

BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias · Universidad del Cauca

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LÍNEA

El Comité Editorial de Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial informa que este manuscrito ha cumplido los requisitos editoriales y científicos y ha sido aprobado para publicación, con base en los conceptos emitidos por los pares evaluadores. Se publica anticipadamente, en versión pdf, de manera provisional, con base en la última versión electrónica del manuscrito y sin haber sido sometido a los procesos de edición, diagramación y corrección de estilo.

La versión anticipada de este manuscrito puede ser descargada, usada y citada, aclarando que la versión definitiva que se va a encontrar en la plataforma de la revista, puede diferir de ésta e aspectos de forma.

Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae* inmovilizados para la producción de almidón modificado

***Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae* immobilized to produce modified starch**

***Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* imobilizados para a produção de amido modificado**

ALDANA-PORRAS, ALVARO-ESTEBAN¹; MONTOYA-YEPES, DIEGO-FERNANDO²;
MURILLO-ARANGO, WALTER³; MÉNDEZ-ARTEAGA, JHON-JAIRO⁴

RESUMEN

La modificación de polímeros naturales es llevada a cabo para ampliar la funcionalidad y usos industriales de los mismos. El uso de microorganismos como fuente enzimática proporciona protección a las biomoléculas frente a las condiciones del medio, reutilización, bajo costo, facilidad en su cultivo y aplicación. Este estudio se enfocó en la inmovilización de *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*, como fuente enzimática para la acilación e hidrólisis de almidón. Se

* Proyecto de origen: "Evaluación de las propiedades fisicoquímicas, funcionales y morfológicas de almidones nativos y esterificados obtenidos a partir de arroz cristal y granza de 3 variedades cultivadas en el Tolima". Financiación: Universidad del Tolima. Culminación: 30 de septiembre de 2018.

¹ Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT), Biólogo. Ibagué, Colombia.

² Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT), Biólogo. Ibagué, Colombia. ORCID: xxxxxxxxxxxxxxxx

³ Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT), Ph.D. Ciencias Químicas. Ibagué, Colombia. ORCID: xxxxxxxxxxxxxxxx

⁴ Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT), Ph.D. Ciencias Químicas. Ibagué, Colombia. ORCID: xxxxxxxxxxxxxxxx

Correspondencia: aealdanap@ut.edu.co

Cómo citar este artículo

ALDANA-PORRAS, ALVARO-ESTEBAN; MONTOYA-YEPES, DIEGO-FERNANDO; MURILLO-ARANGO, WALTER; MÉNDEZ-ARTEAGA, JHON-JAIRO. (2021). *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae* inmovilizados para la producción de almidón modificado. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 19, n. 2, 2021, p. xx-xx. Doi:

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 13 de Julio 2020

Aprobado para publicación:

utilizó el extracto de salvado de arroz y estropajo como soporte para su desarrollo, la acilación del polímero se verificó mediante IR y la determinación de ISA, IAA y PH. Se alcanzaron concentraciones de proteína de $30,7 \pm 0,3$ y $24,9 \pm 0,3$ (mg/cm³ de soporte) respectivamente, en el modelo de acilación, se observó una modificación química de los polímeros causada por las condiciones de reacción, obteniendo materiales con propiedades funcionales variables. En hidrólisis se logró un 40% de degradación, posibilitando la obtención de diferentes derivados de almidón. En este sentido, el desempeño en hidrólisis, la concentración proteica de los microorganismos, el estropajo como soporte y el extracto de salvado de arroz como medio inductor de enzimas, promueven este sistema como una alternativa económica para los procesos de modificación industrial.

PALABRAS CLAVE: Hidrólisis; Esterificación; Hongos inmovilizados; Estropajo; Biotecnología para el aprovechamiento de subproductos; Almidón.

ABSTRACT

The modification of natural polymers is carried out to expand their functionality and industrial uses. The use of microorganisms as an enzymatic source provides protection to biomolecules against environmental conditions, reuse, low cost, ease of cultivation and application. This study focused on the immobilization of *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*, as an enzymatic source for acylation and hydrolysis of starch. The extract of rice bran and scouring pad was used as support for its development, the acylation of the polymer was verified by IR and the determination of ISA, IAA and PH. Protein concentrations of $30,7 \pm 0,3$ and $24,9 \pm 0,3$ (mg/cm³ of support) were reached respectively, in the acylation model, a chemical modification of the polymers caused by the reaction conditions was observed, obtaining materials with variable functional properties. In hydrolysis, 40% degradation was achieved, making it possible to obtain different starch derivatives. In this sense, the performance in hydrolysis, the protein concentration of the microorganisms, the scouring pad as support and the extract of rice bran as an enzyme inducing medium, promote this system as an economic alternative for industrial modification processes.

KEYWORDS: Hydrolysis; Esterification; Immobilized fungi; Scourer; Biotechnology for the use of by-products; Starch.

RESUMO

A modificação de polímeros naturais é realizada para expandir sua funcionalidade e usos industriais. O uso de microrganismos como fonte enzimática fornece proteção às biomoléculas contra condições ambientais, reutilização, baixo custo, facilidade de cultivo e aplicação. Este estudo focou a imobilização de *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae*, como fonte enzimática para acilação e hidrólise de amido. O extrato de farelo de arroz e a esfregona foram utilizados como suporte para o seu desenvolvimento, a acilação do polímero foi verificada por IR e a determinação de ISA, IAA e PH. As concentrações de proteína de $30,7 \pm 0,3$ e $24,9 \pm 0,3$ (mg/cm³ de suporte) foram atingidas respectivamente. No modelo de acilação, foi observada uma modificação química dos polímeros causada pelas condições da reação, obtendo materiais com propriedades funcionais variáveis. Na hidrólise, foi obtida uma degradação de 40%, possibilitando a obtenção de diferentes derivados do amido. Nesse sentido, o desempenho em hidrólise, a concentração de proteínas dos microrganismos, a esfregona como suporte e o extrato de farelo de arroz como meio indutor de enzimas, promovem esse sistema como uma alternativa econômica para os processos de modificação industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrólise; Esterificação; Fungos immobilizados; Esfregão; Biotecnologia para aproveitamento de subprodutos; Amido.

INTRODUCCIÓN

El sector agropecuario enfrenta actualmente un reto fundamental, reducir la producción de residuos. En este sentido, el desarrollo de alternativas a los procesos convencionales de síntesis, que eviten las condiciones de reacción agresivas, que disminuyen la biocompatibilidad del producto obtenido ha supuesto un enfoque en la investigación actual [1]. En este orden de ideas, el uso de microorganismos y sus derivados es una alternativa biotecnológica para llevar a cabo este tipo de procesos. El empleo de enzimas libres, por ejemplo, ha permitido obtener compuestos ópticamente puros con alto rendimiento en numerosos procesos, no obstante, su escalado a nivel industrial ha mostrado dificultades debido a su nula reutilización, baja estabilidad catalítica y su alto costo [1,2].

Trabajar con las fuentes primarias de dichas enzimas (microorganismos), presenta ciertas ventajas frente a los demás sistemas, protección de las biomoléculas frente a cambios en las condiciones del medio (pH y T), reutilización en ciclos sucesivos, bajo costo y facilidad en su cultivo [3], características que se favorecen mediante procesos de inmovilización de los microorganismos, en lo cual recientemente se ha valorado la funcionalidad de soportes generados a partir de subproductos económicos, como el bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), las fibras de coco (*Cocos nucifera*) y estropajo (*Luffa aegyptiaca*) [4,5], este último destacando en los procesos en los que ha sido empleado.

En este orden de ideas, microorganismos como *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae* con alta producción de enzimas de interés como esterasas y glucosidasas, entre otras, son una alternativa para mejorar las tasas de rendimiento, disminuir los costes de producción y evitar el uso de condiciones de reacción agresivas a nivel industrial [4,5,6], En este sentido, la consideración como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (US Food and Drug Administration) de estos microorganismos, ha supuesto una alternativa para su empleo en industrias como la alimentaria y farmacéutica.

Por otra parte, el sector arrocero de Colombia presenta un bajo valor agregado en subproductos como el arroz tipo granza (partido) y teniendo en cuenta que el almidón presenta gran versatilidad para su aplicación en diversas industrias, el aprovechamiento de este subproducto como fuente de almidón es una alternativa para la generación de valor agregado a la cadena productiva. No obstante, en los últimos años este material ha requerido mejorar sus propiedades fisicoquímicas para aumentar su gama de usos, debido a características del polímero como su tendencia a retrogradarse, baja estabilidad térmica y falta de afinidad con algunos solventes, evidenciado la necesidad de llevar a cabo procesos de modificación estructural para mejorar estas propiedades [7,8].

La inserción de grupos funcionales mediante acilación, eterificación, entrecruzamiento o la obtención de unidades de menor tamaño por su hidrólisis, han sido alternativas que logran modificar las propiedades mecánicas, térmicas, de solubilidad y degradabilidad del polímero, permitiendo obtener materiales con una amplia gama de usos a nivel industrial [8,9].

En este orden de ideas, se planteó evaluar el desempeño de *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae* bajo un sistema de inmovilización con estropajo como soporte en los procesos de acilación e hidrólisis de almidón de arroz.

MÉTODO

Materiales y reactivos

El presente trabajo se desarrolló en la ciudad de Ibagué (Colombia) con Altitud de 1.285 msnm, Temperatura de 25°C y Humedad relativa: 85%).

El almidón de arroz utilizado para los experimentos se extrajo de la variedad Fedearroz 473 (Federación Colombiana de Arroceros) por el método alcalino [10], los hongos (*Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*) fueron suministrados por el Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Del Tolima (GIPRONUT). El estropajo (*Luffa aegyptiaca*) se adquirió en el mercado local. Los ácidos orgánicos (anhídrido acético y ácido maleico), así como el dimetilsulfóxido (DMSO), son reactivos comerciales (MERK®).

Crecimiento e inmovilización de microorganismos

Para el desarrollo de los microorganismos se empleó un medio comercial (Extracto de malta) y uno elaborado a partir de Salvado de arroz. Este último, preparado siguiendo la metodología propuesta por Fernández *et al.* (2009), con algunas modificaciones, 175 g de la harina se suspendieron en 1 L de agua destilada, la suspensión se agitó (150 rpm) durante 2 días manteniendo constante la temperatura (40°C), posteriormente se filtró y se almacenó el medio de cultivo hasta su uso.

Trozos de estropajo (1,5 x 0,5 cm) previamente deshidratados en una estufa a 60°C, se implementaron como soporte para la inmovilización de los hongos, en relación 1 soporte por cada 50 mL de medio de cultivo, los hongos se dejaron en desarrollo durante 7 días, con agitación constante (100 rpm, 30°C).

Concentración de proteína y producción enzimática

La concentración de proteína de cada hongo se determinó mediante el método de Bradford (Valipour, Valipour y Ahmadizadeh, 2015).

La capacidad esterasa de los hongos inmovilizados se determinó por colorimetría, siguiendo el principio planteado por Magdaleno y Vargas (2016), empleando como sustrato solución de acetato de metilo 2mM, rojo de metilo 0,45 mM, acetonitrilo 2,5% (v/v) en buffer fosfato 2 mM (pH 7,2). Una vez obtenida la solución, los biocatalizadores fueron suspendidos en esta, el viraje de una tonalidad amarilla a Rojo-Magenta fue considerada positivo para la presencia de esterases.

Acilación

El almidón nativo (sin modificar) y el ácido orgánico (Anhídrido acético o Ácido maleico) (1:0,1 m/m) se disolvieron en DMSO, se adicionó un biocatalizador (Cuadro 1) por cada 25 mL, se incubó a 60°C con agitación constante (120 rpm/3 h), como control positivo se empleó una lipasa comercial de *Candida antarctica* (CALB; 40 U/mL). Finalizado el tiempo de reacción el almidón se precipitó adicionando etanol, se centrifugó (1.1000 rpm) y secó en un horno de aire caliente a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ [11].

El rendimiento de los biocatalizadores se expresó como la actividad específica, relacionando los equivalentes de ácido graso adicionados y los miligramos de proteína de cada microorganismo. Para esto el sobrenadante obtenido del lavado con etanol se tituló con NaOH 0,91N y fenolftaleína 0,5%, para determinar los equivalentes de ácido graso adicionados. La acilación del polímero se verificó mediante IR, haciendo un seguimiento de la banda formada entre 1.640 y 1.745 cm^{-1} [12].

A los materiales (nativos y modificados) se les determinó el poder de hinchamiento (PH), índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) [13], para determinar cómo afectaba la modificación su funcionalidad (ecuaciones 1, 2 y 3).

Cálculo de resultados:

$$IAA = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g)bs}} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso solubles (g)}}{\text{Peso muestra (g)bs}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$PH = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g)bs} - \text{Peso solubles (g)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Hidrólisis

La evaluación de los biocatalizadores en la hidrólisis se realizó sobre almidón de arroz y almidón soluble de la marca MERK® como control del proceso. Los almidones se suspendieron en agua destilada, a concentración de 2.500 mg/L, se calentaron durante 15 minutos a 40°C, posteriormente se adicionó un hongo inmovilizado por cada 25 mL, el seguimiento de la reacción se realizó a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 y 1.080 minutos, mediante la prueba del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [14] con una curva de calibración de 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1.600, 3.200 y 6.400 mg/L.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial (2 medios de cultivo, 2 microorganismos y 2 ácidos orgánicos), los resultados se analizaron en el paquete estadístico Statgraphic Centurión XVI, se implementaron tres réplicas para cada prueba, los resultados obtenidos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (e.s.m), las diferencias significativas entre las medias para un 95 % de confianza ($P < 0,05$) fueron determinadas empleando el análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de múltiples rangos.

RESULTADOS

Los microorganismos evaluados exhibieron crecimiento en medios de cultivo con pH y composición diferentes como se muestra en el Cuadro 1, esto probablemente debido al contenido nutricional y pH requeridos por cada hongo para su desarrollo. Para *A. niger* se reportan condiciones óptimas de pH en un rango entre 2 y 5, contenidos de glucosa y oxígeno altos, por su parte, *R. oryzae* requiere un pH de 5 a 7 [15,16]. Por otra parte, la inmovilización de estos hongos no se ha reportado en estropajo, *R. oryzae* ha sido confinado en soportes de espuma de poliuretano de 6 mm, como BSP (partículas soporte de biomasa), generando biomasa de 8,56 mg/cm³ [17], de igual forma Hama *et al.* [18] sobre el mismo soporte genera 15,78 mg/cm³. Para *A. niger*, Guldhe *et al.* [19] bajo el mismo sistema, obtiene valores de 4 mg/BSP y Rakchai *et al.* [20] inmovilizando un hongo del mismo género (*Aspergillus nonius*) sobre esponja de limpieza en forma de cubos, logrando adherir al soporte 25 mg/cm³ de BSP. Es claro que bajo el sistema planteado en este trabajo se logran mayores porcentajes de agregación de biomasa (7.600%) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Desarrollo fúngico sobre estropajo.

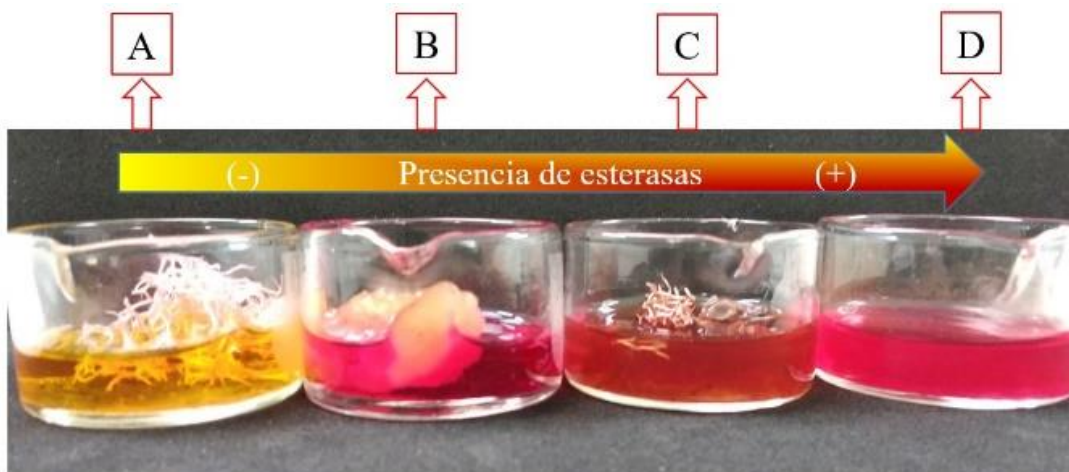
Hongo	Medio de cultivo	pH del medio	Tiempo de cultivo (días)	Biomasa (mg de hongo/ cm ³ de soporte)	Concentración de proteína (mg/ cm ³ de soporte)
<i>A. Niger</i>	Salvado de arroz	4,6	7	1900 ± 500	30,7 ± 0,3
<i>A. niger</i>	Extracto de malta	7	7	0	0
<i>R. oryzae</i>	Salvado de arroz	4,6	7	0	0
<i>R. oryzae</i>	Extracto de malta	7	7	1650 ± 300	24,9 ± 0,4

En cuanto a los valores de proteína obtenidos, *A. niger* desarrollo un mayor contenido a comparación de *R. oryzae* (Cuadro 1), las diferencias pueden deberse al medio de cultivo en el que se desarrollaron o al ciclo de vida de cada uno, debido a que son hongos diferentes con tiempos de crecimiento variables.

La concentración de proteína observada para cada hongo es elevada contrastada con diferentes investigaciones, Chandra *et al.*, [21] reportan contenidos de proteína de 5,10 mg/g para *A. niger*, utilizando una fermentación en estado sólido y sin inmovilizar. Estudios con organismos del mismo género como *Aspergillus ficuun* [22], logran concentraciones de proteína en cultivo sumergido de 5,42 mg/mL. Los resultados obtenidos muestran un mayor porcentaje de proteína obtenida (355% más en comparación a lo reportado), no obstante, cabe aclarar que la cuantificación se realizó solo sobre la biomasa obtenida en los soportes, la proteína de micelio no adherido al soporte no se tuvo en cuenta.

En este sentido, con base a la carga enzimática reportada para estos hongos (lipasas, amilasas y glucosidasas) es posible postular estos sistemas para realizar modificaciones de tipo esterificación e hidrólisis sobre diferentes materiales como el almidón o la celulosa, que requieren de las enzimas mencionadas para su catálisis [23, 24, 25, 26, 27]. Con esta finalidad, se realizó la prueba cualitativa para la presencia de esterases, resultados que se presentan en la Figura 1.

Figura 1. Prueba cualitativa de actividad esterasa.



Donde: Amarillo: ausencia de actividad esterasa; Rojo-Violeta: Presencia de actividad esterasa; A: Estropajo; B: *R. oryzae*; C: *A. niger*; D: Lipasa CALB.

Evaluación del hongo inmovilizado en la acilación de almidón

La eficiencia de los sistemas catalíticos expresada como actividad específica en acilación se muestra en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Actividad específica en la acilación.

Actividad específica (Equ. de ácido/ mg de proteína)						
Biocatalizador	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oryzae</i>	CALB	CALB
Ao	AA	AM	AA	AM	AA	AM
Valor	0	0	$8,1 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-7}$

Donde Ao: Ácido orgánico; AA: anhídrido acético y AM: ácido maleico

La actividad enzimática de los biocatalizadores en este modelo es baja, dada la cantidad de proteína generada por estos, sin embargo, es posible que las esterasas generadas por los microorganismos presenten una baja afinidad por los ácidos orgánicos empleados [28], lo cual se contrasta con los espectros IR obtenidos (Figuras 2 y 3). Para los tratamientos con anhídrido acético (Figura 2) se observa una banda en 1.700 cm^{-1} asociada a los grupos carbonilo (C=O) que verifican la acilación del polímero [29], no obstante, dicha banda se presenta con mayor intensidad en el blanco de reacción, por lo cual, la modificación del material estaría asociada a un proceso químico donde el ácido orgánico cataliza la reacción [11].

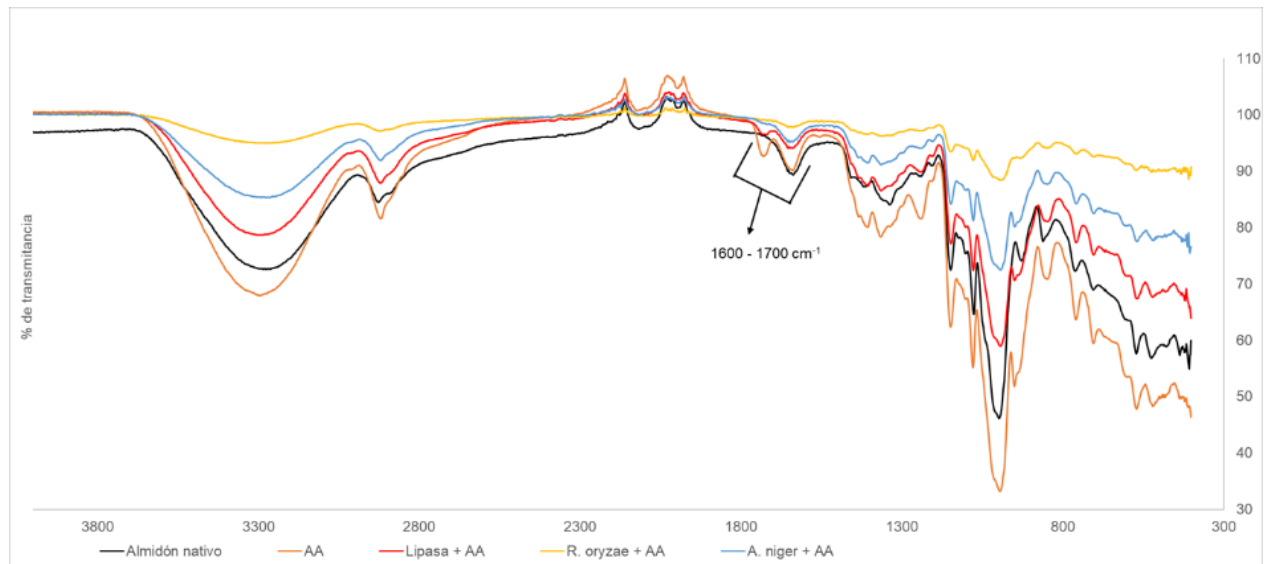


Figura 2. Almidones tratados con anhídrido acético.

Dónde; AA: Anhídrido acético; Almidón nativo: material sin ningún tratamiento; Almidón + AA: blanco de reacción; Lipasa + AA: almidón tratado con la enzima libre; *R. oryzae* + AA: almidón tratado con *Rhizopus oryzae*; *A. niger* + AA: almidón tratado con *Aspergillus niger*.

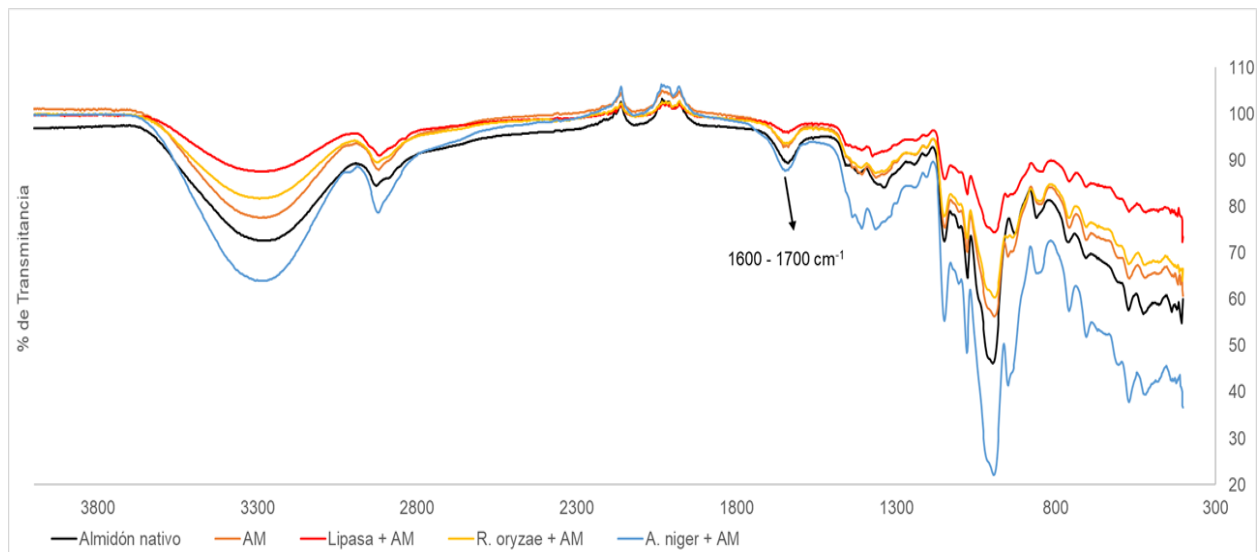


Figura 3. Almidones tratados con ácido maleico

Donde; AM: Ácido Maleico; Almidón nativo: material sin ningún tratamiento; Almidón + AM: blanco de reacción; Lipasa + AM: almidón tratado con la enzima libre; *R. oryzae* + AM: almidón tratado con *Rhizopus oryzae*; *A. niger* + AM: almidón tratado con *Aspergillus niger*.

Por otra parte, al verificar la formación de ésteres en el tratamiento con ácido maleico (Figura 3). Se evidencia que no hay una acilación del polímero dada la ausencia de la banda a 1.700 cm^{-1} , en este sentido, la disminución del ácido en el medio de reacción, podría estar relacionada con la formación de complejos entre las cadenas de amilosa del polímero y el ácido orgánico, de acuerdo con lo reportado en literatura [30, 31], donde se han relacionado altos contenidos de amilosa (>20%), como es el caso (28%), con la capacidad de formar complejos helicoidales únicos con una variedad de ligandos hidrofóbicos, incluidos alcoholes, fármacos, yodo y ácidos grasos, mediante la formación de puentes de hidrógeno y la repulsión con la cadena hidrofoba de la molécula que permiten esta formación.

En este sentido, al contrastar el impacto de las modificaciones sobre las propiedades funcionales de los materiales obtenidos (Figura 4) se puede observar que los parámetros evaluados (ISA, IAA, PH) tienden a aumentar en todos los tratamientos en comparación con el almidón nativo.

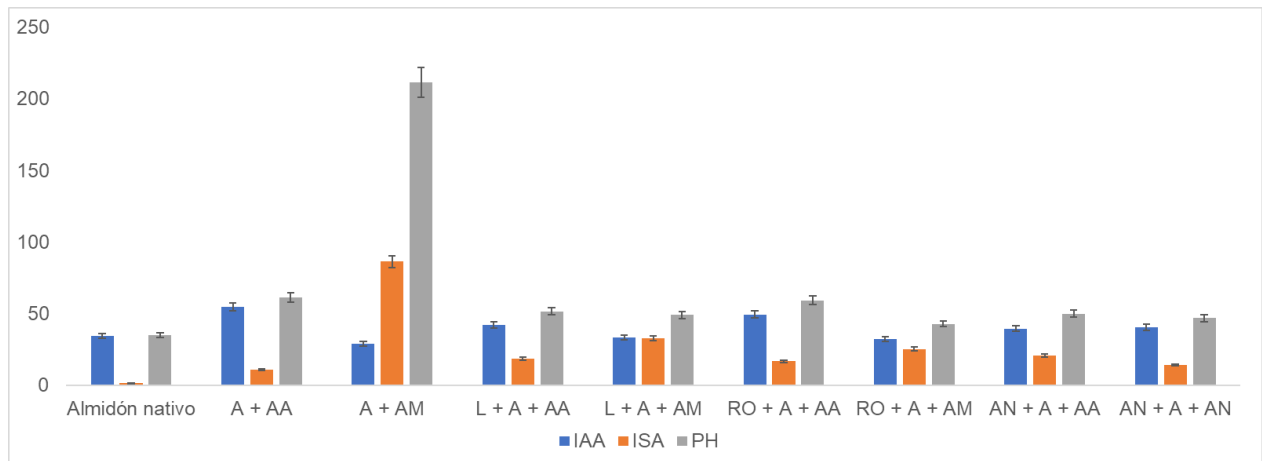


Figura 4. Propiedades funcionales según tratamiento.

Donde: IAA: índice de adsorción de agua; ISA: índice de solubilidad en agua; PH: poder de hinchamiento; A: almidón; AA: anhídrido acético; AM: ácido maleico; RO: *Rhizopus oryzae*; AN: *Aspergillus niger*; L: lipasa.

Sin embargo, el IAA muestra mayor aumento con el uso de anhídrido acético (158%). Para el caso del ISA y PH aumentan en mayor grado con los tratamientos de ácido maleico (5.700% y 604% respectivamente), lo que concuerda con lo reportado por estudios que emplean ácidos orgánicos de cadena corta, logrando modificar propiedades morfológicas del polímero nativo, su cristalinidad, evidenciando que el plegamiento de la molécula cambia a una conformación amorfa, permitiendo que el solvente (Agua) tenga mayor contacto con el almidón, por consiguiente aumentan los valores de ISA, PH y IAA [29].

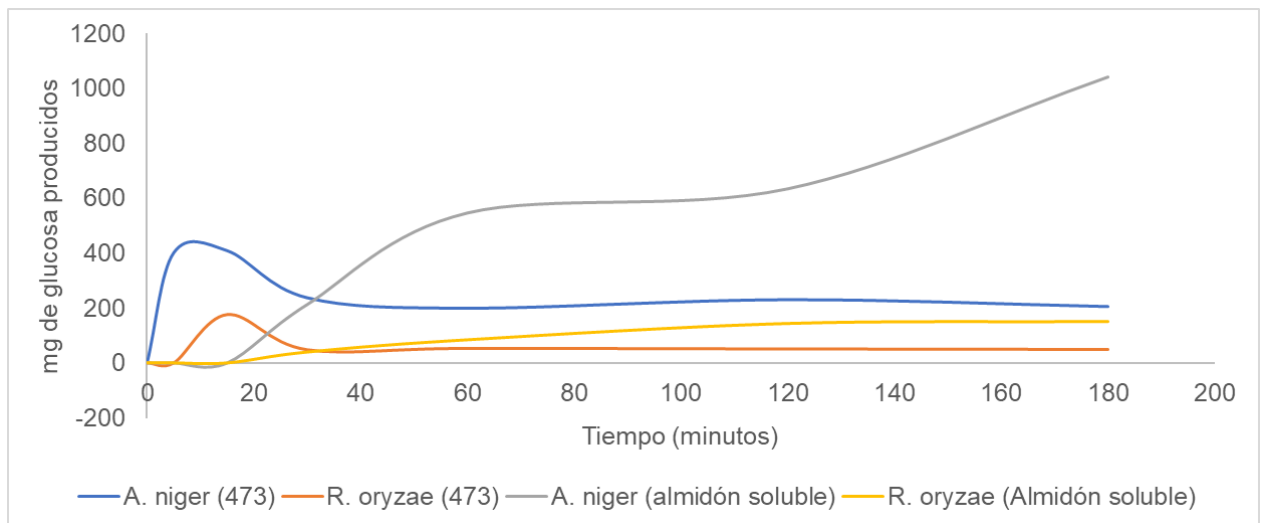
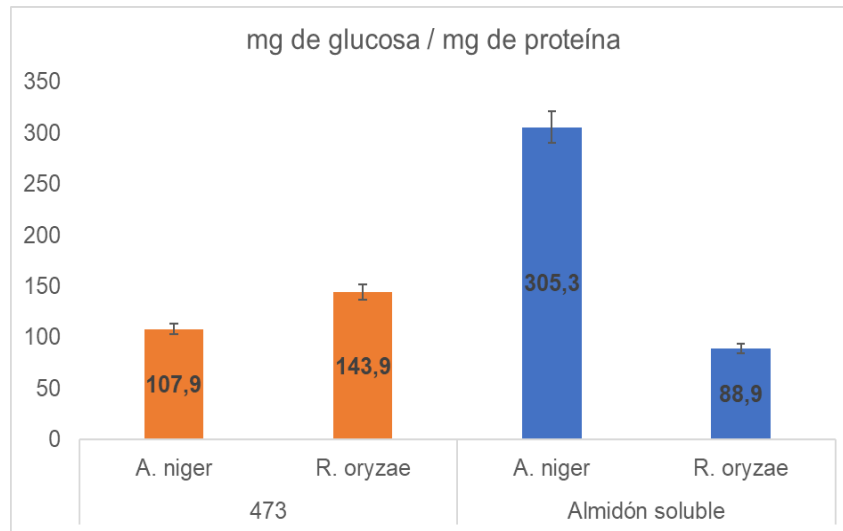


Figura 5. Hidrólisis de los almidones.

Evaluación de la Hidrólisis de almidón

La Figura 5 ilustra el proceso de hidrólisis, se observa que los sistemas catalíticos alcanzan su máximo de reacción a tiempos diferentes para cada almidón evaluado. Por otra parte, la actividad específica de cada sistema catalítico se ilustra en la figura 6.

Figura 6. Actividad específica en la hidrólisis.



En la hidrólisis del almidón soluble, para ambos hongos se observa que la reacción inicia entre los 15 y 30 minutos, con el aumento del tiempo de reacción se evidencian diferencias significativas entre los ciclos evaluados, permitiendo afirmar que con un polímero de alta solubilidad los sistemas catalíticos tienen mayor capacidad hidrolítica, siendo que *A. niger* alcanza una concentración de 1.041 mg de glucosa/L (41,64%) y *R. oryzae* 152 mg/L (6%) a los 180 minutos, esto se puede deber a un mayor proceso de difusión del material en el medio, lo que facilita la unión enzima - sustrato [32].

Por su parte, con el almidón de la variedad 473 los hongos alcanzan el límite de reacción a los 15 minutos, a partir de este tiempo no se evidencian diferencias significativas. La diferencia en la cantidad de polímero hidrolizado por cada microorganismo puede estar dada por la carga enzimática de estos, para el caso de *A. niger* se reporta además de las enzimas ya mencionadas, la producción de amiloglucosidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces exo 1-4 D glucosídicos [33]. Por otra parte, la falta de solubilidad del almidón de la variedad 473 es otra posible causa de la diferencia entre la cantidad de polímero hidrolizado frente al almidón soluble.

En este sentido, diferentes estudios han alcanzado porcentajes de hidrólisis de almidón del 90%, empleando enzimas como α -1,4-glucosidasa y Exo-1,4- α -glucosidasa, sin embargo, para lograr estas tasas de reacción es requerida una gran cantidad de las mismas, y estas, por efecto de solubilidad y purificación del material obtenido no se pueden recuperar [15, 34].

En el presente trabajo los sistemas catalíticos evaluados presentaron una alta actividad específica (Figura 6), teniendo en cuenta que, en 3 horas se alcanzó un porcentaje de hidrólisis cercano al 40% con una carga enzimática baja, demostrando que este tipo de sistemas catalíticos podrían usarse para procesos de hidrólisis de almidón previa estandarización y optimización de su desempeño.

CONCLUSIONES

Los sistemas catalíticos han demostrado ser eficientes en el modelo de hidrólisis, estos son producidos de forma económica, tendiendo en cuenta que se pueden generar a partir de medios elaborados con subproductos de la cadena productiva del arroz y con un soporte alternativo de bajo costo en el mercado, demostrando así una relación costo beneficio favorable

teniendo en cuenta que alcanzaron tasas de hidrólisis del 40%, evidenciando que esta es una posible alternativa a los procesos industriales comunes, en este sentido, el uso de almidón de arroz para la obtención de dextrinas, etanol, edulcorantes, almidón parcialmente hidrolizado, entre otros, es una alternativa para generar valor agregado sobre la cadena productiva del arroz.

Por el contrario, los resultados obtenidos para el modelo de acilación permiten apreciar una modificación mayormente química que bajo las condiciones evaluadas en este modelo es mediada por los ácidos orgánicos empleados. A pesar de esto, se lograron obtener materiales con características variables, lo cual podría ampliar la gama de usos que presenta el polímero.

Cabe destacar el alto contenido proteico producido por los microorganismos en particular en el medio elaborado a partir de salvado de arroz. Por último, resaltar que la falta de actividad de los biocatalizadores bajo las condiciones de reacción evaluadas para el modelo de acilación puede estar dada por una baja afinidad de las enzimas producidas por los hongos hacia los ácidos orgánicos empleados, por tanto, se sugiere para estudios posteriores evaluar ácidos orgánicos con longitudes de cadena mayores con el fin de establecer el potencial que presentan estos sistemas para su empleo en la acilación de almidón.

REFERENCIAS

- [1] SHELDON, ROGER; PEREIRA, PEDRO. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chemical Society Reviews*, v. 46, n. 10, 2017, p. 2678-2691.
<https://doi.org/10.1039/C6CS00854B>
- [2] JINLING, ZHAN; XIWEN, ZHANG; RONGRONG, MA; YAOQI, TIAN. Designing Lipase-Compatible Ionic Liquids as Novel Solvents for Starch Ester Biosynthesis. *Starch-Stärke*, v. 72, n. 1-2, 2020, p. 1900120.
<https://doi.org/10.1002/star.201900120>
- [3] KARAMBWALAA, EMAN; WAHABA, ABDEL; SALEHA, SHIREEN; HASSAN, MOHAMED; KANSOH, AMANY; ESAWYA, MONA. Immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase macromolecules. *International journal of biological Production*, v. 102, 2017, p. 694-703.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.033>
- [4] SEPÚLVEDA, LEONARDO; LARIOS-CRUZ, RAMÓN; LONDOÑO, LILIANA; HERNÁNDEZ, AYERIM; ÁLVAREZ, BERENICE; RAMÍREZ, NATHIELY; TORRES, CRISTIAN; NEIRA, ALBERTO; MARTÍNEZ, JOSÉ; VENTURA-SOBREVILLA, JANETH; BOONE-VILLA, DANIEL; AGUILAR, CRISTOBAL. En: *Production and Recovery of Enzymes for Functional Food Processing. Functional Foods and Biotechnology*. CRC Press, 2020, p. 227-228. [10.1201/9781003003793-13](https://doi.org/10.1201/9781003003793-13)
- [5] ROSALES, ANA; RODRÍGUEZ, CARLOS; BALLEEN-SEGURA, MIGUEL. Remoción de contaminantes y crecimiento del alga *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de curtiembres, comparación entre células libres e inmovilizadas. *Ingeniería y Ciencia*, v. 14, n. 28, 2018, p. 11-34.
<https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.1>
- [6] LOPEZ-TRUJILLO, JUAN; MEDINA-MORALES, MIGUEL; SANCHEZ-FLORES, ARIEL; AREVALO, CARLOS; ASCACIO-VALDES, JUAN; MELLADO, MIGUEL; AGUILAR, CRISTOBAL; AGUILERA-CARBO, ANTONIO. Solid bioprocess of tarbush (*Flourensia cernua*) leaves for β -glucosidase production by *Aspergillus niger*: initial approach to fiber-glycoside interaction for enzyme induction. *Biotech*, v. 7, n. 4, 2017, p. 271.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0883-6X>

- [7] MONTOYA, DIEGO; MURILLO, WALTER; BARBOSA, LUIS-OVEIMAR; MÉNDEZ, JONH-JAIRO. Acetilación enzimática de almidones: una opción de valor agregado. *Revista Tumbaga*, v. 1, 2015, p. 88-108.
- [8] ZHUA, JIE; ZHANG, SHUYAN; ZHANG, BINJIA; QIAO, DONGLING; PU, HUAYIN; LIUBLINLI, SIYUAN. Structural features and thermal property of propionylated starches with different amylose/amylopectin ratio. *International journal of biological macromolecules*, v. 97, 2017, p. 123-130.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.033>
- [9] MONROY, YULIANA; RIVERO, SANDRA; GARCÍA, MARÍA. Microstructural and techno-functional properties of cassava starch modified by ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 42, 2018, p. 795-804.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.048>
- [10] ABBAS-BUTT, NATASHA; MOHSIN-ALI, TAHIRA; HASNAIN, ABID. Rheological characterization of cold-water soluble rice (*Oryza sativa*) starch lactates and citrates prepared via alcoholic-alkaline method. *International journal of biological macromolecules*, v. 123, 2019, p. 558-568.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.076>
- [11] ASIMA, SHAH, MASOODI, F.A.; ADIL, GANI; BILAL-AHMAD ASHWAR. Physicochemical, rheological and structural characterization of acetylated oat starches. *LWT*, v. 80, 2017, p. 19-26.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.072>
- [12] HORCHANI, HABIB; CHAËBOUNI, MONCEF; GARGOURI, YOUSSEF; SAYAR, I ADEL. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 2, 2010, 466-474.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.003>
- [13] REZA-FALSAFI, SEID; MAGHSOUDLOU, YAHYA; ROSTAMABADI, HADIS; MAHDI-ROSTAMABADI, MOHAMMAD; HAMED, HASSAN; HASHEM-HOSSEINIE, SEYED-MOHAMMAD. Preparation of physically modified oat starch with different sonication treatments. *Food hydrocolloids*, v. 89, 2019, p. 311-320.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.046>
- [14] WANG, DANLI; MA, XIAOBIN; YAN, LUFENG; CHANTAPAKUL, THUNTHACHA; WANG, WENJUN; DING, TIAN; YE, XINGQAN; LIU, DONGHONG. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics. *Carbohydrate polymers* v. 175, 2017, p. 47-54.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.093>
- [15] AHMED, SUHAD; ABOOD, NAGHAM. Effect of some growth factors on protease production by *Rhizopus oryzae*. *Al-Nahrain Journal of Science*, v. 20, n. 2, 2017, p. 90-95.
[10.22401/JUNS.20.2.12](https://doi.org/10.22401/JUNS.20.2.12)
- [16] DINARVAND, MOJDEH; REZAEI, MALAHAT; FOROUGH, MAJID. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian journal of microbiology*, v. 48, n. 3, 2017, p. 427-441.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.026>
- [17] BAN, KAZUHIRO; KAIEDA, MASARU; MATSUMOTO, TAKESHI; KONDO, AKIHIKO; FUKUDAC, HIDEKI. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical engineering journal*, v. 8, n. 1, 2001, p. 39-43.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00133-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00133-9)
- [18] HAMA, SHINJI; TAMALAMPUDI, SRIAPPAREDDY; FUKUMIZU, TAKAHIRO; MIURA, KAZUNORI; YAMAJI, HIDEKI; KONDO, AKIHIKO; FUKUDAA, HIDEKI. Lipase

localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. Journal of bioscience and bioengineering, v. 101, n. 4, 2006, p. 328-333.

<https://doi.org/10.1263/jbb.101.328>

- [19] GULDHE, ABHISHEK; SINGH, POONAM; KUMARI, SHEENA; RAWAT, ISMAIL; PERMAUL, KUGEN; BUX, FAIZAL. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. Renewable Energy, v. 85, 2016, p. 1002-1010.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.059>
- [20] RAKCHAI, NARUEMON; KITTIKUN, ARAN H.; ZIMMERMANN, WOLFGANG. The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus nomius* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 133, 2016, p. S128-S136.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.12.006>
- [21] CHANDRA, SUBHOSH; VISWANATH, BUDDOLLA; REDDY, RAJASEKHAR. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. Indian Journal of Microbiology, v. 47, n. 4, 2007, p. 323-328.
<https://doi.org/10.1007/s12088-007-0059-x>
- [22] COSTA, MARCIA; NERCHUNDI, GERHARD; VILLARROEL, FRANCISCO; TORRER, MARCELO; SCHOBITZ, RENATE. Producción de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido. Revista Colombiana de Biotecnología, v. 11, n. 1, 2009, p. 73-83.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025>
- [23] AVWIOROKO, OGHENETEGA; ANIGBORO, AKPOVWEHWEE; UNACHUKWU, NNANNA; TONUARI, NYERHOVVO. Isolation, identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 obtained from cassava undergoing spoilage. Biochemistry and biophysics reports v. 14, 2018, p. 35-42.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.006>
- [24] OLUWABUNMI, ATOLAGBE; ADESOLA, AJAYI; GRACE, OLASEHINDE. Production and Characterization of Partially Purified α -amylase from *Aspergillus niger*. Journal of Physics: Conference Series, v. 1378, n. 4, 2019, p. 042077.
[10.1088/1742-6596/1378/4/042077](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1378/4/042077)
- [25] NEMA, ASHUTOSH; PATNALA, SAI-HARITHA; MANDARI, VENKATESH; KOTA, SOBHA; DEVARAI, SANTHOSH-KUMAR. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. Bulletin of the National Research Centre v. 43, n. 1, 2019, p. 82.
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7>
- [26] TAKÓ, MIKLÓS; KOTOGÁN, ALEXANDRA; PAPP, TAMÁS; KADAIKUNNAN, SHINE; ALHARBI, NAIYF; VÁGVÖLGYI, CSABA. Purification and properties of extracellular lipases with transesterification activity and 1, 3-regioselectivity from *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. Journal of microbiology and biotechnology, v. 27, n. 2, 2017, p. 277-288.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08005>
- [27] EL-OKKI, AMEL AIT KAKI-EL HADEF; GAGAOUA, MOHAMMED; BENNAMOUN, LEILA; DJEKRIFF, SHAHRAZED; HAFID, KAHINA; EL-OKKI, MOHAMED-EL HADEF; MERAIHI, ZAHIA. Statistical optimization of thermostable α -amylase production by a newly isolated *Rhizopus oryzae* strain FSIS4 using decommissioned dates. Waste and Biomass Valorization, v. 8, n. 6, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9727-6>
- [28] CHEN, YING; CHEONG, LING-ZHI; ZHAO, JIAHE; PANPIPAT, WORAWAN; WANG, ZHIPAN; LI, YE; LU, CHENYANG; ZHOU, JUN; SU, XIURONG. Lipase-catalyzed

selective enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols of cod liver and linseed oils: Modeling the binding affinity of lipases and fatty acids. International journal of biological macromolecules, v. 123, 2019, p. 261-268.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.049>

- [29] CLASEN, SAMUEL; MÜLLER, CARMEN; PARIZE, ALEXANDRE; PIRES, ALFREDO. Synthesis and characterization of cassava starch with maleic acid derivatives by etherification reaction. Carbohydrate polymers, v. 180, 2018, p. 348-353.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.016>
- [30] CHAGAM-KOTESWARA, REDDY; CHOI, SO-MANG; LEE, DONG-JIN; LIM, SEUNG-TAIK. Complex formation between starch and stearic acid: Effect of enzymatic debranching for starch. Food chemistry, v. 244, 2018, p. 136-142.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.040>
- [31] SEO, TAE-RANG; KIM, JONG-YEA; LIM, SEUNG-TAIK. Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. LWT-Food Science and Technology, v. 64, n. 2, 2015, p. 889-897.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.021>
- [32] AZMI, A.S.; MALEK, M.I.A.; PUAD, N.I.M. A review on acid and enzymatic hydrolyses of sago starch. International Food Research Journal, v. 24, n. Suppl, 2017.
- [33] OSHO, MICHAEL; SOLOMON, THANKGOD. Use of composite agro-substrates for amyloglucosidase synthesis and characterization by *Aspergillus niger* OTF and *Aspergillus flavus* CLOR1 USING solid state fermentation. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, v. 9, n. 5, 2020, p. 879.
[10.15414/jmbfs.2020.9.5.879-883](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.5.879-883)
- [34] OLIVEIRA, HUGO; CORREIA, VERÓNICA; SEGUNDO, MARCELA; FONSECA, ANTÓNIO; CABRITA, . Does ultrasound improve the activity of alpha amylase? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. LWT, v. 84, 2017, p. 674-685.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.035>