav, S. K. (2023). Biovalorizing agro-waste 'de-oiled rice bran' for thermostable, alkalophilic and detergent stable α -amylase production with its application as laundry detergent additive and textile desizer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128470>
- Hör, S., & Gastl, M. (2025). Starch properties of field-grown malting barley under variable weather: Interpreting results in light of controlled-environment studies. *Journal of Cereal Science*, 104261. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2025.104261>
- Isabel, J. B., & Premalatha, M. (2025). Harnessing amylase producing novel bacterial strains from industrial waste: A bioprocessing and optimization approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 322, 146769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146769>
- Kaur, L., Singh, R., Suttee, A., & Raish, M. (2024). Purification, characterization and molecular docking studies of analogous alpha amylase inhibitor compounds. *Journal of King Saud University - Science*, 36(11), 103521. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103521>
- Mabrouk, S. B., Hmida, B. B. H., Sebii, H., Fendri, A., & Sayari, A. (2024). Production of an amylase from newly *Bacillus* strain: Optimization by response-surface methodology, characterization and application with a fungal lipase in bread making. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138147. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138147>
- Mageed, B. a. E., Ali, S., Hammouda, O., & Raslan, M. (2022). Optimization of α -amylase enzyme activity produced by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. *Egyptian Journal of Chemistry*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.136372.6188>
- Matias, S., Del Pilar Fernández-Gil, M., Simón, E., Vázquez-Polo, M., Miranda, J., Navarro, V., Lasa, A., & Bustamante, M. Á. (2025). Impact of gluten, alcohol, original extract and batch variation on FODMAP and ATI levels in

- beer: a comparative study of Spanish macrobreweries' beers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 147, 108094. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108094>
- Patil, A. G., Khan, K., Aishwarya, S., Padyana, S., Huchegowda, R., Reddy, K. R., Pais, R., Alrafas, H., Dsouza, R., Madhavi, J., Yadav, A. N., Raghu, A. V., & Zameer, F. (2021). Fungal amylases and their industrial applications. In *Fungal biology* (pp. 407–434). https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_11
- Perwez, M., & Asheh, S. A. (2024). Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. *Biotechnology Reports*, 45, e00873. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>
- Ramesh, R. & Rosell, C. (2017). Microbial Enzyme Technology in Food Applications. Taylor & Francis Group. 2a ed. EEUU.
- Rani, H., & Whitcomb, S. J. (2024). Integrative LC-MS and GC-MS metabolic profiling unveils dynamic changes during barley malting. *Food Chemistry*, 463, 141480. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141480>
- Rani, H., Standish, A., Walling, J. G., & Whitcomb, S. J. (2025). Development and quality assessment of low-cost benchtop malting protocol for laboratory-scale barley (*Hordeum vulgare* L.) malt quality evaluation. *Journal of Cereal Science*, 104138. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2025.104138>
- Santos, B. S., De Carvalho Batista Muniz, I., Sampaio, V. S., Gandolfi, O. R. R., Veloso, C. M., Da Costa Ilhéu Fontan, R., & Bonomo, R. C. F. (2023). Thermodynamics of textile dyes partitioning in Alcohol-Based aqueous Two-Phase systems. *Chemical Engineering & Technology*, 46(10), 2239–2244. <https://doi.org/10.1002/ceat.202200409>
- Santos, K. a. D., Da Costa Ilhéu Fontan, R., Santos, L. S., De Carvalho Batista, I., Gandolfi, O. R. R., De Sousa Castro, S., Sampaio, V. S., Veloso, C. M., & Bonomo, R. C. F. (2020). Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 94, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.028>
- Segaran, A., & Chua, L. S. (2024). Review of recent applications and modifications of aqueous two-phase system for the separation of biomolecules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 276, 133856. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133856>
- Somadder, P. D., Trzcinski, A., Chen, G., Chow, Y., & Manan, M. A. (2025). Fermentation of sorghum with *Aspergillus* strains: A promising and sustainable pathway to enzyme production- comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 213, 115456. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.115456>
- Xu, Z., Da, X., Qu, J., Luo, B., & Lin, Q. (2025). Optimization of Synchronous Extraction of Polysaccharides and Polyphenols from *Brasenia schreberi* via Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase System: Modeling, Structural

- Characterization, and Antioxidant Properties. *LWT*, 118403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118403>
- Yang, Z., Wang, J., Wang, H., Xie, H., Zhang, Y., & Wang, M. (2025). Simultaneous extraction and purification of polysaccharides and proteins from *Pleurotus ostreatus* using an aqueous two-phase system. *Journal of Food Science*, 90(1). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17674>
- Zhang, X., Han, M., Han, S., & Zong, W. (2025). Aqueous two-phase system (ATPS): from basic science to applications. *RSC Advances*, 15(12), 9041–9054. <https://doi.org/10.1039/d4ra08232j>
- Zhong, L., Wang, P., Jiang, M., Zheng, Y., Xu, X., Ye, X., Huang, Y., Ji, Y., Cui, Z., & Li, Z. (2024). Synergistic action of novel maltohexaose-forming amylase and branching enzyme improves the enzymatic conversion of starch to specific maltooligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 347, 122753. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122753>

3 AMYLASES FROM MALTED BARLEY (*Hordeum vulgare*) SEEDS SEPARATED BY AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION

Abstract

Germination promotes the production of amylases, making seeds at such stage a source of these enzymes. The objective was to separate amylases from malted barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds by aqueous two-phase extraction to facilitate their use in industrial processes. The germination of barley seeds was monitored, showing an increase in protein and enzymatic activity up to maximum values at 42 h, coinciding with a reduction in starch from 63.68 to 48.45 %. A mixture of potassium phosphate (PP) and polyethylene glycol 2000 (PEG 2000) was studied to separate amylases by aqueous two-phase extraction. The mixture of 22.03 % PP and 17.29 % PEG 2000 was chosen, which allowed the enzymes to be recovered in the top polymeric phase, with a yield of 63.92 % and a purification factor of 5.82. The enzyme activity was influenced by temperature, pH, and starch concentration, with maximum values of 1.57, 1.81, and 0.98 U mL⁻¹ at 40 °C, 5.0, and 0.5 %, respectively. The kinetic activity of the amylolytic enzymes was expressed through a Michaelis-Menten model and the effect of inhibition by substrate was discussed. The feasibility of separating amylases from barley germinated seeds through aqueous two-phase extraction was demonstrated parameters for subsequent application in agro-industrial sector.

Key words: *Hordeum vulgare* L., aqueous two-phase extraction, amylases, barley, germination.

Doctoral Thesis. Graduate Program in Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Thesis director: Dr. Salvador Valle Guadarrama

Article accepted in: Revista Mexicana de Ingeniería Química

Resumen:

La germinación promueve la producción de amilasas, haciendo las semillas en este estado una fuente de estas enzimas. El objetivo fue separar amilasas de semillas malteadas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante extracción acuosa en dos fases y así facilitar su uso en procesos industriales. Se monitoreó la germinación de semillas de cebada y se encontró incremento en proteína y actividad enzimática hasta valores máximos a 42 h, coincidiendo con una reducción en almidón de 63.68 a 48.45 %. Se usó una mezcla de fosfatos de potasio (FP) y polietilenglicol 2000 (PEG 2000) para separar amilasas mediante extracción acuosa bifásica. Con un sistema que incluyó 22.03 % de FP y 17.29 % de PEG 2000, se consiguió la recuperación de enzimas en la fase superior con rendimiento de 63.92 % y factor de purificación de 5.82. La actividad de la enzima se afectó por temperatura, pH y concentración de almidón, con valores máximos de 1.57, 1.81 y 0.98 U mL⁻¹ a 40 °C, 5.0 y 0.5 %, 45 respectivamente. La actividad cinética de la enzima se expresó por medio de un modelo de Michaelis-Menten y se discutió el efecto de la inhibición por sustrato. Se demostró la factibilidad de separación de amilasas de semillas de cebada germinada mediante extracción acuosa en dos fases.

Palabras clave: *Hordeum vulgare* L., amilasas, cebada, extracción acuosa en dos fases, germinación.

3.1 Introduction

Malting is an ancient process, dating back thousands of years (Evans et al., 2024), which takes advantage of a germination process to transform hard grains such as barley into brittle grains with the starch accessible for beer production (Rani et al., 2025). Malting proceeds in three stages, including soaking to ensure water uptake by grains; germination that induces embryo growth, synthesis of enzymes, and partial degradation of the endosperm; and drying, commonly in oven, to stabilize the enzymatic activity of the grain, as well as to induce flavor characteristics and some phytochemical alterations (Polachini et al., 2023; Rani et al., 2025; Yang et al., 2021). During germination, grains secrete and mobilize hydrolytic enzymes, including amylases and proteases, involved in the breakdown of proteins and starch, to produce amino acids and sugars (Lekjing & Venkatachalam, 2020).

Amylases are hydrolytic enzymes that break down the glycosidic bonds in starch molecules, the main component of cereal seeds (Robles-Arias et al., 2025). In addition to their importance in beer brewing (Rani et al., 2025), they have applications in other processes, such as detergent production (Gupta et al., 2024), the paper industry (Abdel-Nasser et al., 2022), the textile industry (Mushtaq et al., 2024), the baking industry (Godoy-Ramirez et al., 2024; Pismag et al., 2023), and wastewater treatment (Gupta et al., 2024). Therefore, there is interest in obtaining amylases based on the malting process, for use in various industrial processes, which involves, on the one hand, developing the typical procedure of soaking, germination, and oven drying (Gu et al., 2025) and, on the other hand, separating the enzymes produced using an appropriate technique.

Some enzyme purification methods include salting-out precipitation (Abo-Kamer et al., 2023), isoelectric point precipitation (Ladjal-Ettoumi et al., 2024), ion-exchange chromatography (Phetlum & Champasri, 2023), and ultrafiltration. These methods often need to be combined, as in the case of ammonium sulfate precipitation, where subsequent filtration is required to recover the target enzymes (Shirodkar et al., 2020). The costs associated with multi-step purification processes can be high and can represent a considerable proportion of total

production costs (Rao & Haseena, 2024). Therefore, there is a need to explore alternative methods for enzyme purification.

Aqueous two-phase extraction (ATPE) has potential for enzyme separation, which has been shown in several studies. Zhu et al. (2024) and Singla and Sit (2023) separated papain using systems with aqueous solutions of polyethylene glycol and sodium citrate and polyethylene glycol mixed with ammonium or sodium sulfate, respectively. Likewise, Hasan and Al-Ani (2022) separated peroxidase from corn cobs using a system with aqueous solutions of polyethylene glycol 6000 and ammonium sulfate. Similarly, Šalić et al. (2023) used biphasic systems containing ethanol and potassium phosphate to separate lipases.

The aqueous two-phase extraction procedure can, in a single step, separate compounds of interest and address their concentration by non-thermal methods (Rodríguez-Herrera et al., 2023). The method uses aqueous mixtures with two immiscible polymers (polyethylene glycol, dextran) or a salt and a polymer (Khan et al., 2019) where, depending on the composition, two immiscible phases are formed and, derived from a salting-out phenomenon, the compounds of interest are distributed between the two phases, thus achieving separation (Gomes et al., 2017).

This work focused on the separation of amylases from barley grains using their production from a malting process as a basis. With a similar objective, Girón-Orozco et al. (2023) demonstrated the separation from germinating triticale seeds, but they also found that, depending on conditions such as pH, the enzymes can be obtained from one phase or another of the system, so it is not possible to generalize, and the procedure must be investigated for each plant material and each system. Based on these elements, the work aimed to separate amylases from malted barley grains by aqueous two-phase extraction, to promote their use in industrial processes.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Plant material

Seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.), variety Esperanza, from Calpulalpan, Tlaxcala, Mexico (19°35'19.2" N 98°34.183' W; 2580 meters above sea level) were used. The seeds were cleaned of impurities such as stones, floral remains, ear fragments, and other grains, packed in polyethylene bags sealed under vacuum, and stored at -10 °C until use.

3.2.2 Protein and enzymatic activity during germination

A batch of 500 g of barley seeds was disinfected through immersion for 5 min in a solution with 0.5 % (v/v) of sodium hypochlorite, at 1:3 (w/v) ratio. Successive rinses with distilled water were applied until reaching a pH of 7.0 to remove hypochlorite residues, which was assisted by a potentiometer (HI8424, Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, USA). A malting procedure was applied and began with immersion of seeds in distilled water at 25 ± 1 °C in a polyethylene tray, at 1:3 (w/v, seed/water) ratio, for 36 h, with liquid changes every 12 h, until the plant material reached 42 % moisture content, determined with a thermobalance (Ohaus, New Jersey, USA). Excess of water was drained, and the seeds were distributed in polyethylene trays forming a 2 cm deep layer and incubated at 25 ± 1 °C for germination. Samples of 30 g were taken every 6 h for 84 h, which were dried by lyophilization (Labconco Corp., Model 7755040, USA). A portion of the sample was subjected to starch content determination with the procedure described by Bahdanovich et al. (2022), supported by a soluble starch standard curve of 1-10 mg mL⁻¹ and with results reported as percentages. The remaining portion was ground during 30 s in a food processor (NutriBullet, CA., USA), with a 20 mM buffer of sodium phosphate (1:5, w/v) pH 6.9, and 6.7-mM sodium chloride, tempered at 4 °C. The mixture was centrifuged (Ohaus, New Jersey, USA) at 4 °C and 18,947×g during 15 min. The supernatant was again centrifuged under the same conditions for 5 min. The supernatant was recovered and identified as extract, which was subjected to determination of protein content

and amylase enzyme activity using the procedures described in the "Evaluation of variables" section. The entire procedure was performed in triplicate.

3.2.3 Binodal diagram

To prepare an aqueous two-phase extraction process, a binodal diagram was developed. A 40 % (w/v) aqueous solution of polyethylene glycol 2000 (PEG 2000) was prepared and also a 40 % (w/v) solution that contained 72 % dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) and 28% monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4). Deionized water was used as solvent. To identify the concentrations corresponding to the binodal curve, the two-stage cloud point procedure described by Rodríguez-Salazar and Valle-Guadarrama (2020) was followed. Batches of five grams of the PEG 2000 solution were weighed in 70 mL Pyrex® tubes, and the phosphate mixture was added dropwise until a cloudy appearance was observed. Subsequently, water was added drop by drop until clarity was obtained, the phosphate mixture addition was repeated until turbidity, and so on. The mixture was weighed at each stage of turbidity or clarity with using analytical balance (Ohaus, New Jersey, USA). The procedure was repeated, starting with 5 g of the phosphate mixture, followed by PEG 2000 and deionized water, alternating, until turbidity or clarity were observed, respectively.

Mass balance routines (Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2020) were applied to determine the concentrations of PEG 2000 and potassium phosphate at each turbidity or transparency state with Equations (1) and (2), where $x_{F,i}$ and $y_{P,i}$ were concentrations (%) of potassium phosphate and PEG 2000 in an i th-mixture, $x_{F,i-1}$ and $y_{P,i-1}$ were concentrations (%) of potassium phosphate and PEG 2000 in an anterior mixture ($i - 1$), while $x_{F,0}$ and $y_{P,0}$ were concentrations (%) of the components in the original solutions. Likewise, w_F , w_P , and w_H were masses of mixture of phosphates, PEG 2000, and water added in the i th-stage. Finally, m_{i-1} was the mass of a previous ($i - 1$) mixture. The entire procedure was performed in triplicate.

$$x_{F,i} (\%) = \frac{\left(\frac{x_{F,i-1}}{100}\right)(m_{i-1}) + \left(\frac{x_{F,0}}{100}\right)(w_F)}{m_{i-1} + w_F + w_P + w_H} * 100 \quad (1)$$

$$y_{P,i} (\%) = \frac{\left(\frac{y_{P,i-1}}{100}\right)(m_{i-1}) + \left(\frac{y_{P,0}}{100}\right)(w_P)}{m_{i-1} + w_F + w_P + w_H} * 100 \quad (2)$$

The values of $x_{F,i}$ and $y_{P,i}$ were graphed and formed a binodal curve that separated monophasic conditions and biphasic conditions. In addition, a tie-line was drawn with the method described by Hernández-Rodríguez et al. (2025). Briefly, binodal data of $x_{F,i}$ y $y_{P,i}$ were handled with non-linear regression using the Sigma Plot software (SPSS, 2000) and fitted to Equation (3) (Merchuk et al., 1998), where x_{bin} and y_{bin} were binodal concentrations (%) of potassium phosphate and PEG 2000, respectively, while k_1 (%), k_2 , ($\%^{-0.5}$) and k_3 ($\%^{-3}$) were regression parameters.

$$y_{bin} = k_1 \exp(k_2 (x_{bin})^{0.5} - k_3 (x_{bin})^3) \quad (3)$$

The experimental binodal states with the lowest (x_F^{min}) and highest (x_F^{max}) average potassium phosphate concentrations were identified. Thereafter, Equation (3) was used to determine the corresponding concentrations with the highest (y_P^{max}) and lowest (y_P^{min}) PEG 2000 values. Subsequently, states A (x_F^{min} , y_P^{max} ; % w/w) and B (x_F^{max} , y_P^{min} ; % w/w) were used to draw an experimental tie line, on which four states were identified and labeled as C, D, E, and F, respectively. The systems were prepared with the corresponding concentrations of PEG 2000 and potassium phosphate and were left to stand for 24 h. Biphasic systems were formed, with top (t) and bottom (b) phases, which were separated, and their volumes (V_t and V_b , respectively) were determined with a graduated cylinder. Thus, the volume ratio (V_r , dimensionless) was calculated with Equation (4) for each state.

$$V_r = \frac{V_t}{V_b} \quad (4)$$

The method described by Carranza-Gomez et al. (2025) was applied to find a state with equal volume partitioning ($V_r = 1$). To do this, data of volume of top phases (V_t) and the concentration of PEG 2000 (y_p) of states C, D, E, and F, were handled with linear regression and Equation (5) was fitted. Additionally, data of volume of bottom phases (V_b) and the concentration of potassium phosphate (x_F) of the same states were fitted to Equation (6), where k_4 , k_5 , k_6 , and k_7 , were regression constants.

$$V_t = k_4 + k_5 y_p \quad (5)$$

$$V_b = k_6 + k_7 x_F \quad (6)$$

Equations (5) and (6) were equated and generated Equation (7). In addition, the concentrations of x_F and y_p were subjected to linear regression and Equation (8) was obtained, where k_8 and k_9 were regression constants. Equations (7) and (8) were simultaneously solved and the condition where volumes of the top and the bottom phases were equal was determined, which was denoted as Z ($x_F^{V_r=1}$, $y_p^{V_r=1}$).

$$y_p = \left(\frac{k_6 - k_4}{k_5} \right) + \left(\frac{k_7}{k_5} \right) x_F \quad (7)$$

$$y_p = k_8 + k_9 x_F \quad (8)$$

3.2.4 Separation of amylases with ATPE

Aqueous biphasic systems were prepared with the concentrations of potassium phosphate and PEG 2000 corresponding to state Z. Samples of 0.1 g of germinated and freeze-dried (42 h) barley were added in 10-g batches. Mixtures were vortexed (Cole-Parmer, Illinois, USA), allowed to stand for 30 min at 25 ± 1 °C, and centrifuged (Ohaus, New Jersey, USA) for 15 min at $18,947 \times g$ to aid phase formation (Carranza-Gomez et al., 2025). The phases of systems were separated, the volume of each phase was measured, and the volume ratio was

determined with Equation (4). The separated phases were placed in vials, lyophilized (Labconco Corp., Model 7755040, USA), and subjected to evaluation of protein content and amylase enzyme activity, with the methodologies described in the “Evaluation of variables” section. The protein partition coefficient (k_p ; Equation 9) and enzymatic activity partition (k_e ; Equation 10) were determined, as well as the separation yield (R , %; Equation 11) and the purification factor (F_p ; Equation 12) (Panajotova et al., 2017), where $c_{p,t}$ and $c_{p,b}$ were concentrations of protein in top (t) and bottom (b) phases, A_t and A_b were enzymatic activity in them, respectively, while AE_t and E_T were the specific activities in the top phase and the total enzyme, respectively.

$$k_p = \frac{c_{p,t}}{c_{p,b}} \quad (9)$$

$$k_e = \frac{A_t}{A_b} \quad (10)$$

$$R = \frac{100}{(V_r k_e)^{-1} + 1} \quad (11)$$

$$F_p = \frac{AE_t}{E_T} \quad (12)$$

3.2.5 Effect of temperature, pH and substrate concentration

The effects of temperature (30-80 °C, pH 6.9, 1 % soluble starch), pH (3-8, 37 °C, 1 % soluble starch), and starch concentration (0.3-1.5 % (m/v), pH 6.9, 37 °C) on the activity of the ATPE-separated amylase enzyme were evaluated using Z-state conditions on the tie line. These evaluations were simultaneously conducted.

3.2.6 Kinetic behavior of enzymes

The relationship between the enzymatic activity and the starch concentration was characterized through a kinetics model (Nelson & Cox, 2009; Verlaine et al., 2024). The initial rate of starch degradation (V_0) by the action of the amylase enzyme was evaluated using starch at concentrations ($[S]$) of 0.3 (16.65 mM), 0.4

(22.20), 0.5 (27.75), 0.75 (41.63), 1.0 (55.51), and 1.5% (83.26 mM). The mixture was incubated at the optimal temperature and pH conditions during 4 min, and the enzymatic activity (A) or the initial starch consumption rate (V_0 ; $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ or U mL^{-1}) was indirectly evaluated through the production of D-glucose with the Equation (13), where c_g , c_g^f and c_g^0 were D-glucose concentration (mM) at the end (f) and the start (0; assumed equal to zero), and Δt was the reaction time (4 min).

$$A \text{ or } V_0 = -\frac{d[S]}{dt} \cong +\frac{d[c_g]}{dt} \cong \frac{c_g^f - c_g^0}{\Delta t} \quad (13)$$

It was hypothesized that the starch consumption rate can be affected by the increment of starch concentration. Thus, a substrate inhibition type model was used with the form of Equation (14) (Verlaine et al., 2024), where V_{max} was maximum reaction rate ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ or U mL^{-1}), K_M was the Michaelis constant (mM), and k_i (mM) was the inhibition by substrate constant. The starch concentration was again indirectly evaluated through D-glucose concentration.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (14)$$

Based on results of the evaluation of temperature and pH effects, the value of V_{max} was estimated. Thereafter, K_M and K_i were evaluated with the nonlinear least squares algorithm (lsqnonlin.m function) available in the Matlab® Optimization Toolbox (The Mathworks Inc., 2008), which was applied with the syntax shown in Equation (15), where the variable lb stipulated that the search parameters could not be negative, and the empty bracket indicated that there was no upper limit set for p(1) and p(2). In addition, the routine was developed considering, as options, a maximum number of iterations of 2000 and a minimum tolerance in the function of 1×10^5 .

$$\begin{aligned} S &= [\text{data of starch concentration}]; V_{exp} = [\text{data of } V_0]; \% p(1) = K_M, \\ p(2) &= K_i \\ \text{model} &= @(p,S) V_{max} .* S ./ (p(1) + S + (S.^2 ./ p(2))); \end{aligned} \quad (15)$$

```

fun = @(p) model(p,S) - Vexp; p0 = [Kmo Kio]; lb = [0, 0]; ub = [];
opts = optimoptions('lsqnonlin','Display','iter');
[p_opt] = lsqnonlin(fun, p0, lb, ub, opts); Km_opt = p_opt(1); Ki_opt =
p_opt(2);

```

3.2.7 Evaluation of variables

The protein content was determined in extracts obtained at different germination times and in the different systems evaluated on the tie line. One hundred microliters of sample reacted with 1900 μL of Bradford (1976) reagent. The mixture was vortexed (Cole-Parmer, Illinois, USA) for 10 s and subsequently the absorbance was measured at 595 nm with a spectrophotometer (DR 500 UV-vis HACH, USA). Results were expressed as protein concentration through a standard curve of bovine serum albumin prepared in the range of 0.1 to 1 mg mL^{-1} .

The enzyme activity was evaluated in the extracts obtained at different times of germination and in the states evaluated on the tie line. The procedure described by Miller et al. (1960) was implemented with modifications. A mixture with 300 μL of sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.9, and 6.7 mM NaCl), 300 μL of sample, and 150 μL of 1 % (w/v) soluble starch was incubated during 10 min at 37 °C. To interrupt the reaction, 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) was added in quantity of 750 μL and boiling was applied in a bath for 5 min. The mixture was cooled, and the absorbance was measured at 540 nm with spectrophotometer (DR 500 UV-vis HACH, USA). Data were analyzed with the aid of a D-glucose standard curve (0.1- 1 mg mL^{-1}) and the Equation (13), where Δt was equal to 10 min and the enzymatic activity (A) was expressed in units per mL (U mL^{-1}), defining one unit of amylase activity as the amount of enzyme that produced one micromole of D-glucose per min under the evaluated conditions.

3.2.8 Molecular weight estimation

SDS-PAGE electrophoresis was performed as indicated by Laemmli (1970) to evaluate the molecular weight of the amylases enzymes. The sample obtained at 42 h of germination and top and bottom phases of ATPE systems performed with

the Z concentrations state were analyzed. The system consisted of biphasic gels. The stacking phase was a 3 % polyacrylamide gel, while the resolving phase was a 12 % polyacrylamide gel. Two hundred microliters of each sample were mixed with 600 µL of rupture solution (0.062 M Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, and 0.05 % bromophenol blue). Boiling was applied during 5 min and 20 µL of the mixture was injected into each lane of the gel. The procedure was performed in a vertical electrophoresis chamber (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at constant voltage of 90 V for the stacking gel and 110 V for the resolving gel for 1 h. The gel was removed from the electrophoresis chamber and stained for 1 h with a solution composed of Coomassie blue G-250 (0.1 %, w/v), methanol (40 %, v/v), acetic acid (10%, v/v), and deionized water (49.9 % v/v). Thereafter, destaining for 1 h with a solution composed of methanol (40 % v/v), acetic acid (10 % v/v), and deionized water (50 % v/v) was performed. A molecular weight standard (Thermo Fisher Scientific, Catalog No. 26616, Waltham, USA) of 10 to 170 kDa was taken as reference.

3.2.9 Data análisis

The experimental organization was conducted with completely randomize, with germination time, states on binodal phase diagram, and conditions of temperature, pH, and substrate concentration, as variation factors, respectively. Analyses of variance were performed with data of each experiment, together with treatment means comparison routines, using the Tukey test, using a significance level of 0.05. All the tests were performed in triplicate. The goodness of fit of Equations (3), (5), (6), (8), and (15) was evaluated with the determination coefficient (r^2), defined in the form of Equation (16) (Madadi et al., 2013), where X_{exp} represents experimental data, X_{mod} data estimated by the model, and X_{mean} the mean value. In this regard, As r^2 results closer to unity the fitting of data to the model is considered adequate.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_1^n (X_{exp} - X_{mod})^2}{\sum_1^n (X_{exp} - X_{mean})^2} \quad (16)$$

3.3 Results and discussion

3.3.1 Starch, protein, and enzymatic activity during germination

The barley seed presented starch content of 63.68 % (± 0.17) and during germination the concentration of this polysaccharide decreased rapidly in the first 42 h and then stabilized at an average value of 48.45 % (± 0.26) (Fig. 4a). The decrement of starch content during germination has been reported for other cereal grains, although Edleman et al. (2025) indicated that such phenomenon is a function of temperature. Sofi et al. (2023) pointed out that germination promotes hydrolysis of starch in the endosperm of the seeds. Although the case of β -amylase is scarcely documented, it has been reported that α -amylase, the most common amylolytic enzyme, catalyzes the hydrolysis of α -(1,4) glycosidic bonds in starch polymers, causing its depolymerization (Wang et al., 2022).

Furthermore, germination causes swelling and some level of gelatinization in starch granules, which disrupts their ordered structure (Zheng et al., 2024). Therefore, starch content decreases during germination (Kaur et al., 2024), as does amylase activity. However, only 25% of the total available starch content is utilized (Van de Velde et al., 2025) and is subsequently used for seedling development (Li et al., 2023).

Protein content increased consistently with germination time, from an initial value of 10.46 mg mL⁻¹ to a maximum of 26.73 mg mL⁻¹ at 42 h. However, a decrement to 18.20 mg mL⁻¹ was observed upon completion of 84 h of the process (Figure 1b). The increase in protein content is a phenomenon that accompanies the germination of a seed (Xie et al., 2025). In this regard, the increase in protein occurs because the seed synthesizes proteases, lipases, and amylases for the hydrolysis of storage reserves, such as hordeins, hordenines, starch, and lipids, which provide energy to the embryo for the development of a new plant (Alu'datt et al., 2019; Jones, 2005; Obadi et al., 2021).

Consistently, the activity of the amylase enzyme increased significantly during the first 42 h of germination, from an initial value of 4.17 U mL^{-1} , reaching a maximum value of 11.42 U mL^{-1} , and then decreasing to a value of 4.93 U mL^{-1} at 84 h of the process (Figure 1c), which was consistent with the variation in starch content. On this basis, the conditions of 42 h and 25°C were chosen as adequate to conduct the germination process of barley seeds.

On the other hand, the evaluation of the enzymatic activity used an immersion procedure in a mixture of a sodium phosphate buffer and sodium chloride at 4°C , followed by homogenization in a domestic blender for 30 s, which was like the procedure applied by Posoongnoen et al. (2025). When immersion milling of a solid sample is performed to extract enzymes, the mechanical process and the medium conditions can have both positive and negative effects on the enzymatic proteins. In principle, milling breaks down cell walls, membranes, and the extracellular matrix, increasing the availability of intracellular enzymes and facilitating their solubilization in the buffer. It also increases the surface area, promoting contact between the solid and the buffer, thus improving extraction efficiency. Furthermore, the disruption of the compartmentalized structure can favor enzyme separation and activity. However, negative effects can occur, such as frictional heating resulting from the prolonged mechanical action. However, if the temperature does not exceed 40°C , protein denaturation cannot be considered a significant factor. In this case, the mechanical treatment was applied at 4°C for only 30 s, as the germinated seeds were in a freeze-dried state and milled easily. On the other hand, the mechanical effect caused by the food processor blades can cause mechanical stress and high turbulence, which could induce loss of protein structure. However, this same turbulence and the resulting heating led to better imbibition of the freeze-dried material.

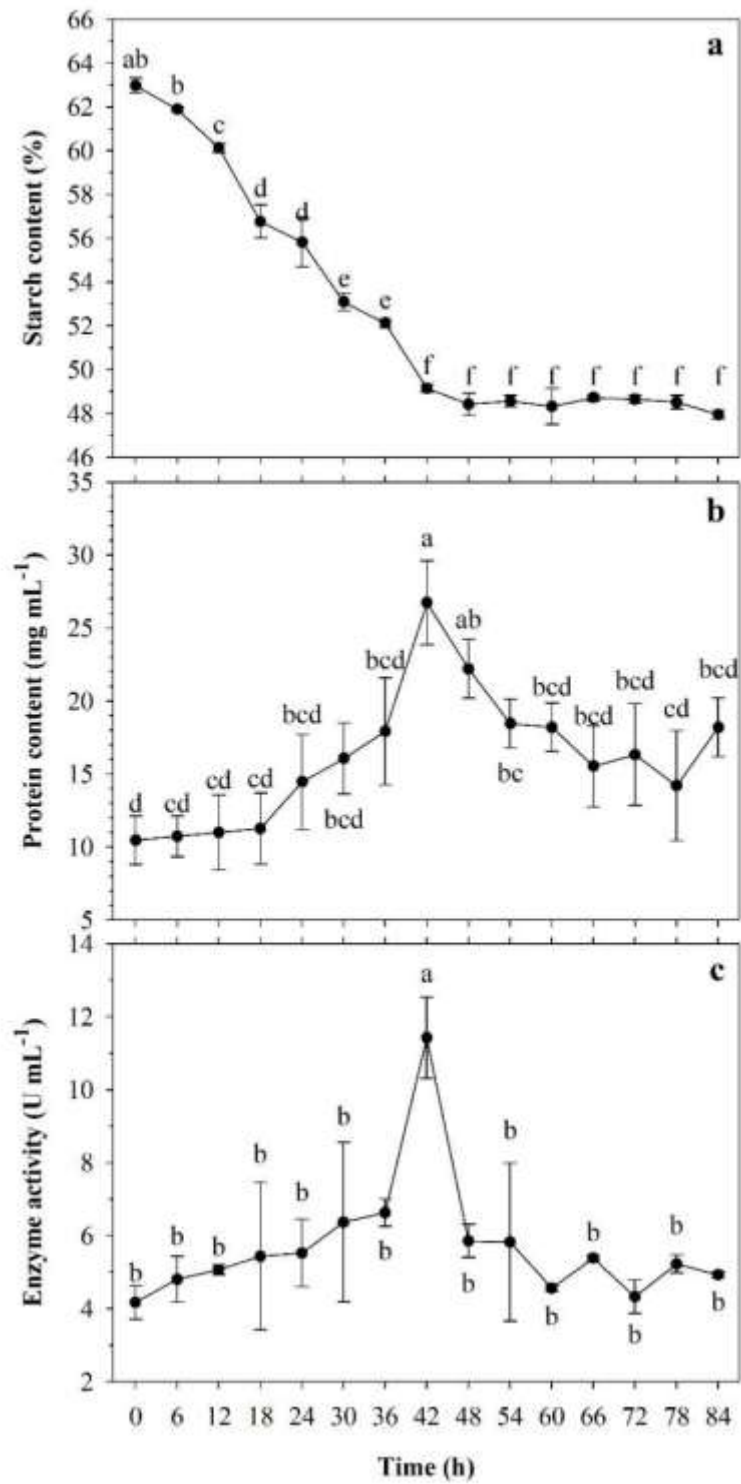


Fig. 4. Starch content (a), protein content (b), and amylase enzyme activity (c) in barley seeds during germination. Equal letters indicate non-significant differences (Tukey, 0.05).

3.3.2 Binodal phase diagram

The mixture with polyethylene glycol 2000 and potassium phosphate showed potential to form biphasic systems. The cloud point procedure allowed identifying binodal states that delimited conditions where the mixture formed a homogeneous solution in a single liquid phase from conditions where a heterogeneous mixture was formed and separated into two immiscible phases (Fig. 2).

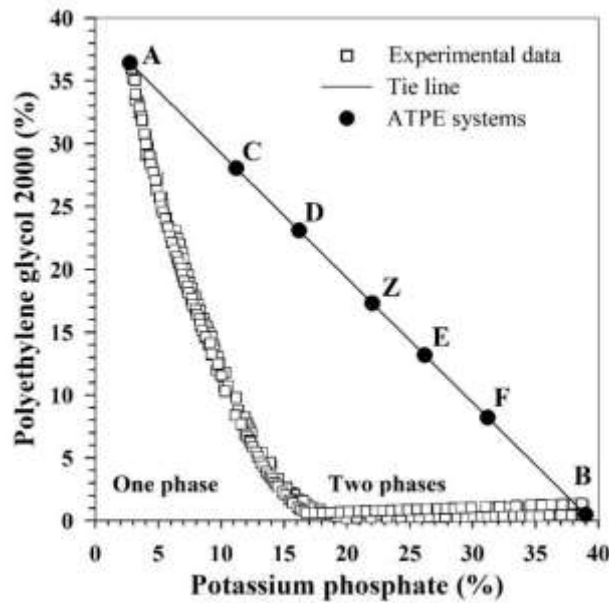


Fig. 5. Binodal phase diagram of the PEG 2000 and potassium phosphate system. A, B, ..., F: evaluated biphasic systems.

The binodal data fitted well ($r^2=0.9977\pm0.0002$) to Equation (3), and values of 80.0303 (±4.8307), -0.4698 (±0.0314), and $4.3995\times10^{-4}(\pm2.6784\times10^{-5})$ were obtained for constants k_1 , k_2 , and k_3 , respectively. With this basis, the average experimental conditions with the lowest and highest potassium phosphate concentrations were identified and, with the support of Equation (3), states A (2.7452, 36.4138 %) and B (38.9925, 0.4832 %) were also recognized. With this information, an experimental tie line was drawn (Figure 2) and states C (11.2000, 28.0329 %), D (16.2000, 23.0766 %), E (26.2000, 13.1639 %), and F (31.2000, 8.2076%) were identified on it (Fig. 2), which were used to prepare systems in physical form. All these systems formed two-phases. The volume of top phases

was related to the PEG 2000 concentration of systems C, D, E, and F (Equation 5). Likewise, the volume of bottom phases was related to the potassium phosphate concentrations (Equation 6). By equating models, Equation (7) was obtained with values of 8.8462, -0.2299, 6.4991, and -0.1572 in the constants k_4 , k_5 , k_6 , and k_7 , respectively. Likewise, the concentrations of PEG 2000 and potassium phosphate were related, from which the values of 39.4799 and -1.0088 were obtained for the constants k_8 and k_9 . With this, Equations (7) and (8) were solved, from which the system Z (22.03, 17.29 %) was obtained, corresponding to the two-phase condition with equal volume partitioning ($V_r=1$).

3.3.3 Characterization of amylase purification

The system formulated for the condition Z in the binodal diagram separated into two phases, a top phase (t) and a bottom phase (b). This separation caused protein concentrations of $0.17 \pm 0.03 \text{ mg mL}^{-1}$ in the top phase and $1.47 \pm 0.11 \text{ mg mL}^{-1}$ in the bottom phase, resulting in protein partition coefficient of 0.12 ± 0.03 (Equation 9), which indicated that proteins migrated primarily to the bottom phase. However, the amylase enzyme activity had a value of $1.35 \pm 0.02 \text{ U mL}^{-1}$ in the top phase and a value of $0.64 \pm 0.01 \text{ U mL}^{-1}$ in the bottom phase, indicating that amylases migrated mainly to the top phase, which generated the value of 2.12 ± 0.02 in the partition coefficient of the enzyme activity (Equation 10). In this regard, Kavakçioğlu & Tarhan (2013), pointed out that a high value of k_e accompanied by a low value of k_p indicates that the enzymatic fraction is concentrated to a greater extent in the top phase, which confirmed that the aqueous two-phase extraction technique has the potential to address the purification of enzymes. In addition, this technique favors the preservation of the bioactivity of the separated molecules, due to the high content of water in both the top and bottom regions, which varies between 80 and 90%, and provides an environment close to the natural conditions where biomolecules are usually found (Shad et al., 2018). Furthermore, the gentle nature of the process, which avoids using aggressive organic solvents, permits the protection of sensitive

biomolecules, facilitating the purification of proteins without compromising their biological activity.

On the other hand, the system presented an enzyme separation yield (Equation 11) of $63.92 \% \pm 0.47$ and a purification factor (Equation 12) of 5.82 ± 0.87 . In this regard, conventional protocols used to purify enzymes require long time to achieve considerable yields and purification (Moreira et al., 2013). In this sense, Liaqat et al. (2024) purified amylases by precipitation of ammonium sulfate, membrane dialysis, and gel filtration chromatography, and found a factor of purification of 4 and a yield of 13 %. Likewise, Fincan et al. (2021) mentioned a 30 % yield in the purification of α -amylase synthesized by *Bacillus licheniformis* when ammonium sulfate precipitation was used, followed by ion exchange chromatography, and finally, dialysis. In addition, in large-scale processes, multi-step purification reduces enzyme activity and yield (Shad et al., 2018).

3.3.4 Effect of temperature, pH, and substrate concentration

The activity of the enzyme separated by aqueous two-phase extraction showed to be sensible to temperature, in a way that, starting from $0.34 (\pm 0.27) \text{ U mL}^{-1}$, it increased to a maximum of $1.57 (\pm 0.33) \text{ U mL}^{-1}$ at 40°C , and then consistently decreased to $0.02 (\pm 0.02) \text{ U mL}^{-1}$ at 80°C (Fig. 3a). The optimal temperatures for alpha and beta amylases are different. According to De Schepper et al. (2022), between 40 and 60°C there is no difference in the residual activity of alpha amylases, while between 40 and 50°C there is no difference in that of beta amylases. In this regard, the optimal temperature that was found in the present work was within such intervals.

The pH also affected the enzyme activity, since the activity was $0.20 (\pm 0.03) \text{ U mL}^{-1}$ at pH 3.0, but increased to a maximum of $1.81 (\pm 0.04) \text{ U mL}^{-1}$ at pH 5.0 and then decreased consistently to $0.10 (\pm 0.17) \text{ U mL}^{-1}$ at pH 8.0 (Figure 3b). The pH is a variable that can affect the chemical structure of materials (García-Cerqueda et al., 2025). In the present work, the behavior can be attributed to changes in the protonation or deprotonation of functional groups of amino acids that are present

in the active sites of the enzyme, which causes an alteration in its three-dimensional structure and, consequently, its denaturation (Fincan et al., 2021). Likewise, enzymatic denaturation at high pH can prevent adequate interaction with substrates, affecting its ability to catalyze starch hydrolysis efficiently. On the other hand, the present work evaluated a cocktail of enzymes, where different amylases can be present, and each one can exhibit different optimum pH. In this regard, Roth et al. (2019) evaluated three microbial α -amylases and determined that all of them had optimum pH around 5.0, which coincided with data of the present work. However, Duan et al. (2021) reported that the optimum pH of a microbial β -amylase was 6.5, thus the hypothesis of higher presence of α -amylase can be established.

The enzyme activity was also dependent on the starch concentration present in the medium, since a value of $0.64 (\pm 0.02) \text{ U mL}^{-1}$ was obtained with 0.3 % substrate, but increased to a maximum of $0.98 (\pm 0.01) \text{ U mL}^{-1}$ with 0.5 %, and then decreased continuously to $0.42 (\pm 0.02) \text{ U mL}^{-1}$ with 1.5 % concentration (Fig. 3c). A kinetic behavior consistent with the Michaelis-Menten model corresponds to a situation where the reaction rate or the enzyme activity increases to a maximum, derived from a saturation phenomenon and, from there the reaction rate becomes constant (Nelson & Cox, 2009). However, the upward trend to a maximum, followed by a continuous decline, suggests a situation of inhibition by substrate, which leads to a drop in reaction rate once the substrate exceeds an optimum concentration. In this regard, an excess of substrate can transiently block access to catalytic sites, and complexes can form between the enzyme and insoluble or highly branched regions of the starch, hindering product release (Segel, 1993). Specifically, as the starch concentration increases, the hydrogen bonds between the substrate and water are partial or completely replaced, which negatively affects the interaction between amylase and its substrate, thus decreasing its catalytic efficiency (Sudeep et al., 2020).

In order to verify this situation, the value of 1.81 U mL^{-1} obtained previously was accepted to be V_{max} in Equation (14). Thus, a nonlinear least squares algorithm

(lsqnonlin.m function; The Mathworks Inc., 2008) was applied and indicated a value for the Michaelis constant (K_M) equal to 0.1795 % (9.96 mM) and an inhibition constant (K_i) equal to 0.6422 % (35.64 mM), which indicated that the amylolytic enzymes can tolerate a starch concentration of less than 0.64 % before they begin to be inhibited. However, the determination coefficient (r^2) was 0.618, which indicated that the data are not entirely consistent with a simple Michaelis-Menten model with substrate inhibition (Fig. 3c), suggesting that the downward trend after the peak was caused by factors other than substrate inhibition. In this regard, an increase in substrate can cause an increase in the viscosity of the medium or can form aggregates or clumps, which impedes the diffusion of the enzyme to the substrate (Segel, 1993).

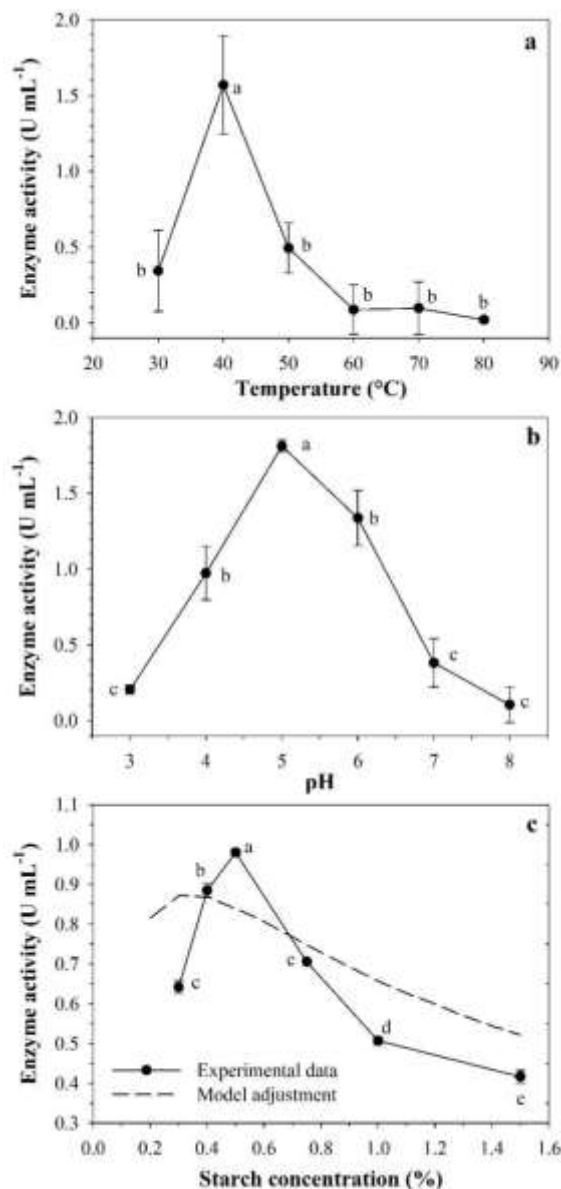


Fig. 6. Effect of temperature (a), pH (b), and substrate concentration (c) on amylase enzyme activity. Equal letters indicate a non-significant difference (Tukey, 0.05)

3.3.5 Molecular weight of amylases

The electrophoresis analysis of the germinated barley seeds showed the presence of protein bands located at approximately 55, 38, 35, 28, 24, and 18 kDa (Lane B, Fig. 4). Meanwhile, the analysis of the polymeric phase (top phase) of the ATPE systems showed three protein bands of higher concentration, located at approximately 55, 38, and 24 kDa, suggesting the presence of distinct protein

structures in this phase. In this regard, given the higher enzymatic activity in this phase, it was hypothesized that there were distinct enzymatic structures in the analyzed phase. In addition, the analysis of the bottom phase of systems showed very faint bands, indicating low concentrations of these structures. The molecular weights of cereal amylases are quite variable, ranging from 45 to 67.2 kDa (BRENDA Enzyme Database, 2025). Previous studies have even reported the activity of germinated barley amylases with molecular weight of approximately 27 kDa. It has also been observed that these enzymes may be associated with the activity of other enzymes, like β -glucanases, which play a complementary role in the polysaccharide hydrolysis process (Herrera-Gamboa et al., 2018; Uno-Okamura et al., 2004).

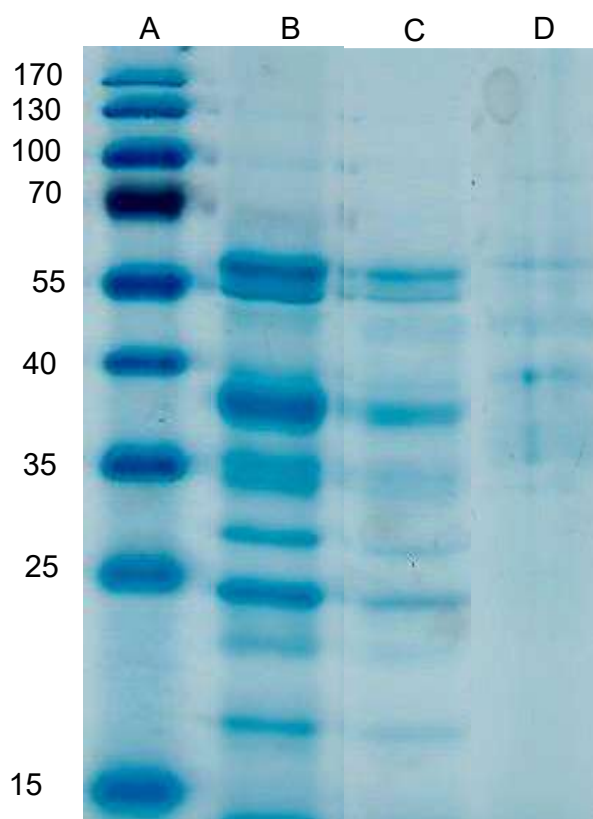


Fig. 7. Analysis of amylases by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Lane A: standard proteins (kDa). Lane B: germinated barley. Lane C: polymeric phase (top) amylases of the ATPE system. Lane D: salt phase (bottom) amylases of the ATPE system.

Nomenclature

AE_t	Enzyme specific activity in top phase (U mL ⁻¹).
A_t, A_b	Enzymatic activity in the top and bottom phases (U mL ⁻¹).
E_T	Total enzyme activity (U mL ⁻¹).
F_p	Purification factor (dimensionless).
K_M	Michaelis-Menten constant (g L ⁻¹).
V_b	Volume of the bottom phase (mL).
V_{max}	Maximum starch consumption rate (g L ⁻¹ min ⁻¹).
V_r	Volume ratio (dimensionless).
V_t	Volume of the top phase (mL).
c_g^0, c_g^f	D-glucose concentration initial and final
$c_{p,t}, c_{p,b}$	Protein concentrations (mg mL ⁻¹) in top (<i>t</i>) and bottom (<i>b</i>) phases.
k_1	Regression constant (%).
k_2	Regression constant (% ^{-0.5}).
k_3	Regression constant (% ⁻³).
k_4, k_6, k_8	Regression constants (mL).
k_5, k_7, k_9	Regression constants (mL % ⁻¹).
k_P	Protein partition coefficient (dimensionless).
k_e	Partition of enzymatic activity (mg mL ⁻¹).
m_{i-1}	Mass of the previous (<i>i</i> -1) mixture.
w_F	Mass (g) of mixture of phosphates added in the <i>i</i> th-stage.
w_H	Mass (g) of water added in the <i>i</i> th-stage.
w_P	Mass (g) of PEG 2000 added in the <i>i</i> th-stage.
$x_{F,i}$	Concentration (%) of potassium phosphate in an <i>i</i> th-mixture.
$x_{F,0}$	Concentration (%) of potassium phosphate in the original solution.
$x_{F,i-1}$	Concentration (%) of potassium phosphate in a previous (<i>i</i> -1) mixture.
x_F	Concentration (%) of potassium phosphate in biphasic systems.
x_F^{max}	Maximum experimental binodal concentration (%) of potassium phosphate.
x_F^{min}	Minimum experimental binodal concentration (%) of potassium phosphate.
x_{bin}	Binodal concentration (%) of potassium phosphate.
$y_{P,i}$	Concentration (%) of PEG 2000 in an <i>i</i> th-mixture.
$y_{P,0}$	Concentration (%) of PEG 2000 in the original solution.
$y_{P,i-1}$	Concentration (%) of PEG 2000 in a previous (<i>i</i> -1) mixture.
y_P	Concentration of PEG 2000 in biphasic systems.
y_P^{max}	Maximum experimental binodal concentration (%) of PEG 2000.
y_P^{min}	Minimum experimental binodal concentration (%) of PEG 2000.
y_{bin}	Binodal concentration (%) of PEG 2000.
$[S]$	Substrate (starch) concentration (g L ⁻¹).
R	Separation yield (%).
V	Starch consumption rate (g L ⁻¹ min ⁻¹).

3.4 Conclusions

The germination of barley seeds caused an increase in the amylases enzymes, with maximum activity at 42 h, which resulted in partial starch degradation. The separation of amylases was feasible from the top phase of a system of aqueous two-phase extraction formed with potassium phosphate and polyethylene glycol. The enzyme activity was affected by variations in temperature and pH. The relationship between the enzyme activity and the starch concentration was explained partially by a Michaelis-Menten model with inhibition by substrate. The feasibility of separating the amylase enzyme produced by germination of barley seeds based on aqueous two-phase extraction was demonstrated. However, data corresponds to a cocktail of enzymes, so it is advisable to conduct the identification and characterization of the specific amylases.

3.5 Acknowledgment

Authors are grateful for the support received from the scholarship program of the Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) of Mexico

3.6 References

- Abdel-Nasser, M., Abdel-Maksoud, G., Abdel-Aziz, M. S., Darwish, S. S., Hamed, A. A., and Youssef, A. M. (2022). Evaluation of the efficiency of nanoparticles for increasing α -amylase enzyme activity for removing starch stain from paper artifacts. *Journal of Cultural Heritage*, 53, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.11.004>
- Abo-Kamer, A. M., Abd-El-salam, I. S., Mostafa, F. A., Mustafa, A.-E.-R. A., and Al-Madboly, L. A. (2023). A promising microbial α -amylase production, and purification from *Bacillus cereus* and its assessment as antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* pathogen. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02139-6>
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Alkhalidy, H. A., Al-Mahasneh, M. A., Tranchant, C., Kubow, S., and Masadeh, N. (2019). Fermented malt beverages and their biomedical health potential: Classification, composition, processing, and bio-functional properties. In *Fermented Beverages* (pp. 369–400). Elsevier

- Bahdanovich, P., Axelrod, K., Khlystov, A. Y., and Samburova, V. (2022). Optimized spectrophotometry method for starch quantification. *Analytica*, 3(4), 394–405. <https://doi.org/10.3390/analytica3040027>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (23), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRENDA Enzyme Database. (2025, March 12). <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- Carranza-Gomez, M., Valle-Guadarrama, S., Domínguez-Puerto, R., Sandoval-Castilla, O., and Guerra-Ramírez, D. (2025). Bioactive Compounds and Pigmenting Potential of *Vaccinium corymbosum* Extracts Separated with Aqueous Biphasic Systems Aided by Centrifugation. *Processes*, 13(4), 1072. <https://doi.org/10.3390/pr13041072>
- De Schepper, C., Buvé, C., Van Loey, A., and Courtin, C. (2022). A kinetic study on the thermal inactivation of barley malt α -amylase and β -amylase during the mashing process. *Food Research International*, 157, 111201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111201>
- Duan, X., Zhu, Q., Zhang, X., Shen, Z. and Huang, Y. (2021). Expression, biochemical and structural characterization of high-specific-activity β -amylase from *Bacillus aryabhattai* GEL-09 for application in starch hydrolysis. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01649-5>
- Edleman, D., Welsh, K., Sweet, L., Murai, T. and Annor, G.A. (2025). Impact of germination time and temperature on starch viscosity properties and chemical composition of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Journal of Cereal Science*, 122, 104129. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2025.104129>
- Evans, D. E., Shen, W., and Brookes, P. (2024). Malting - the middle parts of fortune' - a history of innovation and the enduring quest for efficiency. *Journal of the Institute of Brewing*, 130(3), 126–181. <https://doi.org/10.58430/jib.v130i3.58>
- Fincan, S. A., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Mustafafov, S. D., Ulutaş, M. S., and Şen, F. (2021). Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*, 264(118639), 118639. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118639>
- García-Cerqueda, C., Rodríguez-Ramírez, J. and Méndez-Lagunas, L. (2025). Kinetic modeling of solid-liquid extraction of mucilage from *Opuntia ficus indica*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 24(1), 1–13. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Cat24441>

- Girón-Orozco, D., Mariezcurrena-Berasain, M. D., Aguilar, O., Ramírez-Dávila, J. F., and Heredia-Olea, E. (2023). Recovery of amylolytic enzymes from triticale malt (X. Triticosecale Wittmack) using two-phase aqueous systems. In *Research Square*, 6(7), 115–127. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2468244/v1>
- Godoy-Ramirez, A., Rodriguez-Huezo, M.E., Lara-Corona, V.H., Vernon-Carter, E.J. and Alvarez-Ramirez, J. (2024). Wheat bread supplemented with potato peel flour: color, molecular organization, texture and in vitro starch digestibility. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 23(1), 1–18. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim24201>
- Gomes, J., Ferreira, S., Reinert, O., Gandol, R., Ayra, L., Santos, V., Veloso, C. M., Ilh, C., Cristina, R., and Bonomo, F. (2017). Fluid Phase Equilibria evaluation of salting-out effect in the liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄/MgSO₄ at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 450, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.001>
- Gu, Z., Rao, J., and Chen, B. (2025). Application of flavoromics approach to evaluate aroma characteristics in malts: Current trends and future outlooks. *Trends in Food Science & Technology*, 156, 104878. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.104878>
- Gupta, N., Paul, J. S., and Jadhav, S. K. (2024). Chitosan decorated magnetic nanobiocatalyst of *Bacillus* derived α-amylase as a role model for starchy wastewater treatment, detergent additive and textile desizer. *Bioorganic Chemistry*, 151(107673), 107673. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107673>
- Hasan, H. R., and Al- Ani, A. W. (2022). An economical source for peroxidase: maize cobs. *Karbala International Journal of Modern Science*, 8(2), 112–122. <https://doi.org/10.33640/2405-609X.3227>
- Hernández-Rodríguez, G., Valle-Guadarrama, S., Guerra-Ramírez, D., Domínguez-Puerto, R., and López-Cruz, I. L. (2024). Anthocyanins of *Ardisia* spp. fruits separated with pH driven-aqueous biphasic systems. *Separation Science and Technology*, 60(3–5), 426–437. <https://doi.org/10.1080/01496395.2024.2445006>
- Herrera-Gamboa, J. G., López-Alvarado, C. B., Pérez-Ortega, E., Damas-Buenrostro, L. C., Cabada-Amaya, J. C., and Pereyra-Alfárez, B. (2018). Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare* L.) and their impact on wort quality. *Journal of Cereal Science*, 80, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.004>
- Jones, B. L. (2005). Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 42(2), 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.007>
- Kaur, N., Gasparre, N., and Rosell, C. M. (2024). Expanding the application of germinated wheat by examining the impact of varying alpha-amylase levels

- from grain to bread. *Journal of Cereal Science*, 120(104059), 104059. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.104059>
- Kavakçioğlu, B., and Tarhan, L. (2013). Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems. *Separation and Purification Technology*, 105, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.12.011>
- Khan, B.M., Cheong, K.L. and Liu, Y. (2019). ATPS: “aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(19), 3165–3178. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1486283>
- Ladjal-Ettoumi, Y., Douik, L. H., Hamadi, M., Abdullah, J. A. A., Cherifi, Z., Keddar, M. N., Zidour, M., and Nazir, A. (2024). Physicochemical and functional properties of Spirulina and Chlorella proteins obtained by Iso-electric precipitation. *Food Biophysics*, 19(2), 439–452. <https://doi.org/10.1007/s11483-024-09836-8>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lekjing, S., and Venkatachalam, K. (2020). Effects of germination time and kilning temperature on the malting characteristics, biochemical and structural properties of HomChaiya rice. *RSC Advances*, 10(28), 16254–16265. <https://doi.org/10.1039/d0ra01165g>
- Li, Q., Zhai, W., Wei, J., and Jia, Y. (2023). Rice lipid transfer protein, OsLTPL23, controls seed germination by regulating starch-sugar conversion and ABA homeostasis. *Frontiers in Genetics*, 14, 1111318. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1111318>
- Liaqat, U.-E.-S., Naz, S., and Hussain, H. I. (2024). Optimization and production of highly stable amylase isolated from *Citrobacter portucalensis* using low-cost agro-industrial wastes as substrates: Prospective therapeutics. *Kuwait Journal of Science*, 51(1), 100156. <https://doi.org/10.1016/j.kjs.2023.11.005>
- Madadi, B., Pazuki, G. and Nasernejad, B. (2013). Partitioning of cefazolin in biocompatible aqueous biphasic systems based on surfactant. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58(10), 2785–2792. <https://doi.org/10.1021/je4004756>
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., and Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications*, 711(1–2), 285–293. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00594-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00594-x)
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., and Burton, A. L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-x)

- Moreira, S., Silvério, S. C., Macedo, E. A., Milagres, A. M. F., Teixeira, J. A., and Mussatto, S. I. (2013). Recovery of *Peniophora cinerea* laccase using aqueous two-phase systems composed by ethylene oxide/propylene oxide copolymer and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, 1321, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.056>
- Mushtaq, B., Nawab, Y., Ahmad, S., and Ahmad, F. (2024). An eco-friendly enzymatic treatment to prepare spinnable banana fibers as an alternative to cotton for textile applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278(134630), 134630. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134630>
- Nelson, D. and Cox, M. (2019). *Lehninger: principios de bioquímica*. 7a ed. Omega. Barcelona
- Obadi, M., Sun, J., and Xu, B. (2021). Highland barley: Chemical composition, bioactive compounds, health effects, and applications. *Food Research International*, 140, 110065. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110065>
- Panajotova, H., Striska, H., Gandova, V., Dobрева, V., Zhekova, B. and Dovrev, G. (2017). Purification of lipase from *Aspergillus carbonarius* NRRL369 by ATPS PEG/potassium phosphate. *Bulgarian Chemical Communications*, 49 (special), 130 –136
- Phetlum, S., and Champasri, C. (2023). Purification and characterization of amylases from three freshwater fish species providing new insight application as enzyme molecular markers for zymography. *Fish Physiology and Biochemistry*, 49(6), 1257–1276. <https://doi.org/10.1007/s10695-023-01255-9>
- Pismag, R., Pico, J., Fernández, A., Hoyos, J. L., and Martinez, M. M. (2023). α -Amylase reactive extrusion enhances the protein digestibility of saponin-free quinoa flour while preserving its total phenolic content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies: IFSET: The Official Scientific Journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 88(103448), 103448. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103448>
- Polachini, T. C., Cárcel, J. A., Norwood, E., Chevallier, S. S., Le-Bail, P., and Le-Bail, A. (2023). Hot-air ultrasound-assisted drying of green wheat and barley malts to enhance process kinetics, amylase activity and their application in bread formulation. *Food and Bioprocess Processing*, 142, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.08.009>
- Posoongnoen, S., Thummavongsa, T., Junthip, J., Jandaruang, J. and Preecharram, S. (2025). Potential application of α -amylase from germinating *Cucurbita moschata* duchesne seeds in eco-friendly bioethanol production. *Scientific Reports*, 15(1), 25499. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11653-z>
- Rani, H., Standish, A., Walling, J. G., and Whitcomb, S. J. (2025). Development and quality assessment of low-cost benchtop malting protocol for laboratory-

- scale barley (*Hordeum vulgare* L.) malt quality evaluation. *Journal of Cereal Science*, 104138. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2025.104138>
- Rao, K. H., and Haseena, S. (2024). Principles of basic and advanced techniques used for the purification of enzymes of industrial importance. In *Recent Advances in Bioprocess Engineering and Bioreactor Design* (pp. 171–183). Springer Nature Singapore
- Robles-Arias, M.A., Escalona-Buendía, H.B., Ramírez-Romero, M.A.G. and Cruz-Guerrero, A.E. (2025). Obtention of amaranth resistant starch through succinylation and phosphorylation reaction. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 24(2), 1–20. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim25547>
- Rodríguez-Herrera, V. V., García-Cruz, L., and Valle-Guadarrama, S. (2023). Aqueous two-phase extraction: A non-thermal technique to separate and concentrate betalains from *Bougainvillea glabra* Choisy bracts. *Industrial Crops and Products*, 193, 116245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116245>
- Rodríguez-Salazar, N. and Valle-Guadarrama, S., 2020. Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology*, 55 (13), 2313-2324. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Roth, C., Moroz, O.V., Turkenburg, J.P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianqi, S. and andersen, C., Davies, G.J. and Wilson, K.S. (2019). Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4902. <https://doi.org/10.3390/ijms20194902>
- Šalić, A., Ljubić, A., Marčinko, T., Tušek, A. J., Bubalo, M. C., Tišma, M., and Zelić, B. (2023). Shifting the natural deep eutectic solvent based liquid lipase extraction from batch to continuous for more efficient process performance. *Journal of Cleaner Production*, 405, 136899. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136899>
- Segel, I.H. (1993). Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley-Interscience, USA.
- Shad, Z., Mirhosseini, H., Hussin, A. S. M., Forghani, B., Motshakeri, M., and Manap, M. Y. A. (2018). Aqueous two-phase purification of α -Amylase from white pitaya (*Hylocereus undatus*) peel in polyethylene glycol /citrate system: Optimization by response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.014>
- Shirodkar, P. V., Muraleedharan, U. D., Damare, S., and Raghukumar, S. (2020). A mesohaline thraustochytrid produces extremely halophilic alpha-amylases. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 22(3), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09960-9>

- Singla, M., and Sit, N. (2022). Isolation of papain from ripe papaya peel using aqueous two-phase extraction. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 17(2), 1685–1692. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01741-3>
- Sofi, S. A., Rafiq, S., Singh, J., Mir, S. A., Sharma, S., Bakshi, P., McClements, D. J., Mousavi Khaneghah, A., and Dar, B. N. (2023). Impact of germination on structural, physicochemical, techno-functional, and digestion properties of desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. *Food Chemistry*, 405(Pt B), 135011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135011>
- SPSS, I. (2000). Sigma Plot 2000 User's Guide. SPSS Inc., Chicago, IL, USA
- Sudeep, C., Jitendra, U., Dev, J., Binod, L., Dhiraj, C. and Bhoj, P. (2020). Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6 (2), 59-68. <https://dx.doi.org/10.3390/fermentation6020059>.
- The Mathworks Inc. (2008). Optimization Toolbox™ 688 4 User's Guide. The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA.
- Uno-Okamura, K., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., and Hoson, T. (2004). Purification and properties of apoplastic amylase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 121(1), 117–123. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00298.x>
- Van de Velde, F., Méndez-Galarraga, M. P., Albarracín, M., Garzón, A. G., Aquino, M., Cian, R. E., Vinderola, G., and Drago, S. R. (2025). Exploring the effects of barley (*Hordeum vulgare* L.) germination on chemical composition, phytic acid, and potential malt prebiotic properties. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 138(107016), 107016. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107016>
- Verlaine, O., Malempré, R., Versées, W., Matagne, A. and Frère, J.M. (2024). Single time-point analysis of product and substrate inhibition. *Scientific Reports*, 14(1), 23160. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70805-9>
- Wang, Y., Ral, J.P., Saulnier, L. and Kansou, K. (2022). How does starch structure impact amylolysis? Review of current strategies for starch digestibility study. *Foods*, 11(9), 1223. <https://doi.org/10.3390/foods11091223>
- Xie, C., Liu, Y., Su, L., Zhang, C., Li, D., Wang, P., Liu, J. and Yang, R. (2025). The effects of germination and different milling degrees on the nutritional properties of rice bran. *Journal of Cereal Science*, 124, 104231. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2025.104231>
- Yang, B., Yin, Y., Liu, C., Zhao, Z., and Guo, M. (2021). Effect of germination time on the compositional, functional and antioxidant properties of whole wheat malt and its end-use evaluation in cookie-making. *Food Chemistry*, 349, 129125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129125>

- Zheng, J., Wang, N., Yang, J., You, Y., Zhang, F., Kan, J., and Wu, L. (2024). New insights into the interaction between bamboo shoot polysaccharides and lotus root starch during gelatinization, retrogradation, and digestion of starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254(Pt 3), 127877. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127877>
- Zhu, H., Bai, X., Liang, Q., Zhong, L., Chang, H., Chen, Y., and Qiao, Z. (2024). Study on multi-stage aqueous two-phase extraction of papain. *Food and Fermentation Industries*, 50(4), 152–156. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035787>

4 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO ASISTIDA POR EXTRACCIÓN BIFÁSICA ACUOSA: UN PROCEDIMIENTO EFICAZ PARA PRODUCIR Y PURIFICAR AMILASAS

Resumen

Las amilasas son enzimas de gran relevancia industrial, y su producción es de gran interés. El objetivo de este estudio fue demostrar el uso de la fermentación en estado sólido asistida por extracción bifásica acuosa como una alternativa eficaz para la producción y purificación parcial de amilasas. La fermentación en estado sólido (FES) se llevó a cabo a 30 °C y 75 % de humedad relativa durante 72 h. Se utilizó agrolita como soporte inerte, que se impregnó con medio de cultivo Pontecorvo conteniendo almidón de cebada (*Hordeum vulgare* L.), seguido de la inoculación con *Aspergillus niger*. La extracción bifásica acuosa (ABE) se realizó utilizando un 24.32 % de polietilenglicol (PEG) 2000 y un 14.56 % de fosfato de potasio (PP) para purificar parcialmente las enzimas producidas. Se evaluó la distribución proteica y enzimática, así como los efectos del pH, la temperatura y la concentración de almidón. También se determinó el peso molecular mediante electroforesis. La FES promovió el crecimiento fúngico, aumentó la producción de CO₂, el contenido proteico y la actividad amilasa. La ABE produjo ratios de separación de fase superior/fase inferior de 0.72/1.00 para las proteínas y de 1.44/1.00 para la actividad amilasa. La actividad enzimática fue mayor a un pH de 5.0-6.0 (73.98 UI/mL), a temperaturas de 50-60 °C (54.28 U/mL) y a concentraciones de almidón de 1.5-2.0 g/L (47.21 UI/mL), con un rendimiento de recuperación del 80.48 %. El análisis cinético indicó inhibición por sustrato, con una constante de Michaelis (K_M) de 0.84 g/L, una velocidad de reacción máxima (V_{max}) de 11,64 g/L min y una constante de inhibición del sustrato (k_i) de 3,43 g/L. La electroforesis reveló bandas principales entre 35 y 63 kDa, lo que indica múltiples formas de amilasa. Estos resultados demostraron que la fermentación en estado sólido junto con la extracción acuosa bifásica es un enfoque viable para la producción y purificación parcial de amilasa sin necesidad de equipos sofisticados, lo que respalda su potencial para la aplicación industrial.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Director de Tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

Artículo enviado a la revista International Food Research Journal

Palabras clave: amilasas, extracción acuosa bifásica, electroforesis, actividad enzimática, cinética de Michaelis-Menten, fermentación en estado sólido.

SOLID-STATE FERMENTATION AIDED BY AQUEOUS BIPHASIC EXTRACTION: AN EFFICIENT PROCEDURE TO PRODUCE AND PURIFY AMYLASES

Abstract

Amylases are enzymes of high industrial relevance, and their production is of significant interest. This study aimed to demonstrate the use of solid-state fermentation assisted by aqueous biphasic extraction as an efficient alternative for the production and partial purification of amylases. Solid-state fermentation (SSF) was conducted at 30°C and 75 % relative humidity for 72 h. Agrolite was used as an inert support and was impregnated with Pontecorvo culture medium containing barley starch (*Hordeum vulgare* L.), followed by inoculation with *Aspergillus niger*. Aqueous biphasic extraction (ABE) was performed using 24.32 % polyethylene glycol (PEG) 2000 and 14.56 % potassium phosphate (PP) to partially purify the enzymes produced. Protein and enzyme activity partitioning, the effects of pH, temperature, and starch concentration were evaluated. Molecular weight was also determined by electrophoresis. SSF promoted fungal growth, increased CO₂ production, protein content, and amylase activity. ABE produced top-phase/bottom-phase separation ratios of 0.72/1.00 for proteins and 1.44/1.00 for amylase activity. Enzyme activity was highest at pH 5.0-6.0 (73.98 U/mL), at temperatures of 50-60°C (54.28 U/mL), and at starch concentrations of 1.5-2.0 g/L (47.21 U/mL), with a recovery yield of 80.48 %. Kinetic analysis indicated substrate inhibition, with Michaelis constant (K_M) of 0.84 g/L, a maximum reaction rate (V_{max}) of 11.64 g/L min, and a substrate inhibition constant (k_i) of 3.43 g/L. Electrophoresis revealed major bands between 35 and 63 kDa, indicating multiple amylase forms. These results demonstrated that solid-state fermentation coupled with aqueous biphasic extraction is a viable approach for amylase production and partial purification without the need for sophisticated equipment, supporting its potential for industrial application.

Keywords: amylases, aqueous biphasic extraction, electrophoresis, enzyme activity, Michaelis-Menten kinetics, solid-state fermentation.

Doctoral Thesis. Graduate Program in Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Thesis director: Dr. Salvador Valle Guadarrama

4.1 Introducción

Las amilasas se utilizan ampliamente en sectores como la industria alimentaria (Zheng et al., 2025) y farmacéutica (Shen et al., 2025), debido a su capacidad para hidrolizar el almidón en azúcares simples (Hua et al., 2022). Las amilasas pueden ser generadas por bacterias y hongos de varios géneros, entre los que destaca el *Aspergillus niger* por su alta productividad en diversas condiciones de cultivo (Abduh et al., 2025). En este sentido, la fermentación en estado sólido (SSF) es un método eficaz para la producción de enzimas, ya que simula las condiciones naturales de crecimiento microbiano, ofrece ventajas en términos de costes operativos y permite un alto rendimiento volumétrico (Perwez y Al Asheh, 2025). Sin embargo, en cualquier caso, deben aplicarse métodos de separación y purificación de enzimas.

Los métodos de separación tradicionales, como la precipitación con sal, la cromatografía, la ultracentrifugación y la filtración por membrana, suelen tener limitaciones en cuanto a escalabilidad y complejidad operativa. La precipitación con sal reduce la solubilidad de las enzimas y provoca la separación, pero su aplicación es limitada debido a la falta de especificidad y a la dificultad de reproducir la técnica a gran escala (Cui et al., 2026). La cromatografía es muy específica, pero requiere equipos sofisticados y resinas costosas (Chauhan et al., 2025). La ultracentrifugación permite una separación basada en el tamaño, pero está limitada por el coste del equipo y la capacidad de procesamiento continuo (Isabel y Premalatha, 2025). La microfiltración, la ultrafiltración y la nanofiltración permiten separar las enzimas según su tamaño utilizando membranas semipermeables y pueden integrarse en procesos continuos, pero están limitadas por la necesidad de un mantenimiento constante debido a las incrustaciones (Dai et al., 2025).

La extracción acuosa bifásica (ABE) es una alternativa viable para separar enzimas debido a su simplicidad, bajo consumo energético, conservación de la actividad enzimática y potencial de escalabilidad (Lu et al., 2022). La ABE se basa en mezclas que incluyen dos polímeros como el dextrano o el

polietilenglicol, o mezclas de polímeros con sales (Khan et al., 2019), donde se pueden formar dos fases inmiscibles en función de la composición y un fenómeno de salinización (Jiménez-Velázquez et al., 2020). La ABE basada en polietilenglicol y fosfato de potasio ha destacado en la purificación de enzimas fúngicas (Riahi y Bijarchi, 2025), debido a la estabilidad química de los componentes, la biocompatibilidad y la posibilidad de ajustar parámetros como el pH, la temperatura y la composición (Panajotova et al., 2017). En este sentido, el objetivo del trabajo fue demostrar el uso de la fermentación en estado sólido asistida por extracción bifásica acuosa como una alternativa eficiente para la producción y purificación parcial de amilasas.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Los frutos de papaya (*Carica papaya* L.) se cortaron asépticamente en trozos de 3×5 mm, se colocaron en el centro de placas de Petri con medio agar papa-dextrosa (PDAM) y se incubaron a 30 °C durante 6 días. Las colonias identificadas morfológicamente como *Aspergillus* spp. se transfirieron a placas de Petri con PDAM y se incubaron en las mismas condiciones. La identificación de *Aspergillus niger* se confirmó mediante procedimientos de caracterización molecular con amplificación de la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosómico (ADNr) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de secuenciación del amplicón. La amplificación de la región ITS se llevó a cabo utilizando los cebadores ITS 5HP (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') y NL-4 (3'-GAC TCC TTT TTC CCG AGG TAG GTC AGA T-5'). Las secuencias de ADN se analizaron con el software BioEdit (versión 7.7.1) y se sometieron a un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para la identificación de especies. Las esporas de *Aspergillus niger* (acceso al GenBank PV833227.1) se incubaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 mL de PDAM. Los matraces se colocaron a 30 °C durante 6 días y las esporas se recuperaron con soluciones estériles de Tween 80 al 0.05 % (v/v).

4.2.2 Extracción de almidón

Se trituraron semillas de cebada y el producto se tamizó en malla 12 US (1.68 mm) (MON200A012, Mont inox, México). Posteriormente, se adicionó una solución de hidróxido de sodio 0.25 % (p/p), en proporción 1:2 (m/v) y se dejó reposar durante 12 h a 4 °C. La mezcla se tamizó con malla 200 US (0.074 mm) (MON200A200, Mont inox, México) y se realizaron tres lavados con agua destilada para retirar el almidón. La suspensión obtenida se centrifugó durante 15 min a 18,947×g y 4 °C (Ohaus, EE. UU.). Se decantó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente (Hernández-Castillo et al., 2019).

4.2.3 Fermentación en medio sólido (FES)

Se aplicó el procedimiento descrito por Biz et al. (2016) con algunas modificaciones. Se preparó el medio de cultivo Pontecorvo con 6 g/L de NaNO₃, 1,52 g/L de KH₂PO₄, 0,52 g/L de KCl, 0,52 g/L de MgSO₄•7H₂O, 0,001 g/L de ZnSO₄, 0,00085 g/L de FeCl₃ y 30 g/L de glucosa, junto con almidón de cebada (20 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). Se eligió agrolita como soporte inerte para el medio de cultivo, que se tamizó con una malla 10 US, se lavó dos veces con agua caliente (80 °C) y, posteriormente, con agua destilada estéril. La agrolita se secó a 60 °C durante 24 h y se mezcló con medio de cultivo Pontecorvo, en una proporción de 1:1 (p/v). La mezcla se esterilizó a 121 °C durante 5 min para evitar la degradación del almidón. Se inocularon 15 gramos de la mezcla con 5 mL de una suspensión que contenía 2×10^7 esporas/mL. El contenido inicial de humedad y azúcar fue del 5340 % y 11.25 mg/mL, respectivamente. El material inoculado se colocó en columnas de vidrio (Ø=4.4 cm y h=26.0 cm). Las columnas se colocaron a 30 °C con un suministro continuo de aire con una humedad relativa del 75 % a una velocidad de 20 mL/min, que se acondicionó mediante burbujeo en una solución saturada de NaCl. Se tomaron muestras de las columnas cada 12 h durante 72 h y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. El procedimiento se aplicó por triplicado.

La producción de dióxido de carbono se utilizó como medida indirecta del crecimiento de *A. niger* (Maschke et al., 2022). La concentración de dicho gas en la salida de las columnas de fermentación se monitoreó con el método descrito por García-Cruz et al. (2016), basado en soluciones de bicarbonato sódico incorporadas con azul de bromotimol, la medición de la absorbancia a 615 nm en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, EE. UU.) y el uso de una curva estándar de CO₂ en el rango de 0.2 a 10.0 % (v/v).

Para recuperar el extracto celular, se mezclaron 3 g del material sólido muestreado de cada columna con 30 mL de agua destilada estéril y se agitó a 100 rpm durante 30 min a 25 °C en un equipo orbital (Ohaus, ISHD16HDG, EE. UU.). La mezcla se filtró con papel Whatman No. 4 y se centrifugó durante 10 min a 4390×g en un equipo Eppendorf (Mod. 5804, Alemania). El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20 °C hasta su análisis en términos de proteína soluble y actividad enzimática con los métodos de Bradford (1976) y Miller (1960), expresados en mg por mL de sobrenadante (mg/mL) y unidades por mL de sobrenadante (UI/mL), respectivamente. El pH del sustrato fermentado se midió con un potenciómetro (Conductronic pH120), el contenido de humedad con una termobalanza (Ohaus, MB45, EE. UU.) y el contenido total de azúcar con el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956).

4.2.4 Separación mediante extracción bifásica acuosa

Se prepararon soluciones acuosas de polietilenglicol 2000 al 40 % (PEG 2000; Sigma-Aldrich Co., Alemania) y fosfato de potasio (PP; mezcla de fosfato dibásico/monobásico, 72/28, %/%; J. Bayer). Se aplicó el método de punto de enturbiamiento. Se pesaron 5 g de la solución de PEG 2000 en un tubo Pyrex® de 70 mL y se añadió la mezcla de fosfato gota a gota hasta que se observó turbidez. Posteriormente, se añadió agua desionizada gota a gota hasta que se observó transparencia; se repitió la adición de la mezcla de fosfato hasta que se observó turbidez, y así sucesivamente. En cada etapa de turbidez o transparencia, se registró el peso con una balanza analítica (Ohaus, Nueva Jersey, EE. UU.) con una resolución de 0.0001 g. Se aplicaron rutinas de balance

de masa y se determinaron las concentraciones binodales de fosfato de potasio (x_{PP}^{bin} , %) y PEG 2000 (y_P^{bin} , %). Los datos de los estados de turbidez se ajustaron a la ecuación 1, donde k_1 , k_2 y k_3 son constantes de regresión (Merchuk et al., 1998).

$$y_P^{bin} = k_1 e^{(k_2(x_{PP}^{bin})^{0.5} - k_3(x_{PP}^{bin})^3)} \quad (\text{Ec. 1})$$

Se identificaron los estados binodales experimentales con las concentraciones de sal más bajas y altas, y se utilizó la ecuación 1 para determinar las concentraciones binodales correspondientes del polímero. Así, se determinaron las concentraciones de los estados (x_{PP}^{min}, y_P^{max}) y B (x_{PP}^{max}, y_P^{min}). Se planteó la hipótesis de que las concentraciones situadas en la línea A-B permitían la formación de sistemas bifásicos. Para verificarlo, se identificaron cinco estados, denominados C, D, E, F y G, situados en esa línea (Figura S1). Para cada caso, se prepararon soluciones de 10 gramos a 25 °C, con PP y PEG 2000 en las concentraciones identificadas. Se añadió agrolita fermentada a cada unidad en una cantidad equivalente al 1.0 %. Los sistemas se dejaron reposar a 25±2 °C durante 12 h para permitir la formación de fases, una superior (*s*), de composición predominantemente polimérica, y otra inferior (*i*), de composición predominantemente salina. Las fases se separaron, se midió su volumen (V_t, V_b) con una probeta y se determinó la relación de volumen ($V_r = V_t/V_b$). Las fracciones líquidas separadas se colocaron en viales a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el contenido de proteínas solubles y la actividad enzimática, con las metodologías indicadas anteriormente. Se determinaron el coeficiente de partición de proteínas (k_p , adimensional), el coeficiente de partición de la actividad enzimática (k_e , adimensional), el rendimiento de separación en la fase superior (R , %), y el factor de purificación (P_f , adimensional) (Panajotova et al., 2017). Para ello, se utilizaron las expresiones descritas en la ecuación 2, donde $c_{p,t}$ y $c_{p,b}$ son las concentraciones de proteínas en las fases superior (*s*) e inferior (*i*), y A_s and A_i son las actividades enzimáticas (U/mL) en las mismas fases, respectivamente. Además, AE_t and AE_e son actividades

específicas (U/mg), relativas a la proteína soluble, en la fase superior y en el extracto sin purificar.

$$k_p = \frac{c_{p,s}}{c_{p,i}} \quad k_e = \frac{A_s}{A_i} \quad R = \frac{100}{(V_r k_e)^{-1} + 1} \quad P_f = \frac{AE_t}{AE_e} \quad (\text{Ec. 2})$$

4.2.5 Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la actividad amilasa

Se evaluaron los efectos del pH en el rango de 3 a 8 y de la temperatura en el rango de 30 a 80 °C sobre la actividad enzimática del extracto de la fase superior. Además, se evaluó el efecto de la concentración de almidón soluble en el rango de 0.5 a 3 g/L. A partir de los resultados, se planteó la hipótesis de la presencia de un fenómeno de inhibición por sustrato en la actividad enzimática, que se caracterizó mediante un modelo cinético. Se evaluó la velocidad de degradación enzimática del almidón (V_0 , g/L min) en el mismo rango de concentración de almidón ($[S]$) a las condiciones de temperatura y pH previamente determinadas como óptimas. Los resultados se analizaron en dos etapas. En primer lugar, se aplicó el modelo clásico de Michaelis-Menten (Ecuación 3) y se determinó la velocidad máxima de consumo de almidón (V_{max} , g/L min). A continuación, se ajustó el modelo de Andrews (Ecuación 4) (Segel, 1993) y se evaluaron la constante de Michaelis (K_M , g/L) y la constante de inhibición por sustrato (K_i , g/L). En ambos casos se aplicó el algoritmo de mínimos cuadrados no lineales (función *lsqnonlin.m*) de Matlab® (The Mathworks Inc., 2008).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (\text{Ec. 4})$$

4.2.6 Análisis de electroforesis y zimograma

Se aplicó el protocolo de Laemmli (1970). Se tomaron muestras del extracto extracelular tras 24 h de fermentación, así como de las fases superior e inferior de los sistemas ABE preparados con un 14.56 % de PP y un 24.32 % de PEG 2000. Se prepararon geles de poliacrilamida con concentraciones del 4.5 % y del 12.0 % para concentrar y separar las proteínas, respectivamente. Las proteínas de las muestras se concentraron y precipitaron con ácido tricloroacético al 10 % (p/v), y se mezclaron 100 μ L de esta solución con 200 μ L de la solución de ruptura. La mezcla se hirvió en un baño de agua María durante 5 min a una presión atmosférica de 77.993 kPa. A continuación, se inyectó una alícuota de 15 μ L de la mezcla en cada carril del gel de concentración. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara vertical (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) a un voltaje constante de 90 V aplicado al gel de concentración y 110 V aplicado al gel de separación, durante 1 h. El gel se tiñó con azul de Coomassie G-250 durante 1 h y, posteriormente, se destiñó en una solución de etanol y ácido acético durante 1 hora. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular en el rango de 11 a 245 kDa. La actividad de la amilasa se detectó tiñendo el gel de poliacrilamida *in situ*, al que se añadió una solución de almidón soluble al 0.2 % al gel de separación. Después de la electroforesis, el gel se incubó en tampón de fosfato de sodio (20 mM, pH 6.9, 6.7 mM NaCl) a 40 °C y 50 rpm durante 1 h. A continuación, el gel se tiñó con rojo Congo al 0.1 % (p/v) durante 30 min y se decoloró con NaCl (1 M) (Wang et al., 2016).

4.2.7 Análisis de datos

La separación de proteínas y amilasa se analizó utilizando un diseño completamente al azar (DCA), en el que los estados a lo largo de la línea A-B constituyeron la fuente de variación. Para evaluar el efecto de la temperatura, el pH y la concentración de almidón sobre la actividad enzimática, también se utilizó un DCA, considerando los niveles de cada variable como fuentes de variación. El análisis de varianza y las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba de Tukey, con un nivel de significación de 0.05.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) promovió el crecimiento de *A. niger* en columnas, con hifas grises y la posterior formación de esporas negras. El proceso puede controlarse observando los cambios en el consumo de oxígeno (Chysirichote et al., 2024) o la producción de dióxido de carbono (Maschke et al., 2022). En este caso, la concentración de CO₂ en el aire de escape aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) hasta el 0.34 % (± 0.01 , v/v) a las 24 h (Figura 9a), lo que indica una mayor actividad respiratoria (Yu et al., 2024), mientras que la disponibilidad de almidón favoreció la producción de amilasa (Olaniyan et al., 2025). Entre las 36 y las 60 h, los niveles de CO₂ se estabilizaron entre el 0.31 % y el 0.32 %, probablemente debido a la limitación de nutrientes y a la reducción de la difusión de oxígeno causada por el aumento de la densidad micelial (Perwez y Al Asheh, 2025). Después de 72 h, la concentración de CO₂ disminuyó ($p \leq 0.05$), lo que indica el inicio de la esporulación. En este proceso, el pH mostró una disminución significativa ($p \leq 0.05$), de 5.77 a 4.63 durante las primeras 36 h (Figura 9b), asociada a la producción de ácidos orgánicos como el cítrico y el oxálico, típicos del metabolismo de *A. niger* (Tan et al., 2025). Posteriormente, la estabilización del pH reflejó una reducción de la actividad metabólica y la entrada en la fase estacionaria.

La humedad del sustrato varió entre el 53 % y el 54 % (Figura 9c), sin diferencias significativas ($p > 0.05$) durante la fermentación, lo que favoreció el desarrollo de *A. niger*, que requiere una humedad característica de entre el 50 % y el 60 % (DSouza et al., 2021). El contenido inicial de azúcar en el medio fue de 11.25 mg/mL, pero disminuyó ($p \leq 0.05$) a 2.11 mg/mL en las primeras 12 horas y continuó disminuyendo, aunque a un ritmo más lento, con una tendencia lineal, hasta 0.3 mg/mL (Figura 9d). Este comportamiento sugirió que el hongo pasó por dos etapas. En primer lugar, se produjo un periodo de activación/adaptación, con un alto consumo de azúcar y un elevado crecimiento micelial. En segundo lugar, se alcanzó una fase estacionaria, en la que la disponibilidad de azúcar fue

suficiente para mantener la actividad metabólica y la síntesis de enzimas hidrolíticas, principalmente amilasas (Olaniyan et al., 2025).

De manera consistente, el contenido de proteínas mostró un aumento significativo ($p \leq 0.05$) durante las primeras 24 h, alcanzando 0.75 ± 0.02 mg/mL, seguido de una estabilización en 0.66 ± 0.03 mg/mL (Figura 9e). Este comportamiento se asoció con la síntesis de proteínas extracelulares (Yu et al., 2024), incluyendo enzimas y componentes celulares liberados por autólisis parcial o lisis micelial. Del mismo modo, la actividad específica aumentó hasta un máximo después de 24 h de fermentación (7.42 ± 0.13 UI/mL) (Figura 9f), lo que sugiere que durante esta etapa el hongo utilizó sus reservas de energía (glucosa) y los nutrientes fácilmente disponibles para la formación de biomasa, al tiempo que produjo enzimas en respuesta a la disponibilidad de almidón. Durante este periodo, la producción de enzimas alcanzó su máximo porque el hongo necesitaba la hidrólisis de sustratos complejos para generar fuentes de carbono asimilables para su crecimiento. A medida que el almidón se agotaba, el hongo entró en una etapa de limitación de nutrientes y la producción de enzimas disminuyó debido a la ausencia de sustratos complejos. Después de 36 h, la actividad enzimática se estabilizó, probablemente debido al agotamiento del sustrato, la acumulación de metabolitos secundarios o los mecanismos de inhibición por retroalimentación (Honfoga et al., 2025). El género *Aspergillus* se utiliza ampliamente en procesos de fermentación en estado sólido. Se ha informado que las actividades enzimáticas obtenidas con *A. niger* son inferiores a las logradas con *A. fumigatus* y comparables a las obtenidas con *A. oryzae*, lo que indica un efecto dependiente de la cepa. Además, en este estudio se utilizó agrolita como soporte inerte, ya que informes anteriores indicaban que ofrecía un mejor rendimiento que materiales como la espuma de poliuretano o la piedra volcánica (Londoño-Hernández et al., 2024).

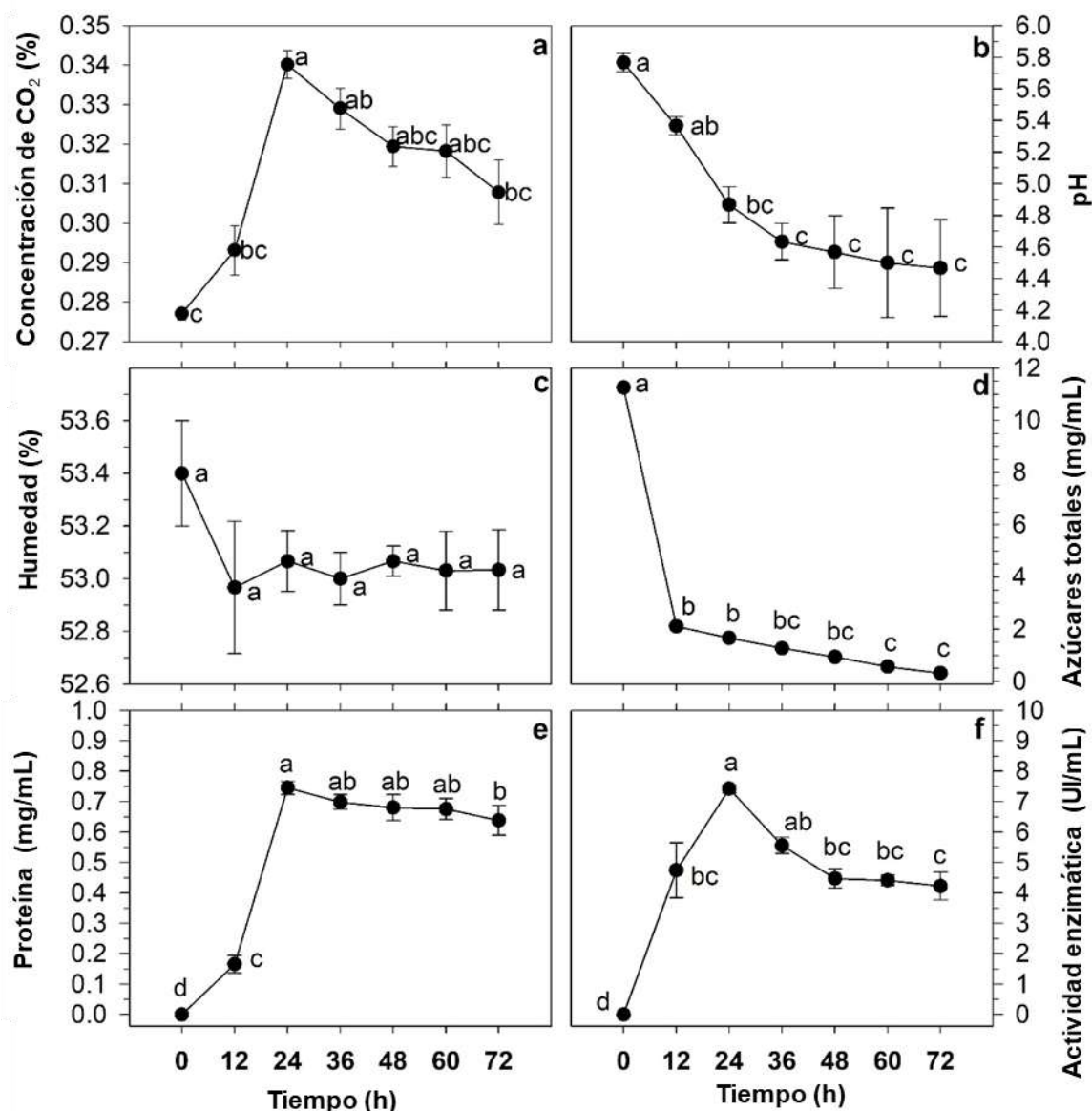


Figura 8. Variación de los parámetros fisicoquímicos durante la fermentación. Letras iguales indican diferencia no significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

4.3.2 Separación de enzimas mediante sistemas acuosos bifásicos

El método del punto de turbidez identificó concentraciones binodales delimitadoras en las que el PEG 2000 y el fosfato de potasio formaban una solución homogénea de una sola fase o se separaban en dos fases inmiscibles. Los datos binodales se ajustaban bien ($r^2 = 0.9977 \pm 0.0002$) a la ecuación 1, con constantes $k_1 = 80.0303 (\pm 4.8307)$, $k_2 = -0.4698 (\pm 0.0314)$ y $k_3 = 4.3995 \times 10^{-4}$

($\pm 2.6784 \times 10^{-5}$). La ecuación 1 definió una curva binodal, cuyas concentraciones límite experimentales (fosfato de potasio, PEG 2000) correspondían a los estados A (2.7452, 36.4138 %) y B (38.9925, 0.4832 %) (Figura 10). Las concentraciones en la curva binodal correspondían a condiciones de turbidez, lo que indicaba la capacidad máxima de solvatación del agua para disolver el fosfato de potasio y el PEG 2000. La sal o el polímero adicionales indujeron la separación de fases en una fase superior rica en polímeros y una fase inferior salina, donde las interacciones entre los iones de fosfato de potasio (K^+ y HPO_4^{2-}) y los grupos etoxilo del PEG ($-CH_2CH_2O-$) permitieron la separación parcial de la sal y el polímero (Jardim et al., 2025). Se planteó la hipótesis de que los estados situados en la línea experimental A-B (Figura 10) formaban sistemas binodales; por lo tanto, se evaluó la separación enzimática en cinco estados a lo largo de esta línea (C, D, E, F, G; Cuadro 1).

La relación de volumen (V_r) disminuyó al aumentar la concentración de sal y disminuir la concentración de polímero en la transición del estado C (2.86 ± 0.03) al estado G (0.28 ± 0.01), debido a que los iones de sal interactúan preferentemente con las moléculas de agua, lo que reduce la solubilidad del PEG (Yang et al., 2025). Sin embargo, la partición de proteínas (k_p ; ecuación 2) indicó que la concentración de proteínas era menor en la fase superior, lo que sugiere la migración de dicho componente a la fase inferior de los sistemas bifásicos. Por el contrario, la partición de la actividad enzimática (k_e ; ecuación 2) indicó una mayor concentración de amilasas en la fase superior, lo que sugiere un efecto selectivo del efecto de salinización. En este sentido, el valor más alto de la partición enzimática correspondió a las condiciones D y G (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de la purificación de amilasas con PEG 2000 y fosfato de potasio.

Condición	PP (%)	PEG 2000 (%)	Relación volumétrica (V_r)	Coeficiente de partición proteica (k_p)	Coeficiente de partición enzimática (k_e)	Rendimiento (%)	Factor de purificación (P_f)
C	9.56	29.32	2.86 ± 0.03 a	0.92 ± 0.08 a	0.59 ± 0.08 b	62.68 ± 3.60 ab	0.60 ± 0.06 b
D	14.56	24.32	1.43 ± 0.04 b	0.60 ± 0.11 c	3.06 ± 1.03 ab	80.48 ± 5.19 a	1.50 ± 0.14 a
E	19.56	19.32	0.84 ± 0.02 c	0.65 ± 0.03 bc	1.48 ± 0.29 b	55.28 ± 4.50 bc	1.29 ± 0.27 a
F	24.56	14.32	0.45 ± 0.00 d	0.87 ± 0.12 ab	1.38 ± 0.50 b	37.60 ± 9.54 c	0.52 ± 0.10 b
G	29.56	9.32	0.28 ± 0.01 e	0.44 ± 0.06 c	5.90 ± 2.15 a	60.86 ± 11.16 ab	0.54 ± 0.37 ab

En general, las enzimas tienen una mayor afinidad por la fase rica en polímero debido a las interacciones hidrofóbicas, y el incremento de la concentración de sal favoreció este comportamiento, provocando una mayor acumulación de enzimas en esa fase (Segaran y Chua, 2024). De manera congruente, la eficiencia de recuperación enzimática (R ecuación 2) en la fase superior disminuyó con la transición del estado D al estado G (Cuadro 1). Sin embargo, la mayor variación se produjo en la transición del estado D al estado F, lo que sugiere que las amilasas pueden recuperarse de la fase superior de los sistemas bifásicos, y el estado más eficiente correspondió al de composición D, con un 14.56 % de PP y un 24.32 % de PEG.

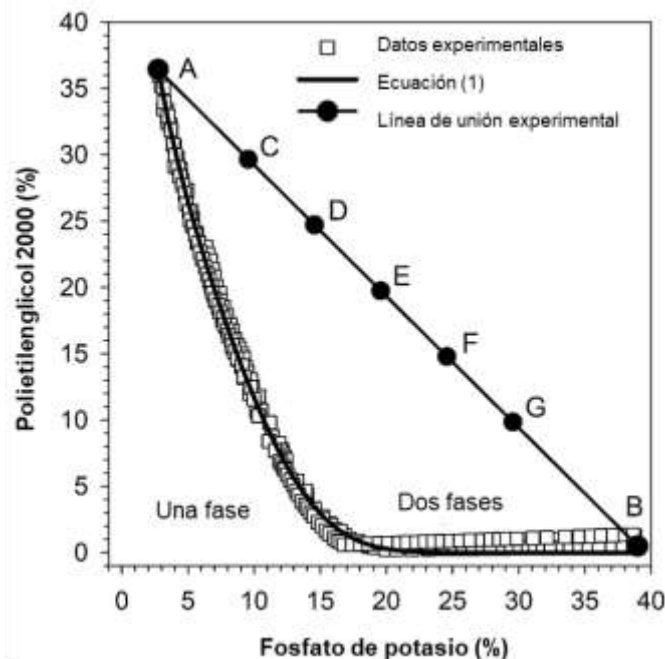


Figura 9. Diagrama binodal para la mezcla de fosfato de potasio y polietilenglicol 2000. Estados A, B, C, D, E F y G: sistemas bifásicos evaluados.

4.3.3 Efecto del pH, la temperatura y la concentración de sustrato sobre la actividad amilasa

Las enzimas separadas con un sistema que tenía la composición del estado D aumentó hasta un máximo de 7398 (± 0.88) UI/mL cuando el pH varió entre 5.0 y 6.0 y luego disminuyó con valores de pH más altos (Figura 11a). La acción de las enzimas tiene un rango de pH óptimo en el que la estructura tridimensional y su sitio activo se encuentran en la conformación más favorable para la catálisis (Nelson y Cox, 2009). Sin embargo, a otros valores de pH, la ionización de los aminoácidos en el sitio activo puede inducir cambios conformacionales que reducen la eficiencia catalítica (Wang et al., 2025).

En el caso de la temperatura, la actividad enzimática aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) desde 26.71 (± 0.63) UI/mL a 30 °C, alcanzando un máximo de 54.28 (± 0.65) UI/mL entre 50 y 60 °C (Figura 11b). Este aumento se atribuyó a una mayor energía cinética de las enzimas y las moléculas del sustrato, lo que aumentó las colisiones efectivas y la velocidad de reacción (Nelson y Cox, 2009). A temperaturas más altas, la disminución de la actividad podría estar inducida

por la desnaturalización por calor, lo que provoca la pérdida de la estructura tridimensional nativa y la función catalítica (Ahmed et al., 2020).

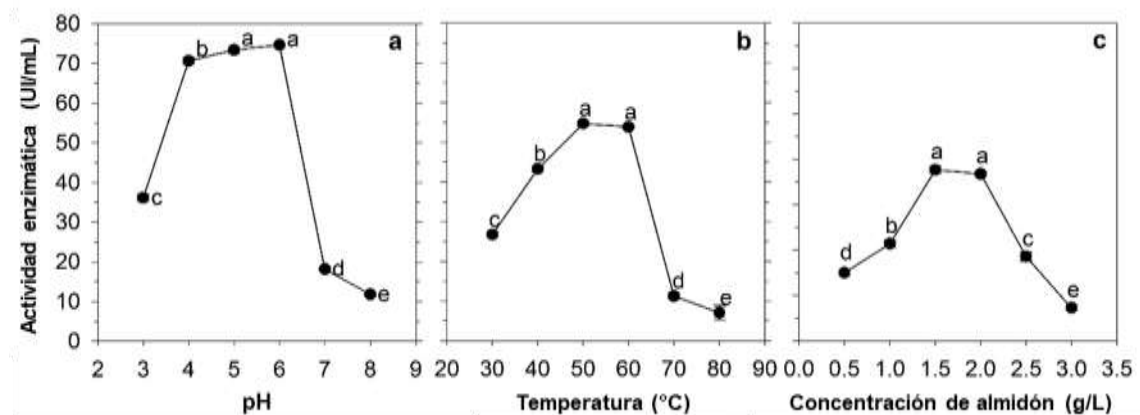


Figura 10. Efecto del pH (a), la temperatura (b) y la concentración de almidón (c) sobre la actividad amilasa. Letras iguales indican diferencia no significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

La relación con la disponibilidad del sustrato mostró un comportamiento similar, aumentando hasta un máximo de 47.21 (± 0.65) UI/mL a concentraciones de almidón entre 1.5 y 2.0 g/L, seguido de una disminución a niveles más altos de sustrato (Figura 11c). A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de almidón, ya que los sitios activos disponibles superan a las moléculas de sustrato; a concentraciones más altas, se produce la saturación de la enzima y la velocidad se vuelve máxima y constante (Nelson y Cox, 2009). Sin embargo, la presencia de un máximo seguido de una disminución de la actividad sugirió una inhibición por sustrato, en la que el exceso de sustrato se une a sitios no catalíticos o forma complejos enzima-sustrato menos eficientes (Haixia et al., 2024).

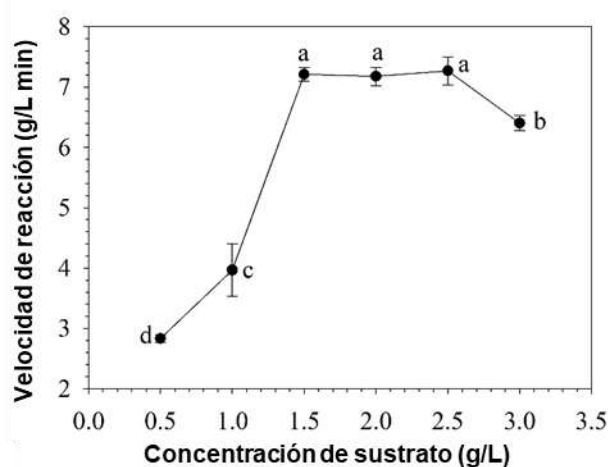


Figura 11. Relación entre la velocidad de reacción enzimática y la concentración del sustrato. Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras iguales indican una diferencia no significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

En este sentido, se evaluó la tasa de consumo de almidón en función de la concentración de polisacáridos (Figura 11) y los datos se ajustaron al modelo clásico de Michaelis-Menten (Ec. 3), obteniendo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.92 y una velocidad de reacción máxima (V_{max}) de $11.6394 (\pm 0.5812)$ g/L min. Posteriormente, los datos se ajustaron a la ecuación (4), mejorando el ajuste ($r^2 = 0.98$), lo que permitió determinar la constante de Michaelis ($K_M = 0.8750 \pm 0.0636$ g/L) y la constante de inhibición del sustrato ($K_i = 3.4300 \pm 1.1031$ g/L). Estos parámetros indicaron una afinidad moderada por el sustrato y una inhibición a concentraciones relativamente altas. Los resultados experimentales mostraron que la velocidad de reacción aumentaba a $[S] \approx 1.5$ - 2.5 g/L, pero disminuía a $[S] = 3.0$ g/L, un comportamiento no descrito por el modelo clásico de Michaelis-Menten, que predice una meseta asintótica. En cambio, se produjo una inhibición a medida que $[S]$ se acercaba a K_i , con una concentración óptima de almidón de 1.7324 g/L ($\sqrt{K_M K_i}$) (Segel, 1993). Los valores de K_M y V_{max} son comparables a los registrados en la base de datos de enzimas BRENDA (2025).

4.3.4 Análisis de electroforesis y zimograma

El análisis electroforético mostró bandas de proteínas de aproximadamente 60 y 63 kDa en el extracto extracelular (Figura 13, carril B). Mientras tanto, la fase

polimérica (superior) de los sistemas bifásicos acuosos mostró bandas de proteínas de mayor concentración, de aproximadamente 35, 60 y 63 kDa, lo que indica que en esa fase se concentraron y separaron diferentes amilasas.

Los pesos moleculares de las amilasas producidas por *Aspergillus* spp. son muy variables, oscilando entre 25 y 120 kDa (base de datos de enzimas BRENDA, 2025). El análisis de la fase inferior mostró una banda muy débil, lo que indica una baja concentración de proteínas. Por otro lado, el análisis del zimograma confirmó la actividad de la amilasa. Se observaron dos bandas activas en el extracto extracelular (Figura 13, carril C) y tres en la fase polimérica del sistema de purificación (Figura 13, carril E), lo que indica la presencia de tres enzimas asociadas a la actividad amilasa. Se planteó la hipótesis de que estaban presentes la α -amilasa, la β -amilasa y la glucoamilasa, formando un consorcio enzimático, aunque no se detectó actividad en la fase salina (Figura 13, carril G).

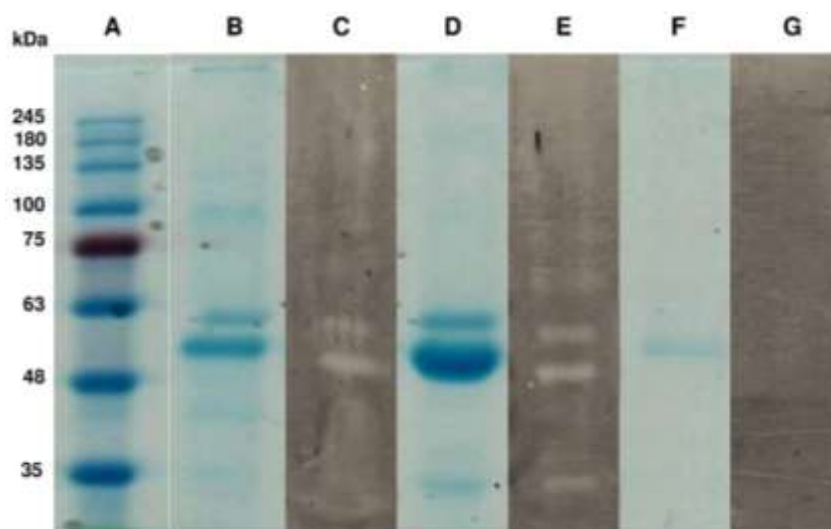


Figura 12. Análisis de las amilasas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y nativa. Carril A: proteínas estándar (kDa); Carril B y C: extracto extracelular; Carril D y E: amilasas de la fase polimérica del sistema ATPE; Carril F y G: amilasas de la fase salina del sistema ATPE.

4.4 Conclusiones

El uso de la fermentación en estado sólido (FES) asistida por extracción acuosa bifásica mostró potencial para producir y purificar parcialmente amilasas sin

necesidad de equipos sofisticados, por lo que su implementación industrial puede llevarse a cabo de inmediato. El uso de *Aspergillus niger* como agente productor de enzimas y agrolita como soporte inerte favoreció la implementación de la FES. El uso de polietilenglicol y fosfato de potasio permitió desarrollar sistemas bifásicos que favorecieron la purificación parcial de las enzimas sin pérdida de actividad catalítica. Este es el primer trabajo que abordó la producción y purificación parcial de amilasas combinando la fermentación en estado sólido y la extracción bifásica acuosa.

4.5 Literatura citada

- Abduh, M. Y., Alyssa, S., Butar, R. A., Pane, I. S. S., Melani, L., & Puad, N. I. M. (2025). Effects of solid-state fermentation using *Aspergillus niger* on yield, total phenolic content, and antioxidant activity of defatted rice bran extract. *Food Chemistry Advances*, 100957. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2025.100957>
- Ahmed, N. E., El Shamy, A. R. and Awad, H. M. 2020. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bulletin of the National Research Centre* 44(1): 109. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00363-3>
- Biz, A., Finkler, A. T. J., Pitol, L. O., Medina, B. S., Krieger, N. and Mitchell, D. A. 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 111: 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007>
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRENDA Enzyme Database. 2025. N. <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- Chauhan, A. S., Kumar, C. and Tiwari, R. 2025. Molecular characterization and protein purification of α -galactosidase from *Penicillium citrinum* M(A79) for its industrial applications. *Molecular Biology Reports* 52(1): 746. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10850-3>
- Chysirichote, T., Sakoolkaew, P. and Klinthong, W. 2024. Correlation of oxygen consumption with growth and red pigment production of *Monascus purpureus* in solid state fermentation of rice. *International Food Research Journal* 31(2): 477–485. <https://doi.org/10.47836/ifrj.31.2.18>

- Cui, H., Ji, Y., Chang, Y., Yu, Z., Wei, F., Zhang, B., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, R. and Wang, S. 2026. Comparative assessment of physicochemical and functional properties of chestnut protein obtained by different extraction methods. *Food Hydrocolloids* 171: 111844. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111844>
- Dai, S., Eyles, A., Li, C., Wu, Q. and Close, D. C. 2025. Isolation and structural characterization of a novel β -fructan with potent α -amylase inhibitory activity from *Polygonatum multiflorum*. *Carbohydrate Polymers* 369: 124307. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124307>
- DSouza, G. C., Sheriff, R. S., Ullanat, V., Shrikrishna, A., Joshi, A. V., Hiremath, L. and Entoori, K. 2021. Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions. *Heliyon* 7(5): e07008. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07008>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y. and Luna-Morales, C. del C. 2016. Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology* 111: 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.004>
- Haixia, Z., Yongxin, S., Xijuan, Y., Qiao, W., Li, C., XueBo, W. and Zhiguang, C. 2024. Analysis of the interaction between double-helix starch molecule and α -amylase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 94: 103658. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103658>
- Hernández-Castillo, M. I., Hernández-Navarrete, A., Jiménez-Montejo, F. E., Cruz-López, M. del C., Hidalgo-Lara, M. E. and López y López, V. E. 2019. Aprovechamiento de almidón de cebada de mala calidad para la producción de enzimas amilolíticas por *Aureobasidium pullulans*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 35(2): 435–446. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.02.14>
- Honfoga, J. N. B., Nascimento, P. A., Ferreira, A. N., da Silva, E. C., Bauer, L. C., Teixeira, J. M., Santana, N. B. and Bonomo, R. C. F. 2025. Production and characterization of L-asparaginase by *Aspergillus niger*: A sustainable use of pitaya (*Hylocereus* spp.) by-products. *Sustainable Chemistry for the Environment* 10: 100255. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2025.100255>
- Hua, D., Hendriks, W. H., Xiong, B. and Pellikaan, W. F. 2022. Starch and cellulose degradation in the rumen and applications of metagenomics on ruminal microorganisms. *Animals* 12(21): 3020. <https://doi.org/10.3390/ani12213020>
- Isabel, J. B. and Premalatha, M. 2025. Harnessing amylase producing novel bacterial strains from industrial waste: A bioprocessing and optimization

- approach. *International Journal of Biological Macromolecules* 322: 146769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146769>
- Jardim, M. F., Muniz, I. de C. B., Nascimento, P., Sampaio, V. S., Nascimento, K. S. do, Neto, J. C. do S., da Silva, I. B., Fontan, R. da C. I., Cavada, B. S. and Ferreira Bono, R. C. 2025. Liquid–liquid equilibrium data of aqueous two-phase systems formed by PEG + potassium phosphate + water: thermodynamic modeling and partition study of *Canavalia bonariensis* lectin. *Journal of Chemical & Engineering Data* 70(6): 2453–2465. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5c00111>
- Jiménez-Velázquez, P., Valle-Guadarrama, S., Alia-Tejacal, I., Salinas-Moreno, Y., García-Cruz, L., Pérez-López, A. and Guerra-Ramírez, D. 2020. Separation of bioactive compounds from epicarp of ‘Hass’ avocado fruit through aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Processing* 123: 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.004>
- Khan, B. M., Cheong, K. L. and Liu, Y. 2019. ATPS: “aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(19): 3165–3178. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1486283>
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Londoño-Hernández, L., García-Gómez, M. de J., Huerta-Ochoa, S., Polanía-Rivera, A. M., Aguilar, C. N. and Prado-Barragán, L. A. 2024. Effect of glucose concentration on the production of proteolytic extract by different strains of *Aspergillus* under solid-state fermentation. *Fermentation* 10(2): 97. <https://doi.org/10.3390/fermentation10020097>
- Lu, Y., Jiang, L., Yu, Y., Wang, D., Sun, W., Liu, Y., Yu, J., Zhang, J., Wang, K., Hu, H., Wang, X., Ma, Q. and Wang, X. 2022. Liquid-liquid triboelectric nanogenerator based on the immiscible interface of an aqueous two-phase system. *Nature Communications* 13(1): 5316. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33086-2>
- Maschke, R. W., John, G. T. and Eibl, D. 2022. Monitoring of oxygen, pH, CO₂, and biomass in smart single-use shake flasks. *Chemie Ingenieur Technik* 94(12): 1995–2001. <https://doi.org/10.1002/cite.202200094>
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A. and Asenjo, J. A. 1998. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B* 711: 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X)
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 1(2): 127–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)

- Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2009. *Lehninger principles of biochemistry* (5th edn). New York: W.H. Freeman and Company.
- Olaniyan, S. A., Hussein, J. B., Oke, M. O., Akinwande, B. A., Workneh, T. S., Ayodele, M. and Adeyemi, I. A. 2025. Integrated bioprocessing of cassava residues for enzymatic starch recovery, citric acid production, and effluent detoxification. *Scientific Reports* 15(1): 21433. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-06841-w>
- Panajotova, H., Strinska, H., Gandova, V., Dobрева, V., Zhekova, B. and Dobrev, G. 2017. Purification of lipase from *Aspergillus carbonarius* NRRL369 by ATPS PEG/potassium phosphate. *Bulgarian Chemical Communications* 49: 130–136.
- Perwez, M. and Al Asheh, S. 2025. Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. *Biotechnology Reports* 45: e00873. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00873>
- Riahi, A. and Bijarchi, M. A. 2025. Assessing biocompatible aqueous two-phase systems for swift, continuous purification of α -amylase through optimization of salt and polymer phases using microfluidic platforms. *Journal of Molecular Liquids* 426: 127182. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.127182>
- Segaran, A. and Chua, L. S. 2024. Review of recent applications and modifications of aqueous two-phase system for the separation of biomolecules. *International Journal of Biological Macromolecules* 276: 133856. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133856>
- Segel, I. H. 1993. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: Wiley-Interscience.
- Shen, H., Hao, M. and Yu, S. 2025. A new β -amylase detection strategy based on encapsulated enzyme in magnetic layered double hydroxide with high sensitivity and simplified workflow. *Talanta* 292: 127940. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127940>
- Tan, Y., Zhang, Y., Su, J., Yu, H., Wang, D. and Xue, X. 2025. Improving citric acid production in *Aspergillus niger* by overexpression of citrate synthase with strong promoter. *Process Biochemistry* 156: 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.05.005>
- The Mathworks Inc. 2008. Optimization Toolbox™ 4 User's Guide. Natick, MA, USA: The Mathworks Inc.
- Wang, S., Lin, C., Yun, L., Shen, Z., Jeyaseelan, J. and Qin, W. 2016. Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 7: 1–10.
- Wang, Z., Wei, B., Sui, Y., Jiang, L. and Liang, H. 2025. Rational truncation of β -glucosidase N-terminus boosts thermo-pH tolerance for improved biocatalytic production of ginsenoside C-K. *Food Bioscience* 72: 107502. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107502>

- Yang, Z., Wang, J., Wang, H., Xie, H., Zhang, Y. and Wang, M. 2025. Simultaneous extraction and purification of polysaccharides and proteins from *Pleurotus ostreatus* using an aqueous two-phase system. *Journal of Food Science* 90(1): e17674. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17674>
- Yu, L., Wang, T., Wang, B. and Pan, L. 2024. The mechanism of short hypha formation and high protein production system mediated by cell wall integrity signaling pathway in *Aspergillus niger*. *International Journal of Biological Macromolecules* 283: 137413. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137413>
- Zheng, L., Jiang, B. and Wu, Y. 2025. Maltodextrin production: Challenges and advances in enzymatic and metabolic synthesis for controlled polymerization of degree. *Food Reviews International* 41(7): 2094–2112. <https://doi.org/10.1080/87559129.2025.2469593>

5 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CEBADA

Resumen

Se evaluó el efecto del pretratamiento enzimático con amilasas sobre la germinación de semillas de cebada. Se aplicaron amilasas a semillas de cebada antes de su germinación; 4 U g^{-1} , a 40°C y durante 24 h. Se monitoreó el impacto del pretratamiento sobre la tasa de germinación, el contenido de azúcares totales, actividad amilasa y proteína soluble. Los resultados mostraron un incremento significativo en el porcentaje de germinación, de 81.00 % en el tratamiento control a 85.67 % con el pretratamiento enzimático. Además, se observó incremento en el contenido de azúcares totales, de 1.41 a 1.66 mg mL^{-1} en las semillas tratadas con amilasas, lo que podría resultar en una mayor eficiencia en el proceso de fermentación. Este pretratamiento también afectó positivamente la actividad amilasa, de 5.40 a 8.29 UI mL^{-1} , lo que sugiere que el uso de amilasas exógenas es una estrategia prometedora para optimizar el malteo de cebada.

Palabras clave: consorcio enzimático, amilasas, malteo, fermentación en medio sólido.

EFFECT OF ENZYMATIC PRETREATMENT ON THE GERMINATION OF BARLEY SEEDS

Abstract

The effect of enzymatic pretreatment with amylases on barley seed germination was evaluated. Amylases were applied to barley seeds prior to germination at 4 U g⁻¹ at 40 °C for 24 h. The impact of pretreatment on germination rate, total sugar content, amylase activity, and soluble protein was monitored. The results showed a significant increase in the germination percentage, from 81.00 % in the control treatment to 85.67 % with enzymatic pretreatment. In addition, an increase in total sugar content was observed, from 1.41 to 1.66 mg mL⁻¹ in seeds treated with amylases, which could result in greater efficiency in the fermentation process. This pretreatment also positively affected amylase activity, from 5.40 to 8.29 UI mL⁻¹, suggesting that the use of exogenous amylases is a promising strategy for optimizing barley malting.

Keywords: enzyme consortium, amylases, malting, solid-state fermentation.

Doctoral Thesis. Graduate Program in Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M.C. Gabriel Vega Ramírez

Thesis director: Dr. Salvador Valle Guadarrama

5.1 Introducción

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una de las principales materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza, y su malteo es un proceso clave en la producción de esta bebida, ya que convierte el almidón almacenado en la semilla en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas. Tradicionalmente, este proceso incluye etapas como remojo, germinación, secado y tostado (Prado et al., 2021). Durante la germinación se activan diversas enzimas endógenas, particularmente amilasas, que desempeñan un papel crucial en la hidrólisis de almidón en azúcares simples como la glucosa y la maltosa (Gu et al., 2025). La actividad enzimática durante el malteo determina no solo la eficiencia de la hidrólisis del almidón, también repercute en las características organolépticas y fermentables del producto final (Windes et al., 2020).

En años recientes, la aplicación de pretratamientos enzimáticos como el uso de amilasas exógenas ha generado interés como estrategia para mejorar la eficiencia del malteo. El pretratamiento enzimático con amilasas exógenas puede facilitar la hidrólisis del almidón durante la germinación, reduciendo el tiempo necesario para la activación enzimática y mejorando la conversión de almidón a azúcares fermentables. Este enfoque promete no solo una mayor eficiencia en la disponibilidad de azúcares, sino también la reducción del tiempo de malteo y una posible mejora en el perfil de proteínas y enzimas resultantes en la malta (Chen et al., 2024).

El uso de amilasas exógenas, específicamente amilasas, como un tratamiento previo a la germinación, ha demostrado ser eficaz para aumentar la tasa de conversión de almidón, lo que podría resultar en malta de mayor calidad, con un perfil de azúcares y aminoácidos optimizados para la fermentación (Avezum et al., 2022). Sin embargo, la eficacia de este pretratamiento depende de factores, como el tipo de enzima utilizada, la concentración, la temperatura y el tiempo de exposición, lo que resalta la necesidad de una investigación más detallada sobre cómo estos factores pueden afectar tanto el rendimiento como las propiedades de la cebada malteada.

En este trabajo se evaluó el efecto del pretratamiento enzimático con un consorcio de amilasas sobre el proceso de germinación de cebada, centrándose en cómo este tratamiento influye en la tasa de germinación, el contenido de azúcares totales y el perfil enzimático de la malta resultante. A través de este estudio, se buscó determinar si el pretratamiento enzimático con amilasas puede ser una herramienta eficaz para optimizar los procesos de malteo.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Productos químicos

Se utilizó albúmina de suero bovino, glucosa, almidón soluble, ácido 3,5-dinitrosalicílico adquiridos con la empresa Sigma-Aldrich Company (Darmstadt, Alemania). Se usó hipoclorito de sodio (NaClO), ácido cítrico y citrato de sodio, ácido sulfúrico y ácido fénico adquiridos con la empresa Química Suastes, S.A. de C.V., México.

5.2.2 Material vegetal y extracto enzimático

Se utilizaron semillas de cebada sin descascarillar, var. Esperanza, recolectadas en Calpulalpan, Tlaxcala, México. Se utilizó un consorcio enzimático de amilasas liofilizado, el cual se preparó a una concentración de 4 UI mL⁻¹, producidas a través de un proceso de fermentación en estado sólido y purificadas parcialmente con extracción acuosa bifásica, como se indica en el Capítulo 4.

5.2.3 Preparación de las semillas

100 g de semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % (v/v), en proporción 1:3 (p/v), durante 5 min. Se llevaron a cabo enjuagues sucesivos con agua destilada hasta alcanzar pH de 7.0, el cual se midió con un potenciómetro (HI8424, Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, USA), esto para eliminar los residuos de hipoclorito. La muestra se dividió en dos grupos. Grupo control (C), las semillas se remojaron con agua destilada, en una proporción de 1:2 (p/v) durante 1 h a 40 °C y grupo con pretratamiento enzimático

(Pe), las semillas se mezclaron con el extracto enzimático (4 UI mL⁻¹), en una proporción sólido-líquido de 1:2 (p/v) y se remojaron durante 1 h a 40 °C. Las condiciones de reacción enzimática fueron en amortiguador de fosfato 20 mM, pH 6.0 y CaCl 6.7 mM.

5.2.4 Porcentaje de germinación

A partir de las semillas preparadas, se tomaron al azar, 100 semillas y fueron colocadas en placas Petri con papel filtro húmedo, se monitoreó la aparición visible de raíz durante cinco días y a 25 °C. El porcentaje de germinación (G) se determinó al dividir el número de semillas germinadas (N) entre cien.

$$G = \frac{N}{100} * 100$$

5.2.5 Preparación de extracto

Las semillas germinadas se molieron en un procesador de alimentos Nutribullet (Pro+ 1200, Ciudad de México, México) con agua destilada, en una relación 1:2 (p/v) y se congeló a -20 °C para posteriormente determinar la actividad amilasa, el contenido de proteína y azúcares totales.

5.2.6 Contenido de almidón

El extracto se sometió a determinación de contenido de almidón con la metodología descrita por Bahdanovich et al. (2022), apoyada con una curva estándar de almidón soluble de 1-10 mg mL⁻¹ y los resultados se reportaron en porcentaje.

5.2.7 Azúcares totales

Se empleó la metodología descrita por Dubois et al. (1956), con algunas modificaciones. Para ello, se adicionaron 0.1 mL de la muestra a un tubo, seguido de 0.5 mL de fenol al 5 % (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Los

resultados se interpolaron en una curva estándar de glucosa y se expresaron en mg mL^{-1} .

5.2.8 Actividad amilasa

La actividad amilasa se determinó forma indirecta con la producción de azúcares reductores (Miller, 1960), con algunas modificaciones y una curva estándar de glucosa ($0.1\text{-}0.1 \text{ mg mL}^{-1}$). Una unidad internacional (UI) de actividad amilasa se definió como la cantidad de enzima que produce un micromol de glucosa por min a 37°C y pH 6.9.

5.2.9 Proteína insoluble

Se cuantificó por el método de Bradford (1976). Los resultados se interpolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino ($0.1\text{-}1 \text{ mg mL}^{-1}$) y los resultados se expresaron en porcentaje.

5.2.10 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se utilizó un diseño completamente al azar. Se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias de tratamientos, con nivel de significancia de 0.05. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Los análisis se realizaron con el programa SAS (SAS Institute Inc. 1999).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Germinación

El pretratamiento enzimático incrementó de manera significativa ($p \leq 0.05$) la tasa de germinación de la cebada (Cuadro 2), de un $81.00 \pm 2.0 \%$ en el control, a un $85.67 \pm 2.08 \%$ en las semillas tratadas con amilasas. La absorción de agua durante la imbibición es un paso clave para activar las reacciones metabólicas en las semillas (Reed et al., 2022). El agua de remojo, al incluir amilasas exógenas, facilitó el ingreso de estas a través de la testa al interior del embrión tras el ablandamiento de estructuras de la cubierta seminal. Este proceso fue

acompañado de una activación de las enzimas endógenas propias de la semilla, quienes participan naturalmente en la hidrólisis de reservas, como el almidón (Klupczyńska & Pawłowski, 2021). La presencia de amilasas exógenas acelera la hidrólisis del almidón, lo que hace que las reservas energéticas estén disponibles desde etapas tempranas del proceso germinativo y la acción sinérgica entre las amilasas exógenas y endógenas permitió que el proceso de movilización de reservas ocurriera de manera más eficiente, lo que redujo el tiempo necesario para alcanzar un metabolismo óptimo y favorecer un desarrollo más rápido del embrión (Fu et al., 2024).

5.3.2 Almidón y azúcares totales

Durante el proceso de germinación, se observaron cambios significativos en el contenido de almidón y azúcares totales en las semillas. El contenido de almidón en las semillas pretratadas disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$), alcanzando un $51.81 \pm 0.07 \%$, en comparación con el control, que presentó un $53.24 \pm 0.10 \%$ (Cuadro 2). Por otro lado, el contenido de azúcares totales mostró un incremento significativo ($p \leq 0.05$), pasando de $1.41 \pm 0.00 \text{ mg mL}^{-1}$ en las semillas control a $1.66 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ en las semillas pretratadas. De acuerdo con Al-Ansi et al. (2020), el contenido de almidón disminuye considerablemente durante este proceso. Paralelamente, el contenido de azúcares solubles incrementa debido a la acción de enzimas hidrolíticas, en particular de las amilasas, quienes degradan el almidón en azúcares simples como glucosa y maltosa (Fu et al., 2024). Este fenómeno ha sido igualmente descrito por Gu et al. (2025), quienes destacan el papel crucial de estas enzimas en la movilización de carbohidratos durante la germinación.

5.3.3 Actividad específica

Las semillas tratadas con enzimas exógenas mostraron incremento significativo ($p \leq 0.05$) de la actividad amilasa ($0.39 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$), en contraste con las semillas control ($0.26 \pm 0.00 \text{ U mg}^{-1}$) (Cuadro 2). Esta diferencia era esperada, ya que el tratamiento contribuyó con la activación de las enzimas endógenas (De

Schepper et al., 2020) y a la vez introdujo enzimas exógenas que catalizaron la hidrólisis del almidón. En un trabajo similar, Chen et al. (2024) reportaron un incremento en la actividad enzimática durante la germinación de semillas de arroz integral tratadas con enzimas, ultrasonido y combinaciones de ambos. Estos tratamientos mejoraron la movilización de carbohidratos y promovieron una germinación más eficiente, lo que resalta el potencial de las estrategias enzimáticas en la mejora fisiológica de semillas.

5.3.4 Proteína soluble

Se observó diferencia significativa ($p\leq0.05$) (Cuadro 2) en el contenido de proteína entre las semillas control (5.24 ± 0.04 %) y las semillas pretratadas (5.35 ± 0.02 %). Este incremento puede explicarse a los cambios metabólicos que ocurren durante la germinación, proceso en el cual se activa la degradación de proteínas de reserva y, simultáneamente, se estimula la síntesis de nuevas proteínas funcionales y estructurales (Cao et al., 2022). De acuerdo con Ortiz et al. (2021), el aumento en el contenido proteico durante la germinación es el resultado de un balance dinámico entre estos dos procesos. Este equilibrio es esencial para garantizar que el embrión cuente con los aminoácidos y péptidos necesarios para sostener la síntesis de enzimas, proteínas estructurales y otros compuestos requeridos durante la germinación.

Cuadro 2. Resumen de la caracterización de la germinación de semillas de cebada.

Parámetro	Control (C)	Pretratamiento enzimático (Pe)
Germinación (%)	81.00 ± 2.00 b	85.67 ± 2.08 a
Actividad específica (U mg ⁻¹)	0.26 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 a
Almidón (%)	53.24 ± 0.10 a	51.81 ± 0.07 b
Azúcares totales (mg mL ⁻¹)	1.41 ± 0.00 b	1.66 ± 0.01 a
Proteína soluble (%)	5.24 ± 0.04 b	5.35 ± 0.02 a

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p\leq0.05$).

5.4 Conclusiones

El tratamiento enzimático con amilasas endógenas promovió un incremento en la tasa de germinación de las semillas de cebada. Asimismo, favoreció el inicio de la germinación al mejorar la disponibilidad de azúcares simples para el desarrollo del embrión. Promovió la conversión de almidón en azúcares, mejora la tasa de germinación e incrementa el perfil enzimático de la malta. El uso de amilasas como pretratamiento enzimático representa una herramienta eficaz para optimizar los procesos de malteo. Sin embargo, una alta concentración de amilasas podría generar exceso de azúcares simples que altere el proceso normal de germinación o afecte la calidad final de la malta.

5.5 Literatura citada

- Al-Ansi, W., Mahdi, A. A., Al-Maqtari, Q. A., Mushtaq, B. S., Ahmed, A., Karrar, E., Mohammed, J. K., Fan, M., Li, Y., Qian, H., & Wang, L. (2020). The potential improvements of naked barley pretreatments on GABA, β -glucan, and antioxidant properties. *LWT*, 130, 109698. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109698>
- Avezum, L., Rondet, E., Mestres, C., Achir, N., Madode, Y., Gibert, O., Lefevre, C., Hemery, Y., Verdeil, J., & Rajjou, L. (2022). Improving the nutritional quality of pulses via germination. *Food Reviews International*, 39(9), 6011–6044. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2063329>
- Bahdanovich, P., Axelrod, K., Khlystov, A. Y., & Samburova, V. (2022). Optimized spectrophotometry method for starch quantification. *Analytica*, 3(4), 394–405. <https://doi.org/10.3390/analytica3040027>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (23), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cao, H., Duncan, O., & Millar, A. H. (2022). The molecular basis of cereal grain proteostasis. *Essays in Biochemistry*, 66(2), 243–253. <https://doi.org/10.1042/ebc20210041>
- Chen, B., Wang, X., Liu, H., Zhang, Y., Wu, S., Wang, C., Liu, C., & Qiao, Y. (2024). Effect of ultrasound-assisted enzyme pretreatment on γ -aminobutyric acid content, eating quality and starch properties of germinated brown rice. *Journal of Cereal Science*, 117, 103904. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.103904>

- De Schepper, C., Michiels, P., Buvé, C., Van Loey, A., & Courtin, C. (2020). Starch hydrolysis during mashing: A study of the activity and thermal inactivation kinetics of barley malt α -amylase and β -amylase. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117494. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117494>
- Dubois, M.; Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356. <https://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fu, D., Wu, W., Mustafa, G., Yang, Y., & Yang, P. (2024). Molecular mechanisms of rice seed germination. *New Crops*, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.ncrops.2024.100051>
- Gu, Z., Rao, J., & Chen, B. (2025). Application of flavoromics approach to evaluate aroma characteristics in malts: Current trends and future outlooks. *Trends in Food Science & Technology*, 104878. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.104878>
- Klupczyńska, E. A., & Pawłowski, T. A. (2021). Regulation of seed dormancy and germination mechanisms in a changing environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1357. <https://doi.org/10.3390/ijms22031357>
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., & Burton, A. L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-x)
- Ortiz, L. T., Velasco, S., Treviño, J., Jiménez, B., & Rebolé, A. (2021). Changes in the Nutrient Composition of Barley Grain (*Hordeum vulgare* L.) and of Morphological Fractions of Sprouts. *Scientifica*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/9968864>
- Prado, R., Gastl, M., & Becker, T. (2021). Aroma and color development during the production of specialty malts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4816–4840. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12806>
- Reed, R. C., Bradford, K. J., & Khanday, I. (2022). Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. *Heredity*, 128(6), 450–459. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00497-2>
- SAS Institute Inc. (1999). SAS/STAT® User's Guide, Version 8. Cary, NC: SAS Institute Inc
- Windes, S., Bettenhausen, H. M., Van Simaey, K. R., Clawson, J., Fisk, S., Heuberger, A. L., Lim, J., Queisser, S. H., Shellhammer, T. H., & Hayes, P. M. (2020). Comprehensive analysis of different contemporary barley genotypes enhances and expands the scope of barley contributions to beer flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(3), 281–305. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1843964>

6 CONCLUSIONES GENERALES

El malteo de semillas de cebada y la fermentación en estado sólido con *Aspergillus niger* son procesos viables para la producción de amilasas.

El proceso de malteo implementado permitió la máxima síntesis de amilasas a las 48 h.

El uso de agrolita como soporte inerte y almidón de cebada como sustrato en la fermentación en estado sólido permitió la síntesis de amilasas a las 24 h de fermentación.

El sistema de extracción acuosa bifásica, compuesto por polietilenglicol 2000 y sales de fosfato de potasio, permitió purificar parcialmente las amilasas, evidenciando alto rendimiento de recuperación y factor de purificación en la fase polimérica.

La caracterización bioquímica de las amilasas permitió determinar temperatura óptima de 40 °C y pH óptimo de 5 de las amilasas del proceso de malteo, mientras que las del proceso de fermentación presentaron temperatura de 50 y 60 °C y pH óptimo de 5 y 6.

La comparación de la caracterización bioquímica de las amilasas obtenidas mediante ambos procesos ofreció información sobre su actividad catalítica para su posterior aplicación en la germinación de semillas de cebada.

Este estudio aporta conocimientos relevantes para el diseño y optimización de procesos de producción enzimática aplicables en la industria agroalimentaria y biotecnológica, favoreciendo el desarrollo de tecnologías más sostenibles y eficientes.