



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

**Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de
azúcares derivados de la hidrólisis enzimática
del almidón de arroz (*Oryza sativa* L.)**

AUTOR:

Vera Bowen, Eduardo Enrique

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TUTOR:

Ing. Velásquez Rivera, Jorge Ruperto, Ph. D.

Guayaquil, Ecuador

15 de febrero del 2023



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente **Trabajo de Titulación**, fue realizado en su totalidad por **Vera Bowen, Eduardo Enrique** como requerimiento para la obtención del título de **Ingeniero Agroindustrial**.

TUTOR

Ing. Velásquez Rivera, Jorge Ruperto, Ph. D.

DIRECTORA DE LA CARRERA

Ing. Pincay Figueroa, Paola Estefanía, M. Sc.

Guayaquil, a los 15 días del mes de febrero del año 2023



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Vera Bowen, Eduardo Enrique

DECLARO QUE:

El Trabajo de Titulación, Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz (*Oryza sativa* L.), previo a la obtención del título de **Ingeniero Agroindustrial**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Guayaquil, a los 15 días del mes de febrero del año 2023

EL AUTOR

Vera Bowen, Eduardo Enrique



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

AUTORIZACIÓN

Yo, **Vera Bowen, Eduardo Enrique**

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil a la **publicación** en la biblioteca de la institución el **Trabajo de Titulación, Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz (Oryza sativa L.)**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

Guayaquil, a los 15 días del mes de febrero del año 2023

EL AUTOR:

Vera Bowen, Eduardo Enrique



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

CERTIFICADO URKUND

La Dirección de las Carreras Agropecuarias revisó el Trabajo de Titulación, **Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz (*Oryza sativa* L.)** presentado por el estudiante **Vera Bowen, Eduardo Enrique**, de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, donde obtuvo del programa URKUND, el valor de 0 % de coincidencias, considerando ser aprobada por esta dirección.



Document Information

Analyzed document	Vera Bowen, Eduardo Enrique.pdf (D158183693)
Submitted	2023-02-08 19:48:00
Submitted by	
Submitter email	eduardo.vera01@cu.ucsg.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	noelia.caicedo.ucsg@analysis.irkund.com

Fuente: URKUND-Usuario Caicedo Coello, 2023

Certifican,

Ing. Noelia Caicedo Coello, M. Sc.
Revisora - URKUND

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso, a la santísima Virgen María Auxiliadora, a mi Padre San Josemaría Escrivá, a mi querida madre Maritza Bowen Rodríguez, a mi Padre el Dr. Angel Vera Lalama, al Dr. Aquiles Rigail, a la Ab. Irene Valencia; en especial agradecimiento a Cecilia Hernández y todos quienes con sus oraciones me han apoyado espiritualmente.

Vera Bowen, Eduardo Enrique

DEDICATORIA

Al Ing. Xavier Villavicencio Campoverde, quien fue mi maestro en la actividad agrícola desde el inicio de aquella en el 2010, al Dr. Fernando Chapresto Montoya quien me animó a retomar mis estudios y a seguir mi sueño de estudiar las ciencias relacionadas al agro y los alimentos.

Vera Bowen, Eduardo Enrique



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

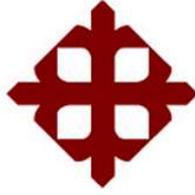
**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Velásquez Rivera, Jorge Ruperto, Ph. D.
TUTOR

Ing. Pincay Figueroa, Paola Estefanía, M. Sc.
DIRECTORA DE LA CARRERA

Ing. Caicedo Coello, Noelia Carolina, M. Sc.
COORDINADORA DE UTE



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

CALIFICACIÓN

**10
DIEZ**

Ing. Velásquez Rivera, Jorge Ruperto, Ph. D.

TUTOR

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general.	3
1.1.2. Objetivos específicos.	4
1.2. Pregunta de hipótesis.....	4
1.3 Hipótesis	4
2 MARCO TEÓRICO	4
2.1 Clasificación taxonómica del arroz	6
2.2 Almidón de arroz	6
2.2.1 Composición del almidón.	7
2.3 <i>Aspergillus oryzae</i>	8
2.4 Proceso tradicional de elaboración de alcohol de arroz.....	8
2.4.1 Pulido del grano.	9
2.4.2 Lavado del grano y remojo.	9
2.4.3 Cocción del grano.	9
2.4.4 Preparado del Koji.....	10
2.4.5 Preparación del Shubo.....	10
2.4.6 Preparación del moromi y sandan shikomi.	10
2.4.7 Prensado.....	11
2.4.8 Filtrado.	11
2.4.9 Pasteurización.....	11
2.4.10 Proceso de elaboración de alcohol de arroz.....	12
2.5 Hidrólisis.....	14
2.5.1 Hidrólisis química.	15
2.5.2 Hidrólisis enzimática.....	16
2.6 Enzimas empleadas en la hidrólisis del almidón de arroz	16
2.6.1 α -amilasa.	16
2.6.2 β -amilasa.	18
2.6.3 Glucoamilasa.	18
2.6.4 Pululanasa.	19

2.6.5 α -glucosidasa.....	20
2.7 Proceso de hidrólisis	20
2.8 Fermentación alcohólica.....	22
2.9 Producción de alcohol a partir del almidón hidrolizado.	23
2.9.1 Rendimiento del proceso.....	24
2.10 Azúcares reductores.....	24
2.10.1 Método de Fehling para determinación de azúcares reductores.....	25
2.11 Porcentaje de alcohol	25
3 MARCO METODOLÓGICO	26
3.1 Ubicación del ensayo	26
3.2 Tipo de investigación.....	26
3.3. Materiales y equipos.....	27
3.3.1 Materiales.	27
3.3.2 Equipos.....	27
3.4 Diseño experimental.....	27
3.4.1 Esquema del ANOVA.....	28
3.4.1 Muestra testigo.....	28
3.5 Unidad de análisis	29
3.5.1 Población.	29
3.5.2 Muestreo.....	29
3.6 Combinaciones de las muestras.....	30
3.7 Proceso experimental.....	30
3.7.1 Hidrólisis del almidón de arroz.	30
3.7.2 Determinación de azúcares reductores.	31
3.7.3 Fermentación de las muestras.	32
3.7.4 Determinación de porcentaje de alcohol.....	33
3.7.5 Rendimiento en el proceso de hidrólisis.	33
3.7.6. Cálculo del beneficio costo.....	33
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Concentración de α -amilasa para hidrolizar almidón de arroz	35
4.2 Cuantificación de azúcares reductores	35
4.3 Resultados de la fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
4.4 Determinación de grado alcohólico.....	37

4.5 Rendimiento de la hidrólisis.....	38
4.6 Análisis de varianza.....	40
4.7 Análisis t-student	41
4.8 Costo Beneficio	43
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
5.1 Conclusiones.....	44
5.2 Recomendaciones.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del arroz.....	6
Tabla 2. Esquema del ANOVA	28
Tabla 3. Muestra testigo	29
Tabla 4. Dosificación de α -amilasa.....	30
Tabla 5. Azúcares reductores obtenidos	35
Tabla 6. Densidades de las muestras y grado alcohólico obtenido.....	38
Tabla 7. Rendimiento de la hidrólisis	39
Tabla 8. Método de análisis estadístico.....	40
Tabla 9. Información del factor	40
Tabla 10. Análisis de varianza.....	40
Tabla 11. Resumen de modelo.....	40
Tabla 12. Estadísticas descriptivas	42
Tabla 13. Valores para T y P.....	42
Tabla 14. Costo beneficio.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Proceso de elaboración de alcohol de arroz japonés.....	12
Gráfico 2. Cadena de amilosa.....	17
Gráfico 3. Cadena de amilopectina	17
Gráfico 4. Proceso de hidrólisis.	21
Gráfico 5. Ubicación geográfica del laboratorio de microbiología	26
Gráfico 6. Cuantificación de azúcares.....	36
Gráfico 7. Relación entre azúcares obtenidos y calidad de hidrólisis	37
Gráfico 8. Ecuación de crecimiento	41

RESUMEN

En el presente trabajo se empleó diversas concentraciones de la enzima α -amilasa aplicadas al almidón de arroz (*Oryzae sativa*) con la finalidad de determinar la concentración de esta enzima que sea capaz de generar una cantidad de azúcares reductores que al fermentarlos con *Saccharomyces cerevisiae* pueda lograr obtener una bebida alcohólica. Este experimento se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo, de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Se diseñaron 5 formulaciones y una en negativo, de las cuales se realizó la experimentación por triplicado. Las concentraciones de enzima α -amilasa fueron de 25, 30, 35, 40 y 45 mg, aplicadas a 25 g de almidón de arroz, posteriormente, se sometieron las muestras a hidrólisis durante 2 horas a una temperatura de 90 °C y agitación a 150 rpm, una vez concluida la termo agitación se procedió a inactivar la enzima con la aplicación de HCl al 2 N para bajar el pH, luego elevarlo con buffer de acetato de sodio, procediendo a llevarlo a una temperatura de -20 °C. Para la determinación de azúcares se utilizó la prueba de Fehling donde se evidenció que la muestra inoculada con 45 mg de enzima α -amilasa obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores. Las muestras se procedieron a fermentar con *Saccharomyces cerevisiae*, se obtuvo como resultado que las muestras aplicadas con 40 y 45 mg presentaron un porcentaje de alcohol mayor al 8 %. El beneficio costo de la producción por litro de bebida alcohólica fue de USD 0.74.

Palabras clave: Arroz, bebida, enzima, α -amilasa

ABSTRACT

In the present work, various concentrations of the α -amylase enzyme applied to rice starch (*Oryzae sativa*) were used in order to determine the concentration of this enzyme that is capable of generating a quantity of reducing sugars that, when fermented with *Saccharomyces cerevisiae*, can manage to obtain an alcoholic beverage. This experiment was carried out in the microbiology laboratory of the Faculty of Technical Education for Development, of the Catholic University of Santiago de Guayaquil. 5 formulations and one in negative were designed, of which the experimentation was carried out in triplicate. The α -amylase enzyme concentrations were 25, 30, 35, 40 and 45 mg, applied to 25 g of rice starch, subsequently, the samples were subjected to hydrolysis for 2 hours at a temperature of 90 °C and stirring at 150 rpm, once the thermal agitation was concluded, the enzyme was inactivated with the application of 2 N HCl to lower the pH, then raised with sodium acetate buffer, proceeding to bring it to a temperature of -20 °C. For the determination of sugars, the Fehling test was used, where it was evidenced that the sample inoculated with 45 mg of α -amylase enzyme obtained the highest amount of reducing sugars. The samples were fermented with *Saccharomyces cerevisiae*, the result was that the samples applied with 40 and 45 mg presented an alcohol percentage greater than 8%. The benefit cost of production per liter of alcoholic beverage was USD 0.74.

Keywords: Rice, beverage, enzyme, α -amylase

1 INTRODUCCIÓN

La producción de arroz es una de las actividades agrícolas más extensas y tradicionales del Ecuador, siendo el tercer cultivo con mayor superficie después del cacao y el maíz. A pesar de que antiguamente su uso se limitaba a la cocción del grano para su consumo, actualmente, dicha materia prima también es procesada para obtener harina o es usada para el desarrollo de barras energéticas, galletas o bebidas alcohólicas como la cerveza.

En los países asiáticos, este cereal es usualmente empleado para producir sake, bebida alcohólica originaria de Japón. Para el desarrollo de la misma, se emplea el hongo *Aspergillus oryzae* (koji), el cual descompone los almidones del arroz en azúcares más simples, para posteriormente ser fermentados por *Saccharomyces cerevisiae*, dando como resultado una bebida alcohólica natural, de sabor particular.

Hay que tener en cuenta que el alcohol de arroz solo se puede obtener a partir de diversas variedades de arroz, concretamente de aquellas variedades en las que el almidón de dicha materia prima se localice en el centro del grano, de modo que el resto de los nutrientes, tales como las proteínas y las grasas, se encuentren situadas en los extremos, a fin de ser eliminadas tras el pulido del mismo, ya que, de lo contrario, se obtendría alcohol con sabor rancio.

Además, en función del porcentaje de pulido de los granos de arroz y a la cantidad de alcohol añadido durante su producción, en el mercado se puede encontrar diferentes tipos de graduaciones alcohólicas.

En el mercado japonés, donde es popular una bebida fermentada a partir del arroz llamada sake, se puede encontrar bebidas con diferente graduación alcohólica y con procesos diversos. Cuando el sake es producido

sin alcohol añadido es llamado Junmai, el cual en función al tipo de pulido del arroz se obtiene sus variedades que son: Junmai Dai-Ginjo, Junmai Ginjo, Tokubetsu Junmai, y Junmai. Por otro lado, los sakes elaborados con alcohol añadido dan como resultado variedades como: Dai-Ginjo, Ginjo, Tokubetsu Honjozo y Honjozo. Estos se diferencian entre sí en el pulido del arroz y en la cantidad de alcohol añadido. Por último, está el Futsushu, bebida alcohólica obtenida a partir del grano de arroz sin pulir.

El alcohol de arroz es elaborado mediante la hidrólisis de los productos obtenidos a partir del hongo *Aspergillus oryzae*, α -amilasa, β -amilasa, enzimas proteolíticas que hidrolizan el almidón descomponiéndolo en azúcares más simples, que dan como resultado el arroz tipo koji. Este, posteriormente, debe ser mezclado con arroz cocido y fermentado con *Saccharomyces cerevisiae*, levadura responsable del alcohol para producir alcohol de arroz.

El proceso de inoculación del hongo *Aspergillus oryzae*, empleado para la producción de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, demora aproximadamente de tres a cuatro días bajo condiciones de humedad y temperatura controlada, lo cual dificulta su proceso de elaboración (Gómez et al., 2021).

Con el presente proyecto se desea realizar un estudio comparativo sobre las diferentes concentraciones de α -amilasa necesarias para hidrolizar el almidón del arroz en azúcares más simples, los cuales serán posteriormente fermentados con *Saccharomyces cerevisiae* a fin de producir alcohol de arroz sin el empleo del hongo *Aspergillus oryzae*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general.

Obtener una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz.

1.1.2. Objetivos específicos.

- Determinar la concentración de α -amilasa comercial requerida en la hidrólisis del almidón de arroz para su posterior fermentación.
- Cuantificar los azúcares reductores obtenidos de las muestras de almidón de arroz hidrolizadas con α -amilasa.
- Fermentar con *Saccharomyces cerevisiae*, los azúcares simples obtenidos tras la hidrólisis del almidón de arroz.
- Determinar el grado alcohólico de las muestras fermentadas con *S. cerevisiae*.
- Determinar el rendimiento de la hidrólisis.
- Determinar el beneficio/costo.

1.2. Pregunta de hipótesis

¿Qué concentración de α -amilasa es necesaria para la hidrólisis del almidón de arroz y su posterior fermentación?

1.3 Hipótesis

H0. El porcentaje de alcohol etílico obtenido en la bebida alcohólica con diferentes concentraciones de α -amilasa no presenta diferencias significativas.

H1. El porcentaje de alcohol etílico obtenido en la bebida alcohólica con diferentes concentraciones de α -amilasa presenta diferencias significativas.

2 MARCO TEÓRICO

La obtención de bebidas alcohólicas por fermentación tiene su origen en la época clásica, concretamente en Mesopotamia, donde de manera casual y espontánea se fermentaron granos húmedos de cebada, uva y trigo, dando como resultado bebidas como la cerveza o el vino según Porras (2022) se

trata de un proceso anaerobio llevado a cabo por diferentes bacterias, levaduras y mohos, los cuales transforman los azúcares de la materia prima empleada en alcohol etílico y dióxido de carbono; usualmente, para dicho proceso se emplean materias primas vegetales ricas en carbohidratos tales como vegetales, frutas, cereales y tubérculos (Cadena et al., 2022).

A pesar de que existen numerosos microorganismos que pueden ser empleados para la obtención de bebidas alcohólicas, tales como: *Kluyveromyces fragilis*, *Torulaspota*, *Zymomonas mobilis* o *Saccharomyces cerevisiae*, esta última es la más empleada ya que es un microorganismo inocuo (Mella, 2021).

Ecuador es uno de los principales productores de arroz a nivel mundial y forma parte de la canasta básica diaria, ya que es una fuente económica y sostenible de proteínas; a pesar de eso, debido a las inundaciones que han azotado al país en los últimos años y al ataque de determinadas plagas, gran parte del arroz consumido a nivel nacional es importado de países vecinos, ocasionando pérdidas económicas y una sobreproducción de arroz a nivel nacional, es clave la diversificación de la industria para dar una salida a este problema (Verdezoto, 2022).

El arroz es una excelente materia prima para la producción de bebidas alcohólicas, debido a que dentro de los alcoholes obtenidos del arroz se tiene al sake, licor de origen asiático que presenta una consistencia espesa y un sabor entre seco, ligeramente dulce y fuerte, el cual usualmente es consumido como aperitivo (Roldán, 2022).

Para la elaboración de alcohol de arroz, se deben incubar esporas de *Aspergillus oryzae* al arroz cocido a una temperatura de 42 °C para conseguir se desarrolle el hongo y este secreta enzimas proteolíticas que degraden el almidón del arroz produciendo azúcares, se trata de un proceso muy riguroso que tarda aproximadamente de 3 a 4 días (Falero y Doncel, 2021).

Según los datos históricos, el uso de este hongo se remonta a los ancestros de las culturas japonesa y china donde se empleaba para elaborar diversos productos gastronómicos de forma natural tales como: la salsa de soja, el miso o el shochu (Shinbashi y Ku, 2011).

Debido a los avances biotecnológicos, las enzimas secretadas por dicho hongo, tales como α -amilasa, β -amilasa o glucoamilasas, pueden ser producidas a nivel industrial para su posterior uso en campo de la gastronomía, reduciendo el tiempo de desarrollo de los productos alimenticios (Beltrán y Maldonado, 2002).

2.1 Clasificación taxonómica del arroz

El arroz es la semilla obtenida de diversas plantas del género *Oryza*, siendo las variedades *Oryza sativa* (origen asiático) y *Oryza glaberrima* (origen africano) las más consumidas y comercializadas; este cereal, perteneciente a la familia de las gramíneas (Poáceas), es el más cultivado a nivel nacional y es considerado un alimento básico de la dieta diaria de los ecuatorianos (Webb, 2001).

La clasificación taxonómica del arroz se puede apreciar en la Tabla1.

Tabla 1. Taxonomía del arroz

Reino	Plantae
Familia	Poaceae
Genero	<i>Oryza</i>
Especie	Sativa

Fuente: Noches, 2019

Elaborado por: El Autor

2.2 Almidón de arroz

El almidón es una macromolécula que representa el 80 % del grano de arroz tratándose de un polímero hipoalergénico altamente digerible; este es

usualmente usado en la industria alimentaria debido a sus propiedades gelificantes y espesantes, está conformado principalmente por amilosa y amilopectina, en una proporción de 25 y 75 %, respectivamente (Montoya, 2021).

El almidón suele estar presente en diversas partes de la planta como son los tallos, las raíces, tubérculos y en las semillas, su nombre de varía dependiendo del origen de su extracción; así, cuando este se extrae de gramíneas se denomina almidón y cuando se extrae de raíces y tubérculos se lo suele llamar fécula, en el caso del arroz se denomina almidón ya que se encuentra en el grano (Holguin, 2019).

2.2.1 Composición del almidón.

2.2.1.1 Amilosa.

La amilosa, es una unidad de glucosa cuyos monómeros están alineados en cadenas no ramificadas unidas entre sí por enlaces α -1,4; dicha macromolécula se obtiene de la condensación de las D-glucopiranosas a través de los enlaces α -1,4 (Trujillo, 2022).

2.2.1.2 Amilopectina.

Esta macromolécula se diferencia de la amilosa por su forma ramificada la cual le confiere la peculiar forma de un árbol uniéndose al tronco central por los enlaces ramificados α -1,6 encontrándose estos localizados cada 25 a 30 unidades de glucosa, poseyendo a su vez los enlaces α -1,6 como en la amilosa; comprende el 75 % de todas las cadenas de almidones, posee una estructura altamente ramificada y por este motivo su masa molecular es mayor a la de la amilosa (Trujillo, 2022).

2.3 *Aspergillus oryzae*

El hongo *Aspergillus oryzae*, también conocido como kōji, es un hongo de gran relevancia en Asia, debido a que con él se elabora el sake, bebida alcohólica típica de estos países (Huaracha, 2021).

Dicho hongo, perteneciente al género *Aspergillus* y a la familia Trichocomaceae, produce una reacción enzimática, previamente cultivado en arroz cocido e incubado a una temperatura aproximada de 42 °C durante tres a cuatro días generando así α -amilasa y α -glucosidasa atacando los enlaces α -1,4 de la amilosa y los enlaces α -1,6 de la amilopectina, rompiendo estos enlaces generando así azúcares más simples; el cultivo madre de este hongo se usa para preparar bebidas y productos a partir de diversidad de cereales para poder ser aplicado a los alimentos que se vayan a procesar (Huaracha, 2021).

Se evidencia el uso de este hongo desde la antigua China, básicamente en rituales de la dinastía Zhou donde trajo avances tecnológicos en las técnicas gastronómicas (Shinbashi y Ku, 2011).

También se evidencia su uso extendido en el Japón desde el 1000 A.C., empleado en la descomposición del almidón del arroz y la soja para su posterior fermentación y preparación de salsa, respectivamente (Beltrán y Maldonado, 2002).

2.4 Proceso tradicional de elaboración de alcohol de arroz

El hongo *Aspergillus oryzae* es un microorganismo que usa el proceso de fermentación en estado sólido. Esto significa que son microorganismos que crecen en tres fases (Herrera y Salazar, 2021).

- Fase sólida: donde la spora del hongo es inoculada en muestra de prueba de arroz cocido
- Fase gaseosa: fase donde interviene el aire que se encuentra entre las partículas ayudando al proceso de esparcimiento del hongo

- Fase líquida: se compone de una película líquida en el arroz cocido sólido.

2.4.1 Pulido del grano.

El grano de arroz debe encontrarse plenamente pulido, de dicho proceso dependerá del tipo de sake que se quiera obtener ya que en función del grado de pulido que se obtenga será la clasificación final que se dé a la bebida (Medina, 2022).

El nombre de esta fase de elaboración es conocido en japonés como Seimai, siendo un proceso industrial donde el arroz se deja caer verticalmente sobre dos piedras que giran en direcciones opuestas hasta lograr el pulido requerido (Medina, 2022).

Posterior a esto, el arroz se muele de igual forma y se retiran los polvos de desecho donde se encuentran proteínas y diversas sobras remanentes de la cáscara, removiendo también la parte del grano que cubre al endospermo de manera delicada ya que un aumento en la temperatura podría ocasionar la pérdida de capacidades de absorción de agua y causarían una fermentación incorrecta; así obtiene el almidón para que se pueda luego romper sus enlaces en la fermentación por estado sólido (Murillo, 2022).

2.4.2 Lavado del grano y remojo.

Seguidamente, los granos se lavan a fin de eliminar el polvo que se genera al ser pulidos; después se someten a remojo para que absorban una cantidad aproximada del 30 % de agua del recipiente (Gil, 2013).

2.4.3 Cocción del grano.

Seguidamente el arroz se cocina a vapor en un recipiente de madera llamado Koshiki, el cual antiguamente poseía un agujero por donde llegaba el vapor (Humbert, 2015).

2.4.4 Preparado del Koji.

Al proceso de mezclar el arroz cocido con esporas de *Aspergillus oryzae* se denomina koji. Esta etapa se lleva a cabo incubando estas esporas para que segreguen enzimas que transforman el almidón en azúcar y suele durar entre 40 a 64 horas, dependiendo de las condiciones de temperatura, humedad y grado de pulido (Gil, 2013).

2.4.5 Preparación del Shubo.

Una vez obtenido el koji se procede a mezclar con arroz cocido y agua y se añaden levaduras del género *Saccharomyces*, en Japón suelen usar la levadura *Saccharomyces sake* ya que esta origina una mayor producción de etanol (Heberlein, 2004).

La mezcla se dejará fermentar durante dos a tres semanas donde el koji trabajará en conjunto con la levadura para obtener el alcohol. En esta etapa las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa generadas en el koji, romperán los enlaces α -1,4 de la amilosa en el caso de la enzima amilasa y los enlaces α -1,6 de la amilopectina en el caso de la α -glucosidasa, generando respectivamente maltosa y glucosa (Shurtleff y Aoyagi, 2012). Al proceso previo a la fermentación donde se mezcla koji, arroz, levadura y el agua se le conoce como Shubo, luego de esta mezcla se obtiene como resultado el moromi iniciando la fermentación antes mencionada (Páez, 2010).

2.4.6 Preparación del moromi y sandan shikomi.

A diferencia de otros procesos de fermentación el del arroz tiene sus particularidades, una vez realizado el proceso de moromi, se realizan una serie de pasos a los cuales se les denominan Sandan Shikomi (Gil, 2013). En el Sandan Shikomi el primer día se añade al maromi el shubo y se deja reposando para que la levadura multiplique su población; el tercer día se añade el doble de maromi y koji y en el día cuarto, el doble de maromi y koji que el día anterior, luego de finalizado el sandan shikomi se deja fermentar de 18 a 32 días (Manrique, 2020).

2.4.7 Prensado.

En el proceso del sake hay una etapa de prensado en la que se presiona por una malla para separar el sake del arroz sólido, existen tres formas de hacerlo:

- Tradicional: se coloca el arroz en un saco preferentemente de algodón para luego dejarlos en cajas e ir presionando con la tapa para que el arroz filtre por la parte inferior (Manrique, 2020).
- Mecánico: utiliza bombas para llevar el moromi a una máquina donde se inflarán globos de goma para exprimirse (Gil, 2013).
- Shizuku: emplea sacos de algodón donde se deposita el moromi para suspenderlo en el aire y a través del peso del arroz fermentado y la gravedad, el fluido cae por goteo, este método suele ser usado en la elaboración de sakes de mayor calidad (Gil, 2013).

2.4.8 Filtrado.

Luego de la etapa de prensado se deja reposar el sake durante 10 días y pasa a un proceso llamado Roka donde se filtra la bebida usando carbón en polvo, la cual dependiendo de la variedad de sake se usa filtrado o no (Manrique, 2020).

2.4.9 Pasteurización.

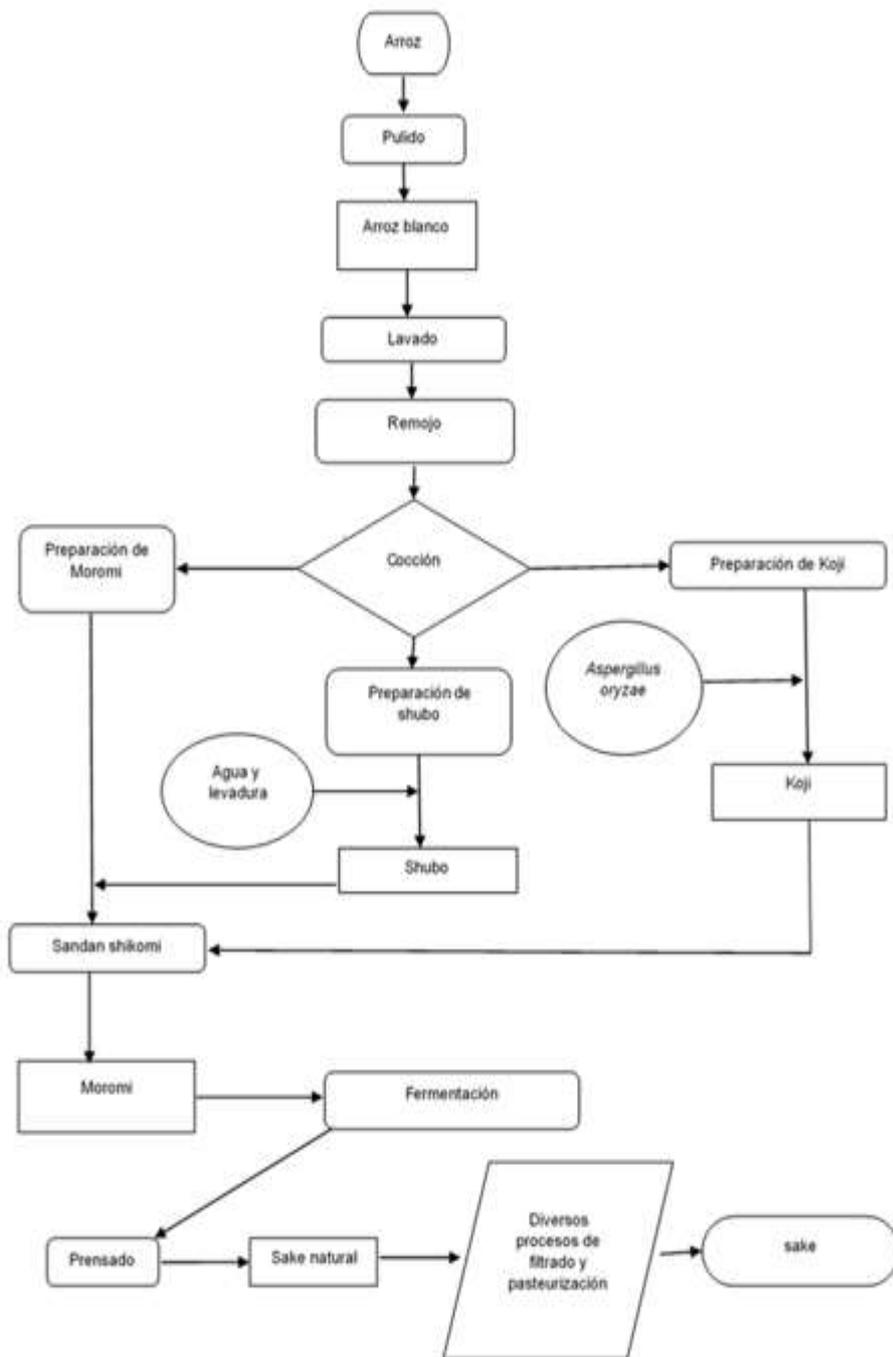
El Hi-re es la etapa de pasteurización del sake y se hace de dos formas: embotellado o previo al embotellado. La bebida se calienta a 65 °C en el caso de no estar embotellado y en el caso del sake embotellado se sumerge en un baño de agua a la misma temperatura, antiguamente este método no se usaba si no que más bien el sake era llevado a lugares fríos con la finalidad de que no perdiera sus cualidades organolépticas (Valle, 2021).

Hay otros tipos de sake como el Geshu Nama Muroka el cual, al igual que el Muroka, no es filtrado, pero con la particularidad de que en esta variedad no se ha pasteurizado (Manrique, 2020).

2.4.10 Proceso de elaboración de alcohol de arroz.

En el Gráfico 1, se muestra el proceso tradicional de elaboración de alcohol de arroz japonés.

Gráfico 1. Proceso de elaboración de alcohol de arroz japonés



Fuente: Gil, 2013
 Elaborado por: El Autor

2.5 Hidrólisis

La palabra hidrólisis viene de las voces griegas *hydro*: agua y *lysis*: ruptura, por lo que se puede entender que se trata de un proceso en el cual se origina una reacción química ya sea de forma natural o por un catalizador (Reyna et al., 2004).

En esta reacción el hidrógeno y el oxígeno del agua dividen sus moléculas para formar enlaces químicos con el soluto que forma parte de la disolución que se hidroliza, de esta manera rompen los enlaces complejos generando cadenas más simples (David, 2021).

Los procesos de hidrólisis y condensación son contrarios, en la condensación las moléculas se unen obteniendo un producto y una molécula de agua y en la hidrólisis por el contrario el proceso se ve influenciado por diversos factores tales como: concentración enzima-sustrato, tiempo, temperatura, pH, fuerza iónica y la presencia de catalizadores (David, 2021).

La enzima α -amilasa alcanza su valor final de conversión de azúcares reductores a los 30 minutos de iniciada la hidrólisis, durante este proceso la enzima transforma los almidones en dextrinas, rompiendo las moléculas de almidón al reaccionar esta con el calor a partir de los 95 °C; con un rango de pH ideal para la hidrólisis entre 6.20 y 6.50 alcanzando el pico de producción de azúcares reductores a la media hora de iniciada la hidrólisis, una vez finalizado el proceso el pH desciende a 6.20 (González y Molina, 2006).

Por lo general, el índice de granos de almidón que se convierten en azúcares fermentables suele ser bajo en la hidrólisis enzimática, de esta forma se observa en estudios que el proceso se vuelve lento y deficiente (Oates, 1997).

En los últimos años se ha evidenciado que el uso de enzimas amilasas provenientes de otras variedades del *Aspergillus*, tales como el *Aspergillus*

niger y el *Aspergillus kawachi* dan el paso a un trabajo sinérgico entre ellas para poder hidrolizar el almidón de forma más rápida y efectiva durante un solo proceso con temperaturas moderadas por debajo de la gelatinización del almidón. Sin embargo, regulando y manteniendo el pH a un valor de 6.45 a 6.5 y con un manejo adecuado de temperaturas que están por encima de la gelatinización se puede obtener una hidrólisis óptima (González y Molina, 2006).

La actuación conjunta de glucoamilasa con α -amilasa permite una hidrólisis más efectiva, mientras la glucoamilasa perfora de manera profunda la α -amilasa permite que estos orificios se amplíen y así se mejora la liberación de los azúcares reductores en especial de glucosa y maltosa, esta sinergia permite una mayor obtención de azúcares reductores que luego del proceso de dextrinización son sacarificados (Ordóñez, 2022).

2.5.1 Hidrólisis química.

El proceso de hidrólisis por métodos químicos se realiza por la adición de diferentes ácidos como catalizadores, estos hacen que el almidón se descomponga parcialmente en dextrosas para usarlas como jarabe de glucosa, en este método la transformación es parcial, debiéndose neutralizar y filtra el hidrolizado producido, a fin de recuperar el almidón sobrante (Izarra y Peña, 2022).

Como consecuencia de esta hidrólisis parcial se produce una fermentación de los azúcares reductores muy baja obteniéndose un rendimiento menor; al someter al almidón a un medio ácido, los residuos de la hidrólisis no se puedan aprovechar con fines alimenticios, además los residuos pueden generar problemas de corrosión de equipos de laboratorio o industriales si no se procede a una limpieza adecuada (Izarra y Peña, 2022).

2.5.2 Hidrólisis enzimática.

El proceso consiste en añadir enzimas de grado alimentario, comerciales o sintetizadas a los almidones para que a través de la hidrólisis se puedan obtener azúcares reductores como dextrosas, maltodextrinas, glucosas y demás; de esta forma, se pueden controlar las dosis necesarias para cada tipo de almidón y el tipo de azúcar reductor que se desea obtener regulando la cantidad de cada enzima utilizada (Miranda, 2022).

Los almidones se degradan de formas diversas dependiendo de las enzimas que se apliquen al proceso de hidrólisis: En el malteado de granos, los almidones se degradan en poli glucosas y solamente liberan una mínima cantidad de azúcares simples; esto es debido a la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, ya que, cada enzima ataca de forma específica a ciertos enlaces en la cadena de almidones haciendo que el proceso de degradación a azúcares más simples suceda de forma más efectiva (Espitia, 2009)

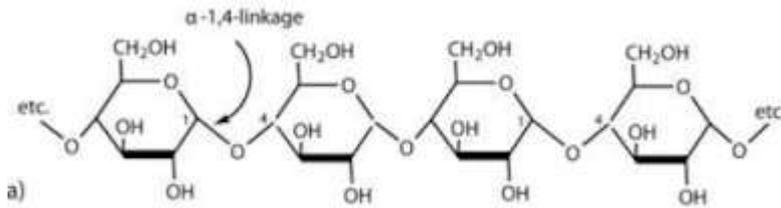
Las enzimas empleadas en los procesos de hidrólisis poseen diversos orígenes y atacan diferentes partes de la cadena de almidones.

2.6 Enzimas empleadas en la hidrólisis del almidón de arroz

2.6.1 α -amilasa.

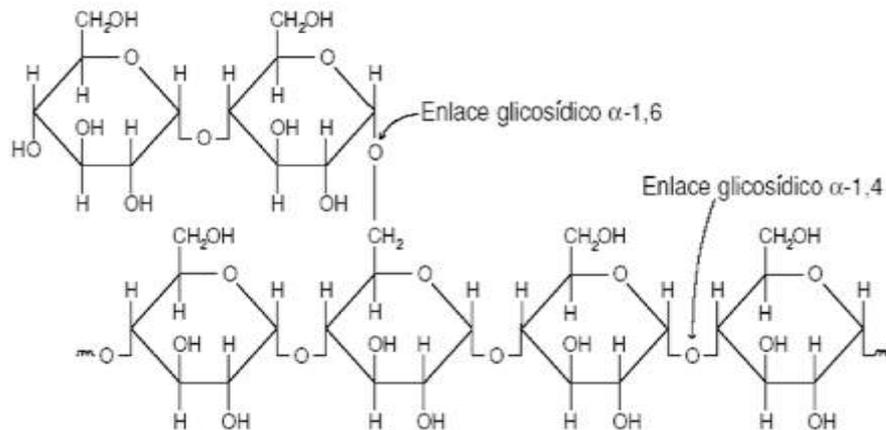
Esta enzima hidroliza el almidón de arroz por los enlaces α -1,4 los cuales están ubicados en la parte central de las cadenas de amilosa y las amilopectinas tal y como se observa a continuación en los Gráficos 2 y 3; esta enzima no hidroliza las cadenas que se encuentran cercanas a las ramificaciones (López, 2022).

Gráfico 2. Cadena de amilosa



Fuente: Maknun, 2018

Gráfico 3. Cadena de amilopectina



Fuente: Herrera y Salazar, 2021

El hongo *Aspergillus oryzae*, así como diversos bacilos entre los cuales se destacan el *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus polymixa* y el *Bacillus licheniformis* generan α -amilasa, esta enzima es la encargada de generar la maltosa empleada para la fermentación, así como diferentes oligosacáridos de tamaños variables (Quispe, 2022).

En la industria de alimentos se suele usar esta enzima para la elaboración de diversos productos derivados de harinas y almidones, así como en otras industrias como la de biocombustibles, detergentes, papel y en diversos productos farmacéuticos, también se puede encontrar como reactivo en pruebas médicas de laboratorio (Poma, 2021).

En sus orígenes las enzimas amilasas no se encontraban sintetizadas y se obtenían de la saliva humana; siendo estas de vital importancia en el proceso digestivo de los animales, descomponiendo los almidones para formar fragmentos de glucosa, dextrinas, maltosa (Mex-Álvarez et al., 2022).

En la historia del Ecuador tenemos como bebida fermentada tradicional de la amazonia la chicha obtenida de la yuca cuyos almidones eran sintetizados por las amilasas de la saliva al ser masticada esta raíz para dejarla descomponer y luego fermentar (Caiza, 2022).

La amilasa fue aislada por el químico francés Anselme Payen en el año 1833, bautizándola en principio con el nombre de diastasa, hoy se obtiene α -amilasa sintetizada de diversos hongos y bacterias benéficas usadas en la industria de alimento (Singh et al., 2022).

2.6.2 β - amilasa.

La β - amilasa también conocida como α -1,4 glucan-maltohidrolasa es una enzima que al igual que la α -amilasa ataca los enlaces α -1,4 glucosídicos tal y como se observa en los Gráficos 2 y 3, con la excepción de que esta actúa en la parte externa de los enlaces separando las unidades de maltosa desde extremos no reductores, atacando solo desde uno a la vez, resultando menos efectiva cuando está sola, pero mezclada con α -amilasa obtiene un valor más elevado de maltosa y dextrina (J. Miranda y Candia, 2022).

La enzima β - amilasa suele ser obtenida del *Aspergillus oryzae*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces* sp. (Espitia, 2009).

2.6.3 Glucoamilasa.

La glucoamilasa es obtenida de los microorganismos *Clostridium thermodyrosulfurico*, *Leuconostoc*, *Enterobacter*, es una enzima ramificadora, también se la suele conocer como α -1,4-glucan-glucohidrolasa, es una carbohidrolasa que tiene una acción externa ya que genera glucosa a partir

de los enlaces terminales no reductores en las cadenas de almidones, rompe los enlaces glucosídicos α -1,3 α -1,4, α -1,6 tal y como se observa en los Gráficos 2 y 3. Las glucoamilasas son incapaces de hidrolizar totalmente los almidones en glucosa, debido a que para darse esto se requiere de la participación de enzimas endoproteasas (Camposano y Alejandro, 2021).

La actuación conjunta de glucoamilasa con α -amilasa permite una hidrólisis más efectiva, mientras la glucoamilasa perfora de manera profunda, la α -amilasa permite que estos orificios se amplíen y así se mejora la liberación de los azúcares reductores en especial de glucosa y maltosa, permitiendo una mayor obtención de azúcares reductores que luego del proceso de dextrinización, sacarifican estos azúcares (Camposano y Alejandro, 2021).

2.6.4 Pululanasa.

Existen dos tipos de pululanasa, la de tipo I y la de tipo II.

La pululanasa de tipo I es producida por los microorganismos: *Shewanella arctica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoleovorans*, *Tunisian messaoud*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Exiguobacterium sp.*, *Fervidobacterium pennavorans*, *Klebsiella variicola*, *Thermotoga marítima*, *Paenibacillus polymyxa* (Bertoneri, 2021).

Esta enzima tiene acción en la parte ramificada de la cadena, descomponiéndola, actúa sobre los enlaces α -1,6 de la amilopectina, en este proceso solamente libera como único azúcar reductor la maltosa, empleándose también para subir el nivel de sacarificación a uno más óptimo ya que eleva la liberación de glucosa (van der Maarel et al., 2002).

La pululanasa de tipo II es producida por los microorganismos: *Pyrococcus yayanosii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Bacillus sp.*, *Halorubrum sp.*, *Staphylothermus marinus*, *Pyrobaculum calidifontis*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Streptococcus infantarius* (Bertoneri, 2021).

La pululanasa tipo II tiene la capacidad de atacar los enlaces α -1,4 desramifica la amilopectina produciendo una mezcla de dextrinas y pocos azúcares (Bertoneri, 2021).

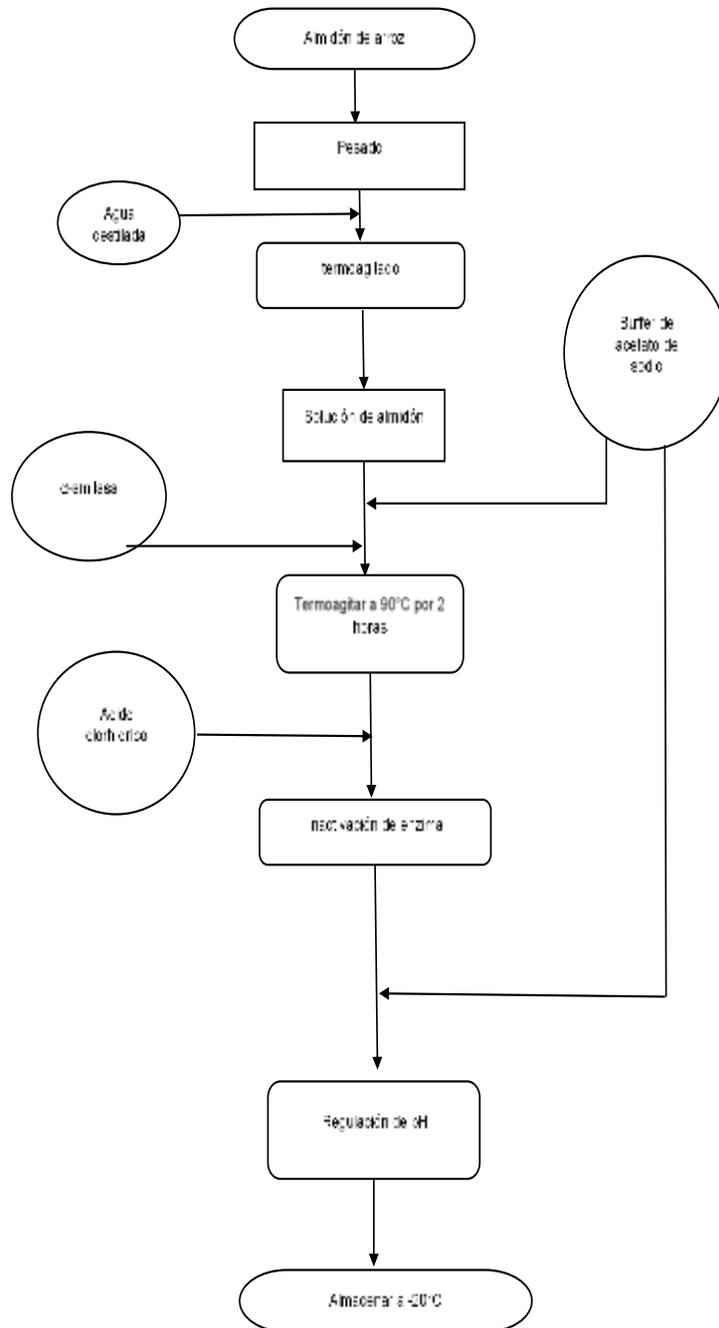
2.6.5 α -glucosidasa.

La enzima α -glucosidasa necesita de agua para producir la hidrólisis atacando los enlaces α -1,4 y el α -1,5 con menor frecuencia, esta enzima se la puede obtener de hongos del género *Aspergillus*, tales como el *oryzae*, *niger* y por el *Rhizopus niveus* (Gonzalez, 2002).

2.7 Proceso de hidrólisis

En el Gráfico 4 se presenta el proceso de hidrólisis mediante la enzima α -amilasa donde se obtiene el jarabe de glucosa que se somete a fermentación por *S. cerevisiae*.

Gráfico 4. Proceso de hidrólisis.



Fuente: Espitia, 2009
Elaborado por: El Autor

2.8 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso mediante el cual azúcares como la fructosa, glucosa, maltosa, se transforman en etanol por medio de la intervención anaerobia del hongo *Saccharomyces cerevisiae*, por lo tanto, es un proceso biológico con una oxidación incompleta donde se origina también dióxido de carbono (López et al., 2019).

El *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura perteneciente al reino *fungi*, esta levadura es unicelular, siendo usada en la industria alimenticia no solo en la elaboración de bebidas alcohólicas si no también en la industria de harina y en la industria de láctea (Herrera et al., 2019).

En el proceso de fermentación se dan reacciones iguales a la glucólisis, el metabolismo de la levadura busca oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía al igual que lo hace la célula en el proceso antes mencionado, es así que se dan al menos 10 reacciones enzimáticas en las cuales la glucosa se transforma en dos moléculas de piruvato con la diferencia de que en la fermentación se necesita de etapas adicionales (Arias y Castro, 2011).

En la primera etapa el carbono que contiene el piruvato reacciona ante el pirofosfato de tiamina obteniendo así la descarboxilación generando un acetaldehído ligado a una coenzima 2- hidroxietil (Espitia, 2009).

En la segunda fase el acetaldehído se convierte en etanol reduciéndose a este por la acción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido hidrogeno (NDAH⁺) catalizando esta reacción el alcohol-deshidrogenasa, concluyendo estas reacciones con la formación de tri fosfato de adenosina (Mormeneo-Segarra, 2019).

Aunque el proceso es anaerobio, durante el crecimiento del cultivo de levaduras estos se ven influenciados por el oxígeno de una forma severa utilizando así la glucosa oxidándola completamente, es en esta etapa cuando

se genera bastante energía que se fija por el sistema de ADP-ATP que luego conlleva a la síntesis celular, consumiendo estas cantidades grandes de energía (Ramírez, 2022).

Es así que el cultivo alcanza el número necesario de células que permiten la degradación de la materia prima, en esta fase se procede a acondicionar anaeróbicamente el medio procediendo a la producción de dióxido de carbono. Pasando a condiciones anaerobias, las células se ven impedidas de aporte energético siendo la reproducción celular mínima en esta fase (Hungría y Alvarado, 2018).

2.9 Producción de alcohol a partir del almidón hidrolizado.

El proceso de fermentación comienza a partir del mosto que se obtiene de la hidrólisis del almidón de arroz tratado con enzima α -amilasa comercial, después de esto se añade a cada muestra un 100 % de agua de su total de peso, con lo cual el mosto queda repartido en 50 % de agua y 50 % de almidón hidrolizado. Se emplea el *Saccharomyces cerevisiae* como levadura para fermentar las muestras (Ramírez, 2022).

Durante la inoculación las levaduras se reproducen en el mosto y en contacto con el oxígeno, de esta forma las condiciones se vuelven óptimas para la fermentación. El mosto debe presentar un nivel de azúcar de 15° a 18° Brix para que la fermentación sea adecuada (Espitia, 2009).

El mosto concluye la fermentación aproximadamente de 10 a 15 días, cuando se evidencia la reducción en la producción de dióxido de carbono; para evitar que el oxígeno ingrese, existen diversos métodos como filtros de aire, tapones con manguera y filtro de agua o sellar la cuba de fermentación o envase con un material de caucho o látex con pequeños agujeros por donde escapará el dióxido de carbono (Ordóñez, 2022)

Una vez finalizado el proceso de fermentación es recomendable dejar reposar el producto hasta que los sólidos se depositen al fondo formando pozos, para este efecto se puede utilizar albúminas o materiales gelificantes (Ordóñez, 2022).

Una vez culminada la decantación se procede a extraer el licor cuidadosamente sin que los pozos se mezclen para después proceder a filtrarlo las veces que sea necesaria para clarificar (Ramírez, 2022).

Posterior a esto se mide el grado alcohólico para clasificarlo según el tipo de vino deseado; el alcohol extraído de cereales por lo general presenta aroma delicado y sabor excelente, también se puede proceder a añejar el producto o a destilarlo si es que se desea obtener una bebida de mayor grado alcohólico, finalmente se lo envasa en botellas previamente esterilizadas y adecuadas para cada tipo de alcohol (Ordóñez, 2022).

2.9.1 Rendimiento del proceso.

Es necesario el cálculo del rendimiento dentro del proceso hidrolítico ya que ayuda a determinar la muestra que obtuvo un mejor porcentaje de alcohol en relación al sustrato y la cantidad de enzimas (Espitia, 2009).

El parámetro determinante en el rendimiento de la hidrólisis según lo reportado por Chen et al. (2007) es la cantidad de enzima aplicada a una misma cantidad de sustrato; donde el rendimiento mejora a medida que se aplica una mayor cantidad de enzima para obtener azúcares reductores.

2.10 Azúcares reductores

Según Lifeder (2022): “son biomoléculas de carbohidratos que poseen la función de dar electrones a otras moléculas a través de un grupo carbonilo conformado por carbono unido al oxígeno por un enlace doble, debido a esto se les llama reductores y por la ubicación del grupo carbonilo en la cadena los

monosacáridos son todos azúcares reductores, ya que si el carbonilo se encontrara en otro lado serian cetonas o aldehídos”

2.10.1 Método de Fehling para determinación de azúcares reductores.

Este método se basa en una solución alcalina de cobre que reacciona al contacto con los azúcares obteniendo un color rojo ladrillo en la muestra de estudio provocando que reaccionen la fructosa, galactosa, glucosa, maltosa y lactosa, así forman óxido cuproso al entrar en contacto con el licor de Fehling a temperatura de ebullición (Cobos et al., 2017).

El licor de Fehling está formado por la mezcla del reactivo de Fehling A que contiene sulfato cúprico, agua destilada hasta 1 000 mL y el reactivo de Fehling B que contiene tartrato mixto de potasio (sal de seignette) y sodio, hidróxido de sodio y agua hasta 500 mL (Cobos et al., 2017).

2.11 Porcentaje de alcohol

Para hablar de porcentaje de alcohol en cálculos matemáticos tenemos que remitirnos a lo publicado por Oddone (2020) quien establece una relación entre el consumo y producción en las reacciones propias del proceso de fermentación.

Se establece que 1 g de glucosa genera 0.511 g de etanol, 0.489 d de CO₂ y energía, pero la eficiencia de la reacción no es al 100 % si no al 95 %, de esta forma 1 g de glucosa genera 0.484 d de etanol sumados a 0.463 d de CO₂ más los subproductos de la fermentación y energía (Oddone, 2020).

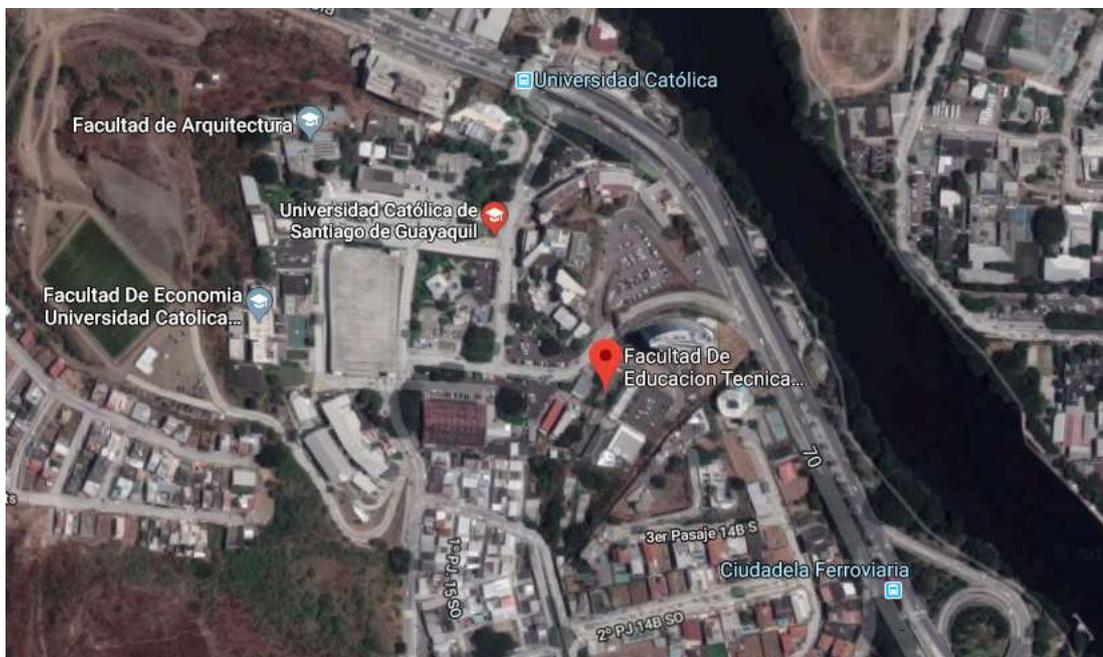
Se concluye que en el proceso de fermentación se generan aproximadamente 1.05 g de alcohol, viéndose disminuida la densidad del mosto a medida que este fermenta, hay que tener en cuenta la densidad del alcohol etílico que equivale a 0.79 kg/L (Oddone, 2020).

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Ubicación del ensayo

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, en la avenida Carlos Julio Arosemena.

Gráfico 5. Ubicación geográfica del laboratorio de microbiología



Fuente: Google maps, 2023

3.2 Tipo de investigación

La presente investigación es de nivel experimental para establecer las concentraciones de α -amilasa que generen grado alcohólico igual o superior a alcoholes obtenidos del arroz.

Al mismo tiempo la investigación es de carácter descriptivo ya que en ella se detalla paso a paso el procedimiento de hidrólisis y posterior fermentación para la obtención del alcohol del hidrolizado de almidón de arroz.

Mediante el software *Minitab 20* se realizó la evaluación estadística y se logró determinar cuál de las concentraciones de α -amilasa fue la adecuada.

3.3. Materiales y equipos

3.3.1 Materiales.

- Almidón de arroz comercial
- α -amilasa comercial
- *Saccharomyces cerevisiae* comercial
- Tubos de ensayo
- Gradilla de laboratorio
- Vaso de precipitación
- Agua destilada
- Pipeta
- Matraz Erlenmeyer
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Azul de metileno
- Envases fermentadores

3.3.2 Equipos.

- Termo agitador
- Termómetro
- Balanza
- Baño María de laboratorio
- Pera de succión

3.4 Diseño experimental

Para la obtención de alcohol de arroz se procedió a realizar la hidrólisis del almidón de arroz con enzima α -amilasa, usando como guía el proceso utilizado por Espitia (2009) quien aplicó hidrólisis al almidón de cebada. Una vez obtenidos los azúcares reductores mediante la hidrólisis, se fermentaron

las muestras con *Saccharomyces cerevisiae* y se obtuvo el alcohol que posteriormente se valoró su grado alcohólico. Para efectos del diseño experimental se elaboraron 5 tratamientos por triplicado, la muestra en negativo y la muestra de testigo. Estas muestras tuvieron como variables la concentración de enzima α -amilasa, los azúcares reductores obtenidos y el grado alcohólico del producto resultante.

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$; donde:

Y_{ij} : valor estimado de la variable

μ : media general

τ_i : efecto del tratamiento T_1, T_2, \dots, T_i

ϵ_{ij} : error experimental

3.4.1 Esquema del ANOVA.

A continuación, en la Tabla 2, se presenta el esquema del análisis de varianza.

Tabla 2. Esquema del ANOVA

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Total	14
Tratamientos	4
Error Experimental	10

Elaborado por: El Autor

3.4.1 Muestra testigo.

Para la muestra testigo de la presente investigación se tomó en cuenta el estudio realizado por Espitia (2009) donde elaboró una bebida alcohólica obtenida de la hidrólisis del almidón de cebada empleando cinco muestras de las cuales se tomó como testigo la muestra que mejor producción de porcentaje alcohólico generó, como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestra testigo

Almidón (g)	α-amilasa (mg)	Azúcares reductores (g/L)	% de alcohol
25	0	0	0

Elaborado por: El Autor

3.5 Unidad de análisis

3.5.1 Población.

La materia prima seleccionada para el proceso de hidrólisis y posterior fermentación fueron cinco muestras de almidón de arroz comercial y cinco muestras de enzima α -amilasa comercial, obtenidas ambas en la ciudad de Guayaquil y de uso común en la industria alimentaria.

3.5.2 Muestreo.

Para el presente estudio las concentraciones de α -amilasa 25, 30, 35, 40, 45 mg de enzima fueron tomadas de lo publicado por Ebrahimi et al.(2008) aplicándolo a menor escala debido a la poca disponibilidad de almidón de arroz y de reactivos químicos, se mantuvo las mismas concentraciones, pero en menor valor aplicando regla de tres.

Para el almidón de arroz se utilizó 25 g de almidón, lo que equivale al 10 % de lo aplicado por Espitia (2009) quien aplicó 250 g; la proporción de agua destilada usada para mantener la misma concentración fue de 50 mL en el testigo. Para la dosificación de enzima α -amilasa en las diferentes muestras se aplicaron las tomadas por el testigo con la diferencia que en la muestra de Espitia (2009). se aplicaron dosis de 10, 15, 20, 25 mg, respectivamente.

Se parte de la dosificación de 25 mg debido a que el porcentaje de almidón obtenido en un grano de arroz es mayor al de la cebada. En el resto de muestras se usó 25, 30, 35, 40, 45 mg, respectivamente.

Para la solución de Fehling se empleó 1 mL de Fehling A y 1 mL de Fehling B con 30 mL de agua destilada, manteniendo así una relación exacta en cuanto a las concentraciones usadas en la determinación de azúcares reductores realizada por Ebrahimi et al. (2008), quienes aplicaron 5 mL de Fehling A, 5 mL de Fehling B y 150 mL de agua destilada, respectivamente.

3.6 Combinaciones de las muestras

Las combinaciones de las muestras se realizaron por triplicado con las dosificaciones de enzima, las cuales se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Dosificación de α -amilasa

Almidón (g)	α amilasa (mg)
25	25
25	25
25	25
25	30
25	30
25	30
25	35
25	35
25	35
25	40
25	40
25	40
25	45
25	45
25	45
25	0

Elaborado por: El Autor

3.7 Proceso experimental

3.7.1 Hidrólisis del almidón de arroz.

Con el objetivo de liberar los azúcares contenidos en el almidón de arroz se procedió a elaborar una solución de 25 g de almidón en 50 mL de agua destilada, se obtuvo 5 muestras de solución donde se aplicó 25, 30, 35, 40, 45 mg de enzima α -amilasa, respectivamente; las muestras fueron realizadas por triplicado.

La hidrólisis se llevó a cabo en vasos de precipitación llevados a termo agitación constante durante 2 horas hasta llegar a 90 °C, habiendo añadido previamente 50 mL de buffer de acetato de sodio de pH 5.5. Una vez terminado el proceso de hidrólisis enzimática se añadió HCl al 2 N hasta llegar a un pH de 2.5 y luego se elevó el pH con el buffer de acetato; se dejó reposar las muestras y posteriormente fueron conservadas en refrigeración a -20 °C (Ebrahimi et al., 2008).

Para el control negativo (testigo) se realizó el mismo proceso bajo las mismas condiciones sin la aplicación de enzimas.

3.7.2 Determinación de azúcares reductores.

A fin de determinar la cantidad de azúcares reductores producidos tras someter a las muestras al proceso de hidrólisis, se utilizó el reactivo de Fehling

Para calcular el valor del título se obtuvo una solución al 0.5 % (m/v) cuyo soluto fue glucosa anhidra y su solvente agua destilada. Elaborada la solución de glucosa se procedió a calcular el título para lo cual fueron vertidos en un matraz erlen meyer 1 mL de solución de Fehling A y 1 mL de solución de Fehling B, luego se añadió 30 mL de agua destilada usando perlas o cristales de ebullición para evitar posibles salpicaduras. Posteriormente se llevó a termo agitación sobre malla de asbesto hasta generar ebullición (NTC 5146, 2008).

Iniciada la ebullición del reactivo de Fehling, se esperó de 1.30 a 2 minutos y se procedió a añadir la solución de glucosa mediante una bureta hasta que la coloración se tornó pálida y se añadió 2 gotas de azul de metileno, se prosiguió añadiendo la solución de glucosa hasta que el licor de Fehling cambió a un color rojo arcilloso o ladrillo. Durante esta etapa del proceso hasta la valoración no deben transcurrir más de 3 minutos y tratar de mantener la temperatura y agitación (NTC 5146, 2008).

Tomando en cuenta la norma (NTC 5146, 2008) los gramos de glucosa se calcularon por la ecuación siguiente:

$$t = \frac{P_g \times V_g}{100_{ml} \text{solucion}} [g]$$

P_g = peso de glucosa empleado para preparar la solución patrón

V_g =volumen del patrón empleado para titular la solución de Fehling

t = título en gramos de glucosa

Según la norma (NTC 5146, 2008) para realizar la determinación de azúcares reductores en las muestras se reemplaza la solución de glucosa por una solución del almidón hidrolizado al 0.5 % m/v. Una vez obtenidos los valores en mL se realizó la siguiente ecuación:

$$G = \frac{1000_{ml} \times t}{V_g \times V_a} \left[\frac{g}{l} \right]$$

G = azúcares reductores en gramos de glucosa por litro de solución.

t = título en gramos de glucosa

V_g = volumen que se utilizó en la titulación

V_a = volumen de la alícuota

3.7.3 Fermentación de las muestras.

Una vez obtenido el hidrolizado y calculado sus azúcares reductores, se procedió a la fermentación de las muestras, donde se aplicó 0.05 g de levadura para cada una de las muestra (Cáceres-Farfán et al., 2008). Posterior a la inoculación se inició con el proceso aerobio durante dos horas y luego se procedió a llevar la fermentación de forma anaerobia por un periodo de dos semanas, donde se evidenció la finalización de la fermentación con la formación de pozos por decantación (Robles, 2021).

3.7.4 Determinación de porcentaje de alcohol.

Debido a la pequeña cantidad de cada una de las muestras no se pudo destilar para obtener un porcentaje de alcohol exacto por lo cual se recurrió a las fórmulas que compara las densidades del mosto con las densidades del producto fermentado (Oddone, 2020).

$$g \text{ de alcohol/L} = (\partial_o - \partial_f)1.05$$

∂_o = densidad inicial del mosto

∂_f = densidad final del mosto

1.05 = g de alcohol por g de CO₂ producido

A ese resultado para llevarlo a porcentajes se le corre un decimal para que quede expresado en p/v %, para luego llevarlo a v/v % se aplica lo siguiente según lo establece Oddone (2020).

$$\text{grado alcoholico } \%_{\frac{v}{v}} = \frac{\frac{p}{v} \%}{\partial \text{ de alcohol etílico}}$$

$\partial \text{ de alcohol etílico} = 0.79 \text{ kg/L}$

3.7.5 Rendimiento en el proceso de hidrólisis.

Para calcular el rendimiento en el proceso de hidrólisis enzimática se empleó la siguiente fórmula usada por (Chen et al., 2007).

$$\text{Rendimiento de hidrolisis \%} = \frac{\text{Azúcares reductores} \times 0.9 \times 100}{\text{Polisacárido en el sustrato}}$$

3.7.6. Cálculo del beneficio costo.

Para el beneficio costo se realizó el cálculo con los valores de las cantidades utilizadas de los ingredientes del experimento donde se incluyen

los costos comerciales de la enzima α -amilasa, así como el costo del almidón y de los envases para un litro de alcohol; este costo se comparó con el valor comercial en el mercado de un producto similar, estimado en USD 3.00; para el cálculo del beneficio costo se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\textit{beneficio}}{\textit{costo}} = \frac{\textit{PVP}}{\textit{Costo unitario}}$$

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Concentración de α -amilasa para hidrolizar almidón de arroz

Como se puede observar en la Tabla 5 todas las muestras de almidón de arroz fueron hidrolizadas por la enzima α -amilasa obteniéndose como resultado diferentes concentraciones de azúcares reductores. Las dosis de 40 g y 45 g fueron las que representaron mayor cantidad de azúcares reductores, teniendo las muestras a las que se aplicó una dosis de 45 g un mayor crecimiento en comparación al resto de muestras.

Dentro de las muestras a las cuales se aplicó dichas concentraciones se comprueba lo reportado por (Kolusheva y Marinova, 2007); así como por (Espitia, 2009) que los medios y las condiciones utilizadas en el proceso fueron adecuados.

4.2 Cuantificación de azúcares reductores

Se puede verificar según la Tabla 5, que los resultados de azúcares reductores obtenidos aumentan conforme aumenta la concentración de α -amilasa.

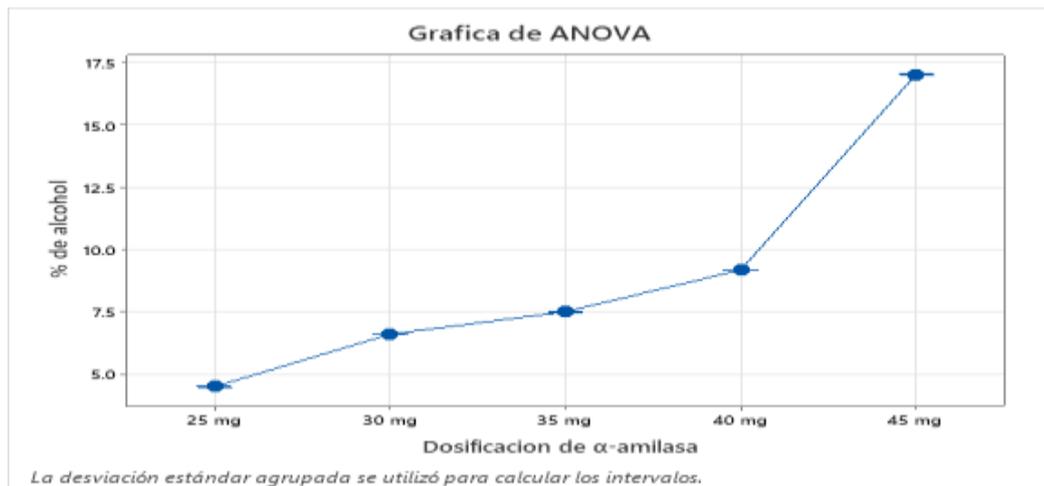
Tabla 5. Azúcares reductores obtenidos

Almidón (g)	α -amilasa (mg)	Título (g de glucosa)	Azúcares reductores (g/L)
25	25	5.500	59.000
25	25	5.501	59.080
25	25	5.502	59.060
25	30	3.801	85.500
25	30	3.800	85.520
25	30	3.801	85.500
25	35	3.400	95.500
25	35	3.401	95.560
25	35	3.400	95.500
25	40	3.001	108.250
25	40	3.002	108.260
25	40	3.003	108.225
25	45	2.002	162.500
25	45	2.000	162.500
25	45	2.010	161.690

Elaborado por: El Autor

La cantidad de azúcares reductores obtenidos es proporcional a la dosificación de enzimas α -amilasas aplicadas en cada muestra, como se puede observar en el Gráfico 6, existe un salto lineal entre la dosis de 40 mg a la de 45 mg con respecto a los porcentajes de alcohol obtenidos.

Gráfico 6. Cuantificación de azúcares

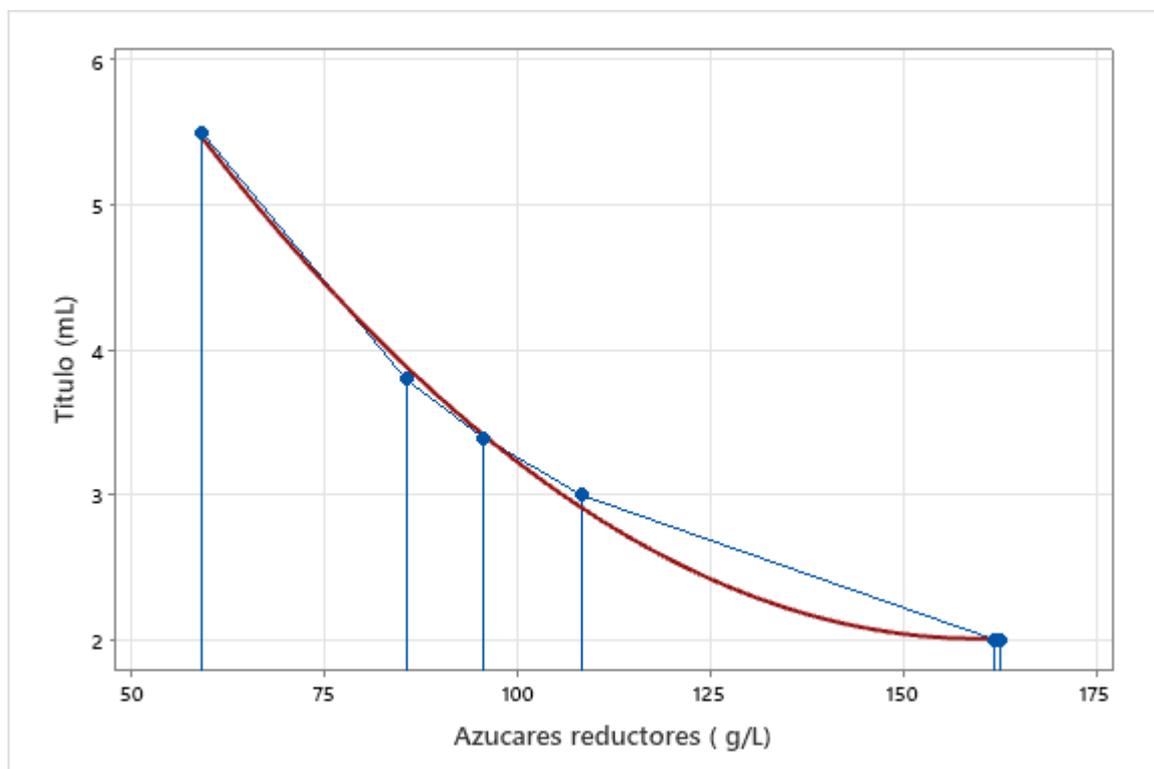


Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Comparando la cantidad de azúcares reductores obtenidos con la cantidad de mL de glucosa usada para titular el licor de Fehling se puede concluir que después de la dosis de 45 mg se llega a una etapa donde la sobreabundancia de población de enzimas vuelve imposible continuar con la hidrólisis como se puede observar en el Gráfico 7, luego de esto si se aplicara una mayor dosis los resultados en azúcares reductores se verían reducidos (Kolusheva y Marinova, 2007).

Gráfico 7. Relación entre azúcares obtenidos y calidad de hidrólisis



Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

4.3 Resultados de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*

Los mejores rendimientos fueron a los que se aplicó 40 y 45 mg de enzima α -amilasa a una dosis de 0.5 mg de *Saccharomyces cerevisiae* sin variar esta dosis en ninguna de las muestras.

4.4 Determinación de grado alcohólico

Para la determinación del grado alcohólico se utilizó la fórmula establecida por Oddone (2020) las muestras con mayor grado alcohólico fueron a las que se aplicó 40 mg y 45 mg respectivamente, siendo este el límite obtenido para aplicación de α -amilasa. Se evidencia al igual que con los azúcares reductores que la tendencia que tiene el etanol es a aumentar en los ensayos donde se aplicó una mayor cantidad de enzima. Así se comprueba que el aumento de dosis de enzima favorece la producción de etanol tal y como lo evidencia (Espitia, 2009).

Las mediciones de densidad se hicieron con la ayuda de un densímetro y se obtuvieron los siguientes resultados para la densidad y grado alcohólico tal como se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Densidades de las muestras y grado alcohólico obtenido

Almidón (g)	α amilasa (mg)	Densidad inicial (kg/m³)	Densidad final (kg/m³)	% alcohol
25	25	1047.780	1013.500	4.500
25	25	1047.990	1013.700	4.501
25	25	1047.500	1013.200	4.502
25	30	1057.100	1006.800	6.601
25	30	1056.800	1006.500	6.603
25	30	1056.730	1006.300	6.602
25	35	1114.450	1057.300	7.501
25	35	1114.140	1056.990	7.502
25	35	1114.370	1057.220	7.501
25	40	1115.950	1045.990	9.183
25	40	1116.020	1045.080	9.180
25	40	1115.050	1045.010	9.193
25	45	1160.000	1030.000	1.000
25	45	1159.600	1030.000	17.010
25	45	1160.900	1031.000	17.050

Elaborado por: El Autor

Los porcentajes de alcohol obtenidos podrían variar en las concentraciones de 40 mg y 45 mg si se altera la cantidad de almidón sometido a hidrólisis, así como el tipo de pulido del grano.

4.5 Rendimiento de la hidrólisis

En la Tabla 7 se presenta el porcentaje de rendimiento que tuvo el proceso de hidrólisis enzimática según los azúcares reductores obtenidos en el procedimiento experimental.

Tabla 7. Rendimiento de la hidrólisis

Muestra	Azúcares reductores (g/L)	% de rendimiento
1	59.000	33.187
2	59.080	33.232
3	59.060	33.221
4	85.500	48.093
5	85.520	48.105
6	85.500	48.093
7	95.500	53.718
8	95.560	53.752
9	95.500	53.718
10	108.250	60.890
11	108.260	60.896
12	108.225	60.870
13	162.500	91.406
14	162.500	91.406
15	161.690	90.950

Elaborado por: El Autor

Un parámetro de importancia a evaluar fue el rendimiento que tuvo el proceso de hidrólisis, tal y como se aprecia en la Tabla 7, los mejores rendimientos fueron los de las muestras 13, 14, 15, donde se aplicó 45 mg de enzima α -amilasa. De estas tres muestras las de mejor rendimiento fueron la 13 y 14 las cuales reportaron un porcentaje de 91.406 %.

El segundo porcentaje a considerar son los de las muestras 11, 12, 13, los cuales dieron un resultado de 60.890 %, 60.896 %, 60.870 %, respectivamente, no se descartan estos valores debido a que como se aprecia en la Tabla 6 los rendimientos de estas concentraciones de enzima α -amilasa dan un valor mayor al 9 % lo cual indica que se asemeja a un tipo de alcohol de arroz japones llamado manahine (Ortuño, 2022).

Se evidenció también que el rendimiento de la hidrólisis mejora con el aumento de la dosis de enzima α -amilasa.

4.6 Análisis de varianza

Para el análisis de varianza y la demostración de hipótesis se utilizó el ANOVA en el programa Minitab 20; en las Tablas 8, 9, 10 y 11 se muestran los estadísticos obtenidos del análisis de varianza.

Tabla 8. Método de análisis estadístico

Hipótesis nula	<i>Todas las medias son iguales</i>
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha=0.05$

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Tabla 9. Información del factor

Factor	Nivel	Valores (mg)
<i>Factor</i>	5	25, 30, 35, 40, 45

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Tabla 10. Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajustado	MC Ajustado	Valor F	Valor p
<i>Factor</i>	4	277.749	69.4374	492696.4	0.000
<i>Error</i>	10	0.001	0.0001		
<i>Total</i>	14	277.751			

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Tabla 11. Resumen de modelo

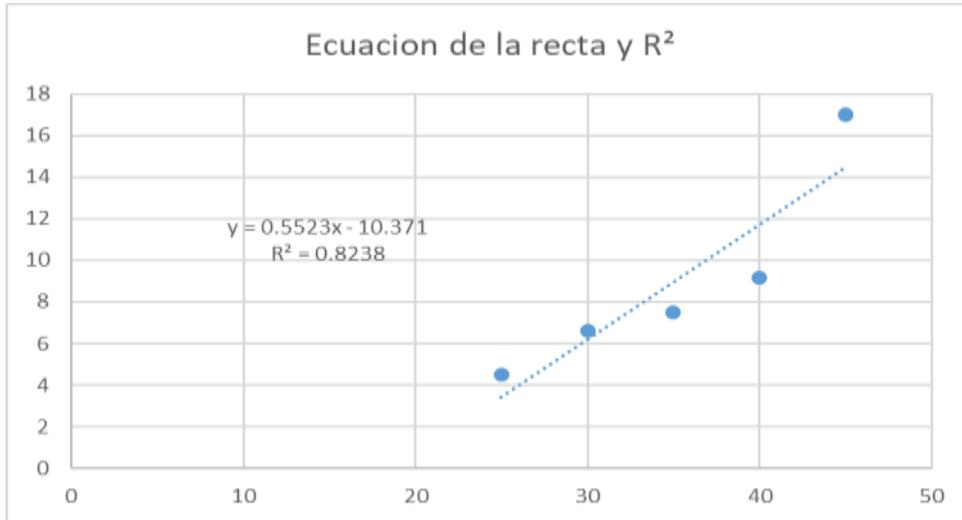
S	R²	R² (ajustado)	R² (pred)
0.011871	82.00 %	100 %	100 %

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

En el Gráfico 8 se evidencia la ecuación de crecimiento el cual indica que este ha sido lineal, teniendo como valor más alto la muestra donde se aplicó 45 mg de enzima. Así mismo el valor de R² coincide con el obtenido en Minitab que nos da un valor del 82 %.

Gráfico 8. Ecuación de crecimiento



Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Como se puede apreciar en el análisis de varianza en la Tabla 9 el valor p es menor al nivel de significancia de 0.05 representado en la Tabla 7, por lo cual se concluye que la hipótesis nula se rechaza por lo cual no todas las muestras son iguales, viendo en la Tabla 8 que los factores que alteran a las diferentes muestras de hidrólisis son las diferentes dosis de enzima, se muestra en la Tabla 6 que si bien hay resultados similares ninguna de las muestras generan resultados iguales a diferentes concentraciones de enzima.

4.7 Análisis t-student

A continuación, en las Tablas 12 y 13 se presentan datos estadísticos descriptivos para el análisis t-student.

Tabla 12. Estadísticas descriptivas

Muestra (mg)	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	Límite superior de 95% para μ
25	3	4.50100	0.00100	0.00058	4.50269
30	3	6.60200	0.00100	0.00058	6.60369
35	3	7.50133	0.00058	0.00033	7.50231
40	3	9.18133	0.00153	0.00088	9.18391
45	3	17.02000	0.02650	0.01530	17.06460

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Tabla 13. Valores para T y P

Muestra (mg)	Valor T	Valor p
25	-6060,45	0
30	-2421,41	0
35	-1496	0
40	1339,51	1
45	590,5	1

Nota: Valores para hipótesis nula $H_0 \mu=8$ e hipótesis alterna $\mu < 8$

Fuente: Minitab

Elaborado por: El Autor

Como se puede apreciar en el análisis por t- student en la Tabla 12, el valor P sólo supera el nivel de significancia de 0.05 en dos de las muestras, las que corresponden a 40 y 45 mg de α -amilasa, respectivamente; este resultado concuerda con el análisis ANOVA el cual establece que no todas las muestras son iguales. El grado alcohólico para que una bebida fermentada a partir del arroz sea apta parte del 13 % al 17 % lo que haría que solo la muestra a la cual se aplicó 45 mg de α -amilasa sea aceptada. Esto se da debido a que, entre los alcoholes de arroz japones se acepta bebidas a partir de esta graduación alcohólica (Shinbashi y Ku, 2011).

Por otro lado, se tiene que para alcoholes de arroz diluidos, se aceptan grados alcohólicos desde el 8 %, similar al Manahime, que es un alcohol de arroz japones (Ortuño, 2022).

Las muestras que superaron este porcentaje cumplieron con la hipótesis alternativa del trabajo al establecer una concentración de enzima α -amilasa que mediante hidrólisis generó azúcares reductores capaces de ser fermentados; la dosis ideal de enzima α -amilasa corresponde a la de 45 mg aplicada a 25 g de almidón de arroz.

4.8 Costo Beneficio

En la Tabla 14 se presentan los valores del cálculo para el costo beneficio.

Tabla 14. Costo beneficio

Materiales	unidad	costo	Cantidad	Costo total
α -amilasa	kg	100	0.000045	0.0045
almidón arroz	g	0.002	250	0.62
botellas vidrio	L	1.09	1	1.09
Valor total				1.714
valor de venta (1 L)				3.00

Elaborado por: El Autor

El costo beneficio en la obtención de alcohol como se aprecia en la Tabla 14 fue de USD 1.714, lo que significa que por cada dólar invertido existe USD 0.74 de utilidad.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Una vez realizada la fermentación del mosto obtenido mediante hidrólisis de almidón de arroz, se estableció que los mejores tratamientos fueron aquellos a los que se aplicó 45 g de enzima α -amilasa a 25 g de almidón de arroz y 50 mL de agua para la hidrólisis.

Al evaluar las diferentes concentraciones de enzima se evidenció que a partir de 40 g se obtiene alcohol de tipo diluido y con 45 g un alcohol de 17 %, cabe recalcar que dentro de los alcoholes obtenidos del arroz existe un amplio género de tipos de alcohol donde se diferencia su tiempo de fermentación, tipo de fermentación ya que en este caso no se usó la fermentación por estado sólido si no una hidrólisis para luego ser fermentada; también el tipo de alcohol depende de la pureza del almidón obtenido según el porcentaje de molienda.

La cuantificación de azúcares reductores demostró que un nivel mayor de enzima produce mayor cantidad de azúcares reductores, pero al superar la dosis de α -amilasa de 45 g se llega a una fase de meseta donde la cantidad de enzima es tan alta que no produce mayor cantidad de azúcares reductores, por lo cual es un desperdicio el uso de una dosificación mayor a esta.

La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* se dio de forma lenta con poca generación de biomasa durante todo el proceso. La cantidad de 0.05 mg fue ideal en un proceso que demoró dos semanas.

Las determinaciones de grado alcohólico para las muestras de 40 mg y 45 mg de α -amilasa dieron positivo para alcohol diluido y para alcohol al 17 %; se concluye que la dosis ideal para 25 g de almidón es de 45 mg de α -amilasa. Este dato se ve sustentado con el rendimiento de la hidrólisis

donde se evidencia que los mayores rendimientos hidrolíticos fueron obtenidos en las muestras a las que se aplicó 40 y 45 mg de enzima α -amilasa.

El crecimiento entre cada una de las muestras según los resultados de la ecuación es de tipo lineal y coincide con el resultado de R^2 equivalente al 82 % dando a entender que mientras más enzima se aplique mayor será el grado alcohólico obtenido.

El costo beneficio fue de 1.74, que significa rentabilidad para este tipo de proyecto, ya que por cada dólar invertido se obtendrán USD 0.74 por litro de producto.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda un estudio posterior aplicando diferentes dosis de enzima α -glucosidasa la cual también es producida por el hongo *Aspergillus oryzae* que no se usó en las muestras por la ausencia de ésta en el mercado local. Dentro de este estudio se recomienda revisar bibliografía para establecer las condiciones de tiempo, temperatura, pH que requiere esta enzima para sacarificar las maltodextrinas obtenidas por la enzima α -amilasa.

Se recomienda realizar un estudio detallado de la variación de pH durante el proceso de hidrólisis a fin de verificar si es necesario utilizar HCl para detener la actividad enzimática y buffer de acetato para elevar luego el pH, de esta forma evitar el uso de químicos a la hora de elaborar un producto para consumo humano, pudiendo detener la actividad enzimática llevando a temperaturas menores a 0 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, J., y Castro, J. (2011). *Elaboración de edulcorantes a partir de almidones aplicando enzimas alfa y beta amilasas de origen vegetal*. 81.
- Beltrán, Z., y Maldonado, K. (2002). *Caracterización microbiológica de cebada malteada y arroz y determinación de actividad enzimática amilolítica microbiana en el proceso de elaboración de mosto cervecero* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá]. <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/61781>
- Bertoneri, A. (2021). *Obtención y caracterización de una glucósido hidrolasa bacteriana que despolimeriza pululano* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Luján]. <http://ri.unlu.edu.ar/xmlui/handle/rediunlu/1301>
- Cáceres-Farfán, M., Lappe, P., Larqué-Saavedra, A., Magdub-Méndez, A., y Barahona-Pérez, L. (2008). Ethanol production from henequen (Agave fourcroydes Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*, 99(18), 9036-9039. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.063>

Cadena, D., Helfgott, S., Drouet, A., Cadena, L., y Montecé, F. (2022). *Sustentabilidad de los sistemas de producción de arroz situados dentro del sistema de riego y drenaje Babahoyo, Ecuador* [Tesis de Grado, Universidad Estatal de la Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/7333>

Caiza, M. (2022). *La chicha de yuca como Manifestación Cultural, en la comunidad de Panduyaku, Cantón Gonzalo Pizarro, Provincia de Sucumbíos* [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/34493>

Camposano, Y., y Alejandro, J. (2021). *Efecto del pH, temperatura y celulasa en la obtención de glucosa por hidrólisis enzimática de residuos sólidos orgánicos pre tratados* [Tesis de Grado, Universidad Nacional del centro del Perú]. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/6863>

Chen, M., Xia, L., y Xue, P. (2007). Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(2), 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.011>

Cobos, D., Germano, L., Malovini, E., y Paladino, S. (2017). ¿Es posible determinar azúcares reductores en vinos por el método Fehling Causse Bonnans, sin utilizar acetato neutro de plomo? *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*.

David, K. (2021). *Hidrólisis química de residuos agrícolas para obtención de azúcares reductores: Revisión bibliográfica de procesos* [Tesis de Grado, Universidad de Zaragoza].
<https://zaguan.unizar.es/record/110068/files/TAZ-TFG-2021-4916.pdf?version=1>

Ebrahimi, F., Khanahmadi, M., Roodpeyma, S., y Taherzadeh, M. (2008). Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.007>

Espitia, L. (2009). *Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir almidón de cebada empleando sacchamycetes cerevisiae* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá].
<http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8209>

Falero, A., y Doncel, D. (2021). *Eurasia: Avances de investigación*.
<https://doi.org/10.14201/0AQ0304>

- Gil, V. (2013). *¿Qué es el sake y cómo se elabora?* Verema.
<https://www.verema.com/blog/licores-destilados/1145270-que-sake-como-elabora>
- Gómez, M., Arboleda, J., y Mosquera, O. (2021). Género *Aspergillus*: Fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 17(1), Art. 1. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5610>
- Gonzalez, I. (2002). *Inmovilización de bacterias proteolíticas y amilolítica provenientes de agua y compost del café para el postratamiento de aguas residuales del beneficio húmedo del café* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá].
<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/61583>
- González, J., y Molina, M. (2006). Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*). *Enero/Julio-2006*, 16(1), 27-37. [file:///C:/Users/HP/Downloads/642-Texto%20del%20art%C3%ADculo-998-1-10-20120803%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/642-Texto%20del%20art%C3%ADculo-998-1-10-20120803%20(1).pdf).
- Heberlein, U. (2004). Molecular Genetic Analysis of Ethanol Intoxication in *Drosophila melanogaster*. *Integrative and Comparative Biology*, 44(4), 269-274. <https://doi.org/10.1093/icb/44.4.269>

- Herrera, G., y Salazar, D. (2021). *Fermentación sólida en la industria alimentaria* [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/32591>
- Herrera, J., León, L., Torres, Y., Cano, N., Herrera, A., y Cuenca, M. (2019). Evaluación y selección de levadura comercial para el proceso de fermentación alcohólica de hidromiel. *Publicaciones e Investigación*, 13(2), Art. 2. <https://doi.org/10.22490/25394088.3651>
- Holguin, J. (2019). *Obtención de un bioplástico a partir de almidón de papa* [Tesis de Grado, Fundación Universidad de América].
<https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7388>
- Huaracha, M. (2021). *Determinación de Aspergillus spp. Y aflatoxinas en alimentos destinados al consumo de bovinos (Bos taurus) y aflatoxina M1 en leche provenientes de la asociación Fongal Moquegua*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Moquegua].
<http://repositorio.unam.edu.pe/handle/UNAM/270>
- Humbert. (2015). cómo hacer sake en 11 pasos. Explicado por Humbert el toji de Kensho. *Kenshō*. <https://www.kenshosake.com/como-hacer-sake-11-pasos/>

Hungría, A., y Alvarado, R. (2018). *Propuesta para la Agregación de Valor Industrial a la Producción de Arroz del cantón Daule* [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/28594>

Izarra, C., y Peña, Y. (2022). *Efecto de la temperatura, PH y celulasa en la concentración de glucosa producida por hidrólisis con residuos de maíz morado* [Tesis de Grado, Universidad Nacional del centro del Perú].
<http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/8391>

Kolusheva, T., y Marinova, A. (2007). *A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -Amylase.*

Lifeder. (2022, agosto 24). *¿Qué son los azúcares reductores?* Lifeder.
<https://www.lifeder.com/azucare-reductores/>

López, L., Zumalacárregui, L., y Pérez, O. (2019). Análisis de componentes principales aplicado a la fermentación alcohólica. *Revista Científica de la UCSA*, 6(2), Art. 2.

López, S. (2022). *α -amilasa* [Tesis de Grado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16840>

Maknun, L. (2018). *Kimia Organik II: Disakarida dan pembentukannya*. *Kimia Organik II*. <https://luluul1809.blogspot.com/2018/03/disakarida-dan-pembentukannya.html>

Manrique, L. (2020). *Sustitución del aspergillus oryzae por las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa en la elaboración de SAKE*. [Tesis de Grado, Universidad de Pamplona]. <http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/4760>

Medina, J. (2022). *Calidad molinera de las principales variedades de arroz (Oryza sativa L.) que se comercializan en nuestro país*. [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/11315>

Mex-Álvarez, R., Guillen-Morales, M., Garma-Quen, P., Yanez-Nava, D., Vela-Cano, J., y Novelo-Pérez, M. (2022). Inhibición de la amilasa por *Coccoloba uvifera*. *International Journal of Biological and Natural Sciences*, 2(7), 2-7. <https://doi.org/10.22533/at.ed.813272220104>

Miranda, J., y Candia, E. (2022). *Obtención de maltodextrinas mediante hidrólisis con enzima alfa amilasa inmovilizada en alginato a partir del almidón de papa solanum tuberosum* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/20.500.12773/15069>

- Miranda, P. (2022). *Temperaturas de hidrólisis enzimática en variedades de camote para la obtención de alcohol etílico* [Tesis de Maestría, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/2015>
- Montoya, D. (2021). *Almidones de arroz nativos y modificados como materiales de encapsulamiento y liberación controlada de principios naturales de origen vegetal* [Tesis de Doctorado, Universidad de Tolima]. <http://repository.ut.edu.co/handle/001/3517>
- Mormeneo-Segarra, A. (2019). *Diseño de la etapa de reacción para la producción de acetaldehído a partir de etanol: Acondicionamiento térmico del reactivo y reactor catalítico de lecho empaquetado* [Tesis de Grado, Universitat Jaume I]. <https://repositori.uji.es/xmlui/handle/10234/183570>
- Murillo, J. (2022). *Procesó industrial molinero del arroz (*Oryza sativa* L) y su comercialización*. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13277>
- Noches, A. (2019). *Modelo de evaluación de un cultivo de arroz para determinar su factibilidad* [Tesis de Grado, Fundación Universidad de América]. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7291>

NTC 5146. (2008). *NTC 5146 Determinación Contenido de Azúcar | PDF.*

<https://es.scribd.com/doc/129845167/Ntc-5146-Determinacion-Contenido-de-Azucar#>

Oates, C. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, 8(11), 375-382.

[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01090-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01090-X)

Oddone, S. (2020). *Matemática de la cerveza: 3.ra edición.* Editorial Autores de Argentina.

Ordóñez, L. (2022). *Desarrollo de una bebida alcohólica destilada tipo (vodka) a partir de dos variedades de tubérculos, Papa China (Colocasia Esculenta) y Oca (Oxalis Tuberosa)* [Tesis de Grado, Universidad del Azuay]. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/11671>

Ortuño, R. (2022). *Manahime. Sake | ComerJapones.com.*
<https://comerjapones.com/sake/manahime>

Páez, V. (2010). *Bebidas Fermentadas.* Revista ReCiTeIA.

Poma, A. (2021). *Caracterización enzimática de una α -amilasa producida por la bacteria termófila Paenibacillus barengoltzii A1_50L2 aislada del*

rumen bovino [Tesis de Grado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann]. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/4382>

Porras, K. (2022). *Análisis comparativo del destilado obtenido a partir de jaca (Artocarpus heterophyllus) utilizando dos diferentes endulzantes a diversas concentraciones de levadura (Saccharomyces cerevisiae)*. [Tesis de Grado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/17945>

Quispe, O. (2022). *Bacterias termófilas cultivables productoras de amilasas de la fuente termal el Tragadero, Baños del Inca. Cajamarca, 2021*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Cajamarca]. <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/5175>

Ramírez, F. (2022). *Biorreactor para fermentación anaerobia de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos para producción de lactato y etanol*. <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/handle/RepoFi/18090>

Reyna, L., Robles, R., Reyes, M., Mendoza, R., y Romero, J. (2004). *Hidrólisis enzimática del almidón*. [https://studylib.es/doc/4454008/hidrólisis-enzimática-del-almidón](https://studylib.es/doc/4454008/hidrolisis-enzimatica-del-almidon)

Robles, R. (2021). *Condiciones óptimas del proceso de fermentación alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (Agave Americana), empleando cepas de levadura Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Maestría,

Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16795>

Roldán, G. (2022). *Estudio técnico, económico y financiero para la producción y comercialización de licor base de arroz en la ciudad de Trujillo* [Tesis de Grado, Universidad Privada Antenor Orrego].
<https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/8749>

Shinbashi, N., y Ku, M. (2011). *A comprehensive guide to Japanese sake, Japan sake and Shoshu makers asociation.*

Shurtleff, W., y Aoyagi, A. (2012). *History of soy sauce (160 CE to 2012): Extensively annotated bibliography and sourcebook.* Soyinfo Center.
http://books.google.com/books?id=-M5t2nXIXi4C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Singh, R., Kim, S., Kumari, A., y Mehta, P. (2022). An Overview of Microbial α -amylase and Recent Biotechnological Developments. *Current Biotechnology*, 11(1), 11-26.
<https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044>

Trujillo, J. (2022). *Caracterización morfológica, color, propiedades funcional y térmica de dos variedades de pituca (Colocasia esculenta L. Schott) en Tingo María* [Tesis de Grado, Universidad Agraria de la Selva].
<http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/2119>

Valle, L. (2021). *Implementación de una técnica de producción más limpia en el proceso de elaboración de vino de frutas, a través de la sustitución de la tecnología de pasteurización tradicional*. [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/33283>

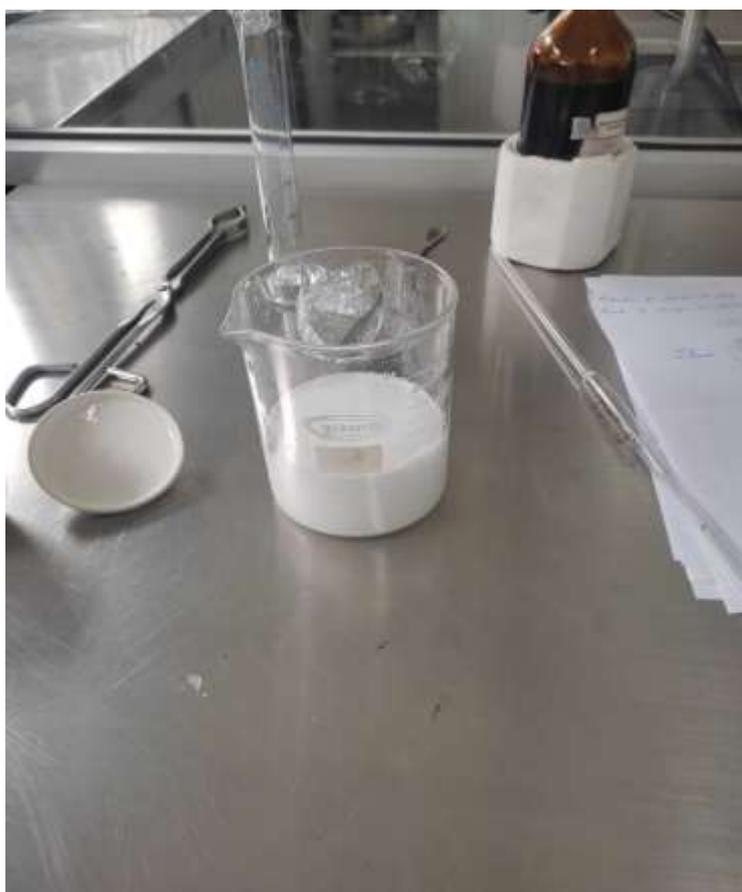
van der Maarel, M., van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H., y Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137-155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)

Verdezoto, M. (2022). *Microemprendimientos agrícolas existentes en Ecuador* [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Babahoyo].
<http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/11321>

Webb, G. (2001). *The Cambridge World History of Food*. Edited by K F Kiple and K C Ornelas. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2000 Two volume boxed set at £110. ISBN 0521402166. *British Journal of Nutrition*, 85(6), 761-762. <https://doi.org/10.1079/BJN2001354>

ANEXOS

Anexo 1. Adición de enzima en almidón



Elaborado por: El Autor

Anexo 2. Termo agitación e hidrólisis



Elaborado por: El Autor

Anexo 3. Resultado de hidrólisis



Elaborado por: El Autor

Anexo 4. Fermentación



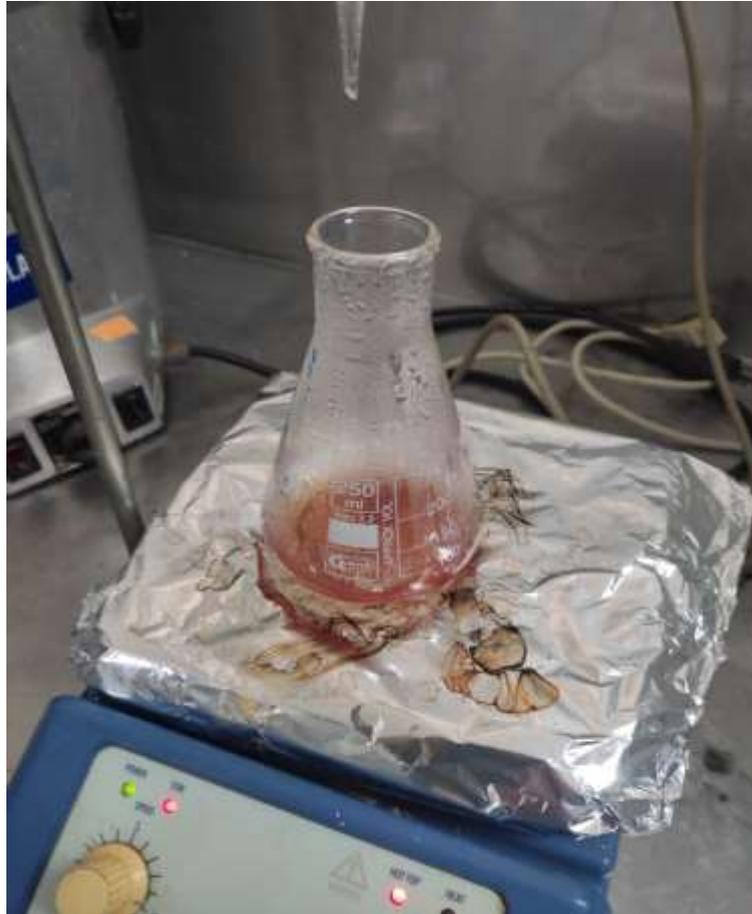
Elaborado por: El Autor

Anexo 5. Adición de licor de Fehling



Elaborado por: El Autor

Anexo 6. Determinación de azúcares reductores



Elaborado por: El Autor



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



SENESCYT

Secretaría Nacional de Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Vera Bowen, Eduardo Enrique**, con C.C: # **0930260641** autor/a del **Trabajo de Titulación: Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz (*Oryza sativa* L.)**, previo a la obtención del título de **Ingeniero Agroindustrial** en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las instituciones de educación superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Guayaquil, 15 de febrero del 2023

Nombre: **Vera Bowen, Eduardo Enrique**
C.C: **0930260641**

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA			
FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE TITULACIÓN			
TEMA Y SUBTEMA:	Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de azúcares derivados de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)		
AUTOR(ES)	Vera Bowen, Eduardo Enrique		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES)	Ing. Velásquez Rivera, Jorge Ruperto Ph. D.		
INSTITUCIÓN:	Universidad Católica de Santiago de Guayaquil		
FACULTAD:	Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo		
CARRERA:	Carrera de Ingeniería Agroindustrial		
TITULO OBTENIDO:	Ingeniero Agroindustrial		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	15 de febrero de 2023	No. DE PÁGINAS:	79
ÁREAS TEMÁTICAS:	Producción de alimentos, usos alternativos		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Bebida alcohólica, fermentación, hidrólisis		
RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras): En el presente trabajo se empleó diversas concentraciones de la enzima α -amilasa aplicadas al almidón de arroz (<i>Oryza sativa</i>) con la finalidad de determinar la concentración de esta enzima que sea capaz de generar una cantidad de azúcares reductores que al fermentarlos con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pueda lograr obtener una bebida alcohólica. Este experimento fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo, de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Se diseñaron 5 formulaciones y una en negativo, de las cuales se realizó la experimentación por triplicado. Las concentraciones de enzima α -amilasa fueron de 25, 30, 35, 40 y 45 mg, aplicadas a 25 g de almidón de arroz, posteriormente, se sometieron las muestras a hidrólisis durante 2 horas a una temperatura de 90 °C y agitación, una vez concluida la termo agitación se procedió a inactivar la enzima con la aplicación de HCL al 2 N para bajar el pH, luego elevarlo con buffer de acetato de sodio, procediendo a llevarlo a una temperatura de -20 °C. Para la determinación de azúcares se utilizó la prueba de Fehling donde se determinó que la muestra inoculada con 45 mg de enzima α -amilasa obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores. Las muestras se procedieron a fermentar con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , se obtuvo como resultado que las muestras aplicadas con 40 y 45 mg obtuvieron un porcentaje de alcohol mayor al 8 %. El beneficio costo de la producción por litro de bebida alcohólica fue de USD 0.74			
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: +59375063012	E-mail: eduardo.vera01@cu.ucsg.edu.ec	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN (COORDINADOR DEL PROCESO UTE)::	Nombre: Noelia Caicedo Coello, M.Sc.		
	Teléfono: +593-4-87361675		
	E-mail: noelia.caicedo@cu.ucsg.edu.ec		
SECCIÓN PARA USO DE BIBLIOTECA			
Nº. DE REGISTRO (en base a datos):			
Nº. DE CLASIFICACIÓN:			
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):			