



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUÍZ GALLO”



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

XVII PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ACTUALIZACIÓN PROFESIONAL

TESINA PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA POR HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DEL *Aspergillus oryzae* (CEPA NATIVA) CON ACCIÓN
SIMULTÁNEA DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) SOBRE ARROZ
COCIDO AL VAPOR

AUTORES: Bach. Mario Miguel Samamé Saavedra
 Bach. Ana Karen Natalí Vásquez Quiroz

ASESOR: Ing. Gerardo Santamaría Baldera

LAMBAYEQUE, 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUÍZ GALLO"



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

XVII PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ACTUALIZACIÓN PROFESIONAL

TESINA PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL
Aspergillus oryzae (CEPA NATIVA) CON ACCIÓN SIMULTÁNEA DE *Saccharomyces*
cerevisiae (ATCC 9763) SOBRE ARROZ COCIDO AL VAPOR

PRESENTADO POR:

Bach. Mario Miguel Samamé Saavedra

AUTOR

Bach. Ana Karen Natalí Vasquez Quiroz

AUTORA

Ing. Gerardo Santamaria Baldera

ASESOR

APROBADO POR:

Ing. Ronald Gutiérrez Moreno

PRESIDENTE

Ing. James Jenner Guerrero Braco

SECRETARIO

Ing. Luis Antonio Pozo Suclupe

VOCAL

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por la vida y bendiciones que nos da cada día; agradecemos a nuestros padres que con su amor y apoyo nos han formado e inculcado los valores de disciplina y respeto y que con constante sacrificio nos forjaron el camino para seguir adelante; a nuestros hermanos, en especial a Nancy Gabriela Vásquez Quiroz y Jean Pierre Jamill Samamé Saavedra por darnos una gran lección de vida que nunca olvidaremos; a nuestros primos, tíos, abuelos, demás familiares y amigos por su apoyo incondicional a lo largo de nuestra carrera y un agradecimiento especial a los docentes que estuvieron involucrados en el desarrollo del presente proyecto: Microbiólogo Julio Silva Estela, un profesional que sin duda alguna nos impartió sus conocimientos y nos brindó el apoyo necesario para la realización de este proyecto; asimismo agradecemos al Ing. David Uriol Valverde por el tiempo, espacio y conocimientos brindados durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Ana Karen Natalí Vásquez Quiroz y Mario Miguel Samamé Saavedra

DEDICATORIA

La presente tesina, al igual que toda mi carrera universitaria la dedico en primer lugar a Dios por ser quien me sostiene en todo momento; a mis padres Luis Alberto Vásquez Gutiérrez y Nancy Esther Quiroz Becerra por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera y una especial dedicatoria a mi hermana Nancy Gabriela Vásquez Quiroz por haber sido una maravillosa persona y ejemplo a seguir.

Ana Karen Natalí Vásquez Quiroz

Le dedico el presente trabajo a mi maestro Jean Pierre Jamill Samamé Saavedra, a quien le debo todos mis conocimientos y me supo guiar con sabiduría y paciencia durante todo el tiempo que estuvo con nosotros; además de compartir muchas horas de charlas juntos, como hermanos y grandes amigos. Gracias por tu apoyo y por tu tiempo, esto es solo una pequeña muestra de todo lo que aprendí de ti y te prometo que enfocaré todas mis fuerzas a mantener y continuar con tu legado.

Mario Miguel Samamé Saavedra

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del Problema.....	4
1.2. Justificación e Importancia del Estudio.....	4
1.3. Formulación del Problema.....	4
1.4. Antecedentes.....	5
1.5. Objetivos.....	6
1.5.1. Objetivo General.....	6
1.5.2. Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	7
2.1. Microorganismos como Catalizadores.....	7
2.1.1. <i>Aspergillus oryzae</i>	10
2.1.2. Bioquímica del Proceso de Hidrólisis del almidón de arroz.....	11
2.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.1.4. Bioquímica del proceso de Fermentación.....	13
2.1.5. Reacción bioquímica de Fermentación.....	14
2.2. Enzimas Microbianas.....	15
2.2.1. Estructura y Actividad Catalítica.....	16
2.3. Almidón.....	17
2.3.1. Amilosa.....	19
2.3.2. Amilopectina.....	21
2.3.3. Materia Prima: “Arroz”.....	21
2.4. Bebidas Alcohólicas.....	22
CAPÍTULO III.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Materiales.....	24
3.2. Métodos.....	26
3.2.1. Métodos Microbiológicos. (Según AOAC).....	26
OBTENCIÓN DE UNA CEPA CON ACTIVIDAD HIDROLÍTICA.....	27
a. Toma de Muestra y Aislamiento de mohos.....	27
b. Método de Siembra.....	27
c. Método de Identificación de hongos aislados sobre medio de cultivo y Caracterización de las colonias.....	28

3.2.2. Métodos Físicos.....	29
OBTENCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS	
SENSORIALES Y PARÁMETROS FÍSICOS.....	29
a. Determinación de Características Organolépticas.	
(Método Sensorial según NTP INDECOPI 211.010).....	29
b. Determinación de Grado Alcohólico °GL.	
(Método por Alcoholimetría según NTP INDECOPI 211.005).....	29
c. Determinación de la Densidad.	
(Método por Picnometría según AOAC).....	30
3.2.3. Métodos Químicos.....	30
OBTENCIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS Y EVALUACIÓN DE	
PRODUCTO TERMINADO.....	30
a. Determinación de Azúcares Reductores y Azúcares Totales.	
(Método de Fehling).....	30
b. Determinación de Acidez Total.	
(Método por Titulación según NTP INDECOPI 211.002).....	31
c. Determinación de Acidez Volátil.	
(Método por Destilación-Titulación según NTP INDECOPI 210.017)..	32
d. Determinación de Metanol en Bebida Alcohólica.	
(Método por Espectrofotometría según NTP INDECOPI 210.002).....	32
e. Determinación de Ésteres	
(Método Analítico según NTP INDECOPI 211.003).....	32
f. Determinación de Aldehídos	
(Método según NTP INDECOPI 210.020).....	33
3.2.4. Metodología Experimental.....	33
3.2.4.1. Métodos Microbiológicos.....	33
A. AISLAMIENTO PRIMARIO EN LA MATERIA PRIMA.....	33
B. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE GÉNERO Y ESPECIE	
DE LA COLONIA (CEPA).....	36
C. AISLAMIENTO SECUNDARIO DE COLONIAS DE <i>Aspergillus oryzae</i>	40
3.2.4.2. Metodología del Proceso.....	44
METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA	
ALCOHÓLICA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL	
<i>Aspergillus oryzae</i> (CEPA NATIVA) CON ACCIÓN	
SIMULTÁNEA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	
SOBRE ARROZ COCIDO AL VAPOR.....	45
1. ACONDICIONAMIENTO DE MATERIA PRIMA.....	45
2. INOCULACIÓN DEL MOHO.....	48
3. HIDRÓLISIS (SACARIFICACIÓN).....	49
4. MEZCLADO.....	49

5. FERMENTACIÓN.....	50
6. FILTRACIÓN.....	50
7. DESTILACIÓN.....	52
8. EMBOTELLADO/ETIQUETADO.....	51
9. ALMACENAMIENTO.....	51
3.2.4.3. Métodos Físicos.....	52
A. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.	
Según NTP INDECOPI 211.013.....	52
B. DENSIDAD. Método por Picnometría según AOAC.....	52
C. GRADO ALCOHÓLICO EN °GL	
Según NTP INDECOPI 211.005.....	53
D. RENDIMIENTO DE BEBIDA ALCOHÓLICA.....	53
3.2.4.4. Métodos Químicos.....	53
A. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	
Y AZÚCARES TOTALES.....	53
B. ACIDEZ TOTAL.	
Según NTP INDECOPI 211.002.....	56
C. ACIDEZ VOLÁTIL.	
Según NTP INDECOPI 210.017.....	58
D. METANOL EN BEBIDA ALCOHÓLICA.	
Según NTP INDECOPI 210.002.....	60
E. ÉSTERES. Según NTP INDECOPI 210.020.....	65
F. ALDEHÍDOS. Según NTP INDECOPI 210.020.....	66
CAPÍTULO IV.....	68
RESULTADOS.....	68
CAPÍTULO V.....	74
DISCUSIONES.....	74
CAPÍTULO VI.....	76
CONCLUSIONES.....	76
RECOMENDACIONES.....	77
CAPÍTULO VII.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CAPÍTULO VIII.....	81
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de algunos almidones usados en la Industria Alimentaria.-20

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro N° 1: Características Organolépticas.....	53
Cuadro N° 2: Curva de Calibración.....	62
Cuadro N° 3: Absorbancia de Metanol para Curva Estándar – Absorbancia del Blanco..	63
Cuadro N° 4: Absorbancia de la Muestra – Absorbancia del Blanco.....	64
Cuadro N° 5: Siembra Primaria (26 días a 35-37 °C en estufa).....	68
Cuadro N° 6: Características Macroscópicas y Microscópicas de la colonia.....	68
Cuadro N° 7: Resultados de Cámara cuenta colonias en arroz cocido al vapor.....	68
Cuadro N° 8: Resultados de pH y °Brix de la hidrólisis enzimática del arroz.....	69
Cuadro N° 9: Resultados de análisis de Azúcares Reductores y Azúcares Totales por el método Fehling.....	70
Cuadro N° 10: Resultados de Análisis Sensoriales.....	70
Cuadro N° 11: Resultados de Sólidos Solubles y pH en Fermentación Alcohólica.....	71
Cuadro N° 12: Resultados de la Destilación.....	72
Cuadro N° 13: Resumen de resultados Físicoquímicos del Producto Terminado.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Partes del moho <i>Aspergillus oryzae</i>	10
Figura 2: Morfología de la especie <i>Aspergillus oryzae</i>	11
Figura 3: Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG.....	13
Figura 4: Ruta catabólica del Piruvato obtenido mediante Glicólisis.....	15
Figura 5: Conversión del Piruvato en Etanol y Dióxido de Carbono.....	15
Figura 6: Diagrama de flujo de las principales operaciones para la producción de Glucosa y Fructosa.....	17
Figura 7: (a) Enrollamiento helicoidal de la Amilosa, (b) Estructura química de la Amilopectina.....	20
Figura 8: Siembra de muestra de arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario por toques/0 horas).....	36
Figura 9: Arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/72 horas).....	36
Figura 10: Arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/12 días).....	37
Figura 11: Micelio Vegetativo de las colonias sobre arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/26 días).....	37
Figura 12: Vista microscópica con aumento 10X que muestra una hifa reproductiva.....	38
Figura 13: Vista microscópica con aumento 40X que muestra una hifa reproductiva con su respectivo esporangio.....	39

Figura 14: Vista microscópica con aumento 40X que muestra una hifa reproductiva con ausencia de septos.....	39
Figura 15: Vista microscópica con aumento 4X que muestra hifas entrelazadas con ausencia de septos.....	39
Figura 16: Vista microscópica con aumento 40X que muestra hifas entrelazadas con presencia de núcleo.....	40
Figura 17: Clasificación Científica.....	40
Figura 18: Placa con presencia de micelio aéreo (esporas de moho <i>Aspergillus oryzae</i>).....	41
Figura 19: Micelio aéreo de colonias en Agar Sabouraud (aislamiento de la cepa identificada).....	42
Figura 20: Siembra secundaria (repique) de la colonia en Agar Sabouraud (aislamiento de la cepa identificada).....	42
Figura 21: Siembra secundaria por toques en Agar Sabouraud para aislamiento de la cepa.....	43
Figura 22: Micelio vegetativo de colonia aislada.....	43
Figura 23: Comparación de placas: superior (arroz cocido, micelio aéreo); Inferior (micelio vegetativo de colonias aisladas).....	44
Figura 24: Micelio aéreo de colonias aisladas.....	44
Figuras 25 y 26: Recuento de colonias en placas en Cámara cuenta colonias.....	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N° 1: Curva de Calibración (Absorbancia Vs. Concentración de Metanol)....	63
Gráfica N° 2: Curva de Calibración restando Absorbancia del Blanco.....	64
Gráfica N° 3: Variación de pH durante la Fermentación Alcohólica.....	71
Gráfica N° 4: Variación de % Sólidos Solubles durante Fermentación Alcohólica....	72

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1: SIEMBRA PRIMARIA DE MATERIA PRIMA EN AGAR SABOURAUD..	35
DIAGRAMA 2: OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL <i>Aspergillus oryzae</i> (CEPA NATIVA) CON ACCIÓN SIMULTÁNEA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763) SOBRE ARROZ COCIDO AL VAPOR.....	45

RESUMEN

Se realizó el presente trabajo de investigación, con el objetivo de obtener una bebida alcohólica por hidrólisis enzimática en arroz cocido al vapor inoculando *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

Se procesaron como muestra 2000 g de arroz marca "Casserita". Para el aislamiento de la cepa se tomaron 5 granos de arroz cocido al vapor; la identificación del moho *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) se realizó mediante la técnica del Bioensayo (prueba confirmativa) y técnica del cubre – objetos con KOH para su observación en el microscopio y para la ubicación taxonómica; empleando las claves de identificación para mohos.

Para la hidrólisis se empleó el método Fehling, que determinó el porcentaje de azúcares reductores y azúcares totales. En la fermentación se obtuvo 5 L de mosto filtrado con 16 °G.L. determinado por método físico; después del proceso de destilación se obtuvieron 850 ml de bebida alcohólica destilada con 55 °G.L. determinado por método físico (método por alcoholimetría) y métodos químicos (Acidez Total, Acidez Volátil, Metanol en bebida alcohólica, Ésteres y Aldehídos).

Se determinó la presencia mínima de metanol en la bebida alcohólica destilada presentando un resultado de 1.0533 mg metanol/100 ml alcohol anhidro. El género y la especie identificada fue *Aspergillus oryzae*.

Concluimos en el presente trabajo experimental que la hidrólisis y la fermentación son los procesos biotecnológicos más importantes que permitieron la obtención de una bebida alcohólica destilada por hidrólisis enzimática de arroz cocido al vapor inoculando *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), además que ésta cumplió con la mayoría de parámetros y estándares establecidos por las Normas Técnicas de INDECOPI para bebidas alcohólicas destiladas.

Palabras claves: moho, hidrólisis, fermentación, destilación

Área de Investigación: Biotecnología de los Alimentos

SUMMARY

He was this work of research, with the aim of obtaining an alcoholic beverage by enzymatic hydrolysis in rice steamed by inoculating *Aspergillus oryzae* (native strain) with simultaneous action of *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

They were processed as sample 2000 g of rice marked "Casserita". For the isolation of the strain were taken 5 grains of rice steamed; the identification of rust *Aspergillus oryzae* (native strain) was performed by the bioassay technique (confirmatory test) and technique of the cover - objects with KOH for observation under the microscope and for taxonomic placement; using the mould identification keys.

Fehling method, which determined the percentage of reducing sugars and total sugars was used for hydrolysis. In the fermentation was obtained 5 L juice filtered with 16 ° G.L. determined by physical method; 850 ml of alcoholic beverage distilled with 55 ° G.L. determined by physical method (alcoholimetric method) were obtained after distillation and chemical methods (Total acidity, volatile acidity, methanol) in alcohol, esters and aldehydes.

Determined the minimum presence of methanol in the distilled alcoholic beverage by presenting a result of methanol 1.0533 mg / 100 ml anhydrous alcohol. The genus and species identified was *Aspergillus oryzae*.

Conclude in this experimental work that hydrolysis and fermentation are the most important biotechnological processes that allowed the obtaining of an alcoholic beverage distilled by enzymatic hydrolysis of steamed rice inoculating *Aspergillus oryzae* (native strain) with simultaneous action of *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), in addition that this met the majority of parameters and standards set by the technical standards of INDECOPI for distilled alcoholic beverages.

Key words: hydrolysis, fermentation, distillation and rust

Research area: food biotechnology

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El etanol es obtenido por fermentación de diversos sustratos, principalmente de la industria agro-azucarera, aunque es posible obtenerlo de otras fuentes ricas en almidón o celulosa. Los principales responsables de la fermentación de estos sustratos son las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, aunque existen estudios que demuestran producción de alcohol empleando bacterias como *Zymomonas mobilis*. **(Vásquez y Dacosta, 2007).**

Análisis de Bebidas Alcohólicas (2015). Las bebidas alcohólicas, son bebidas que contienen etanol (alcohol etílico). La dependencia de las bebidas alcohólicas se denomina alcoholismo. Atendiendo a la elaboración se pueden distinguir entre bebidas producidas por fermentación alcohólica (vino, cerveza, hidromiel, sake), donde el contenido alcohólico no supera los 18 - 20 °GL, y las producidas por destilación, generalmente a partir de un producto de fermentación (whisky, vodka, ron, etc.), estas son aptas para el consumo humano que provienen de la mezcla de fermentación, destilación de materia prima vegetal. **(Sección de Introducción, párr. 1 – 3).**

El presente trabajo de investigación busca aplicar un tratamiento biotecnológico con la finalidad de obtener una bebida alcohólica de igual o mejor calidad que las bebidas comerciales. Para lograr la posibilidad de que esta bebida sea obtenida, esta investigación tiene que ser de naturaleza experimental, además de conocer el nivel de toxicidad como resultado de la hidrólisis enzimática de la materia prima.

Con este trabajo experimental se pretende aportar nuevos conocimientos sobre hongos filamentosos, que sirvan de referencia para otros trabajos y facilitar investigaciones futuras en el campo de la microbiología de los alimentos y en el desarrollo de trabajos de investigación de biotecnología desarrollado por los alumnos.

1.1 Planteamiento del Problema

En la elaboración de sake, una parte de arroz se destina a la elaboración de koji, malta de arroz de donde se extrae la enzima necesaria para la obtención de azúcar. El arroz inicial, el koji transforma el almidón de arroz en azúcar y la levadura fermenta el azúcar en alcohol. **(García, 2010)**

Las enzimas industriales son de origen animal, vegetal y microbiano, pero las más abundantes son las últimas. Los microorganismos que se emplean para este fin, presentan muchas ventajas, ya que incluso se les puede alterar genéticamente para convertirlos en sobreproductores de una determinada enzima. **(Badui, 2006)**

1.2. Justificación e Importancia del Estudio

En la actualidad las bebidas alcohólicas se encuentran entre los productos de mayor demanda a nivel mundial, consiguiendo de esta manera una gran influencia a nivel económico, social y sanitario, generando beneficios a las empresas nacionales y extranjeras de licores, pero trayendo incalculables consecuencias para la sociedad en general, por su uso desmedido. **(Los Autores, 2015).**

El empleo de las enzimas de algunos mohos tiene muchas ventajas, como ser específicas en su manera de actuar por lo que no producen reacciones secundarias indeseables, funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de pH, actúan en bajas concentraciones, su velocidad es controlada al ajustar el pH, la temperatura y el concentrado, se inactivan fácilmente una vez alcanzado el grado de transformación deseado. Otra ventaja que ofrece la obtención de enzimas por fermentación es que muchos microorganismos las producen extracelularmente, es decir la segregan de la célula, lo que hace que su recuperación sea sencilla. **(Badui, 2006).**

1.3. Formulación del Problema

¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos para obtener una bebida alcohólica por hidrólisis enzimática del *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) sobre arroz cocido al vapor?

1.4. Antecedentes

Para la elaboración del sake se precisan dos elementos básicos: Arroz y agua. El arroz, de tipo sakamai, no es el mismo que el utilizado para cocinar, se trata de un cereal más blanco y opaco, y con almidón menos denso en el centro del grano. La calidad del agua también resulta básica. En la antigüedad se utilizaba agua de los ríos o lagos, pero en la actualidad se ha optado por agua subterránea bien filtrada. Por ello, las regiones japonesas con mejor arroz y mejor agua, situadas al norte del país, son también las que producen mejor sake. Su complejo proceso de elaboración se empieza por extraer la cáscara del arroz y raspar el grano hasta llegar al centro. A continuación, el arroz se lava con agua, se mantiene un tiempo en remojo, se cuece al vapor y se deja enfriar. Una parte de este arroz se destina a la elaboración de Koji, malta de arroz de donde se extrae la enzima necesaria para la obtención de azúcar. El arroz inicial, el "Koji" transforma el almidón del arroz en azúcar (etapa de hidrólisis o sacarificación) y la levadura fermenta el azúcar en alcohol. La sustancia obtenida se filtra, se deja reposar para eliminar los pozos y se calienta a 60°C para eliminar las bacterias. **(García, 2010)**

La degradación del almidón es por parte del *Aspergillus oryzae*, ya que ninguna de las otras levaduras puede degradarlo. Este proceso, también llamado sacarificación, es llevado a cabo por dos enzimas: la α -amilasa, la enzima liquefactora, y la glucoamilasa. Estas se hallan entre las amilósacaridasas más estudiadas dadas su alta actividad y sus muchas aplicaciones industriales. También se emplean con frecuencia preparados de enzimas microbianos como amilasas bacterianas y amilasas fúngicas. Las amilasas bacterianas se obtienen principalmente del *Bacillus subtilis*. Otros microorganismos productores de amilasas como el *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* y el *Streptomyces diastaticus*, difieren del *Bacillus subtilis* en lo que se refiere a estabilidad térmica. La α -amilasa bacteriana se caracteriza por sus propiedades fluidificantes debido a que produce dextrinas especiales de 6 a 10 unidades de glucosa. Por el contrario, la α -amilasa fúngica produce esencialmente maltosa y glucosa. La amilasa fúngica se obtiene de *Aspergillus oryzae* y de *Aspergillus niger*, cultivados a 33°C sobre macerado de trigo. A las 48-72 horas de cultivo se obtiene malta fúngica. La malta fúngica da un rendimiento mayor que la malta de cebada. En el caso del Sake, consiste en una serie de pasos bien diferenciados, tanto por las condiciones en las que cada uno se lleva a cabo, como por los microorganismos que participan en cada una de ellas. En la elaboración del Sake, se usa como microorganismo iniciador que participa en la hidrólisis del arroz al *Aspergillus oryzae*. **(García, 2010).**

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

- ✓ Obtener una bebida alcohólica por hidrólisis enzimática en arroz cocido al vapor inoculando *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

1.5.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar y aislar la cepa que producirá la hidrólisis en el arroz cocido al vapor.
- ✓ Determinar el rendimiento alcohólico por hidrólisis enzimática inoculando *Aspergillus oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) sobre arroz cocido al vapor.
- ✓ Determinar los parámetros adecuados para la cocción al vapor del arroz, que facilitará la hidrólisis y de esta manera genere el grado de alcohol deseado.
- ✓ Determinar los parámetros fisicoquímicos del producto obtenido a través de los procesos de hidrólisis y fermentación.
- ✓ Establecer el proceso biotecnológico para la obtención de una bebida alcohólica teniendo al arroz como materia prima.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Microorganismos como Catalizadores

La actividad de los microorganismos se manifiesta como su capacidad para convertir sustratos en productos de alto valor agregado. Los procesos más conocidos en la industria alimentaria son la hidrólisis y la fermentación.

Durante estos procesos una pequeña cantidad de microorganismos crece y se multiplica tomando nutrientes del medio en donde se encuentran. Los microorganismos al desarrollarse forman una serie de sustancias como resultado de su metabolismo. La formación de estas sustancias, así como la transformación de los nutrientes, se lleva a cabo a través de una compleja red de reacciones bioquímicas, catalizadas todas ellas por enzimas. Por lo anterior, se pueden considerar las células como biocatalizadores. **(Betancourt, 2003).**

A. Factores que influyen en el Crecimiento Microbiano

Las funciones de los microorganismos se ven modificadas por las sustancias químicas y condiciones físicas de su medio ambiente tales como: temperatura, actividad del agua, pH, presión hidrostática, entre otras.

- (a) **Temperatura:** La temperatura es uno de los factores más importantes a tener en cuenta, ya que influye en la proliferación y vida de los microorganismos afectándose en cualquiera de los sentidos. Cuando se aumenta la temperatura, las reacciones enzimáticas y químicas se aceleran, aumentando su crecimiento, pero las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares se inactivan o se destruyen irreversiblemente por su sensibilidad. Esto por esto, que los microorganismos presentan temperaturas mínimas por debajo de la cual no hay proliferación, y temperaturas óptimas en las que el crecimiento es más rápido.
- (b) **Necesidades Hídricas:** Todos los microorganismos requieren agua para vivir. La cantidad de ella varía según el ambiente, pero su disponibilidad no depende solo de su contenido, sino que es una función compleja de factores de adsorción y solución.
- (c) **Actividad del Agua:** La actividad del agua se relaciona con la presión de vapor de agua en el aire sobre una solución o sustancia. Cuando un microorganismo se encuentra en un medio con baja actividad de agua, este debe realizar un trabajo para poder obtener agua de dicho medio; este gasto energético hace que se reduzca la velocidad de crecimiento del microorganismo.

- (d) **pH:** El pH es un factor esencial para el crecimiento de los microorganismos, es por eso que se determina el pH mínimo, óptimo y máximo. La mayoría de las especies. La mayoría de las especies crecen a valores casi neutros, pero algunos se ven muy favorecidas por una reacción acida, aunque muy pocas especies pueden crecer a valores de pH menores de 2 o mayores de 10.
- (e) **Potencial de Óxido Reducción:** En las diferentes reacciones biológicas de los microorganismos, hay que tener en cuenta el aprovechamiento del oxígeno del aire.
- (f) **Presión Osmótica:** En la membrana celular que es permeable y permite el paso de agua y algunas moléculas, el microorganismo establece un equilibrio con su medio, estableciéndose una presión osmótica (variable según el tipo de microorganismo).
- (g) **Oxígeno:** El oxígeno además de ser una sustancia vital para los organismos respiratorios, es también capaz de formar derivados tóxicos aun para los organismos que lo respiran y lo necesitan (el peróxido de hidrogeno es uno de ellos). Sin embargo los microorganismos han desarrollado enzimas que lo destruyen, tal es el caso de la catalasa y la peroxidasa.

El conocimiento de lo anterior ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en los alimentos y hace posible diseñar métodos para controlar las funciones microbianas o destruir organismos que puedan alterar un producto deseado. (Betancourt, 2003).

B. Generalidades de los hongos del género *Aspergillus*

Los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos tan grande que se calculan más de 300000 especies. Los hongos mejor conocidos por todos son los macroscópicos denominados también setas o champiñones, con tamaño, forma y color de lo más variado. Los hongos del género *Aspergillus* se dan en gran variedad de hábitats en tierra, en productos almacenados y en vegetación decaída. Son abundantes en la región tropical y subtropical ya que son hábiles para florecer en situaciones de baja y alta humedad y altas temperaturas.

Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por tanto no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse de materias orgánicas ya elaboradas.

Pueden descomponer organismos muertos o sus productos y obtener nutrientes de otros organismos vivos o huéspedes.

Las características de los hongos son:

- Todos son heterótrofos por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y de energía.
- Son eucariotas, es decir, presenta núcleo diferenciado con membrana bien organizada.
- Tienen una pared celular formada por quitina. Esta pared es rígida, por lo que no pueden fagocitar alimentos sino absorben nutrientes simples y solubles que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas.
- La estructura fúngica consta de un llamado talo o micelio, que a su vez está constituido por múltiples filamentos o hifas (hyphomycetes o mohos).

Estructuralmente el hongo *Aspergillus* consta de un conidióforo, una vesícula, métulas, fiálides y conidias. Las hifas son multinucleadas, el conidióforo se desarrolla de una hifa vertical, a partir de una célula horizontal llamada célula pie.

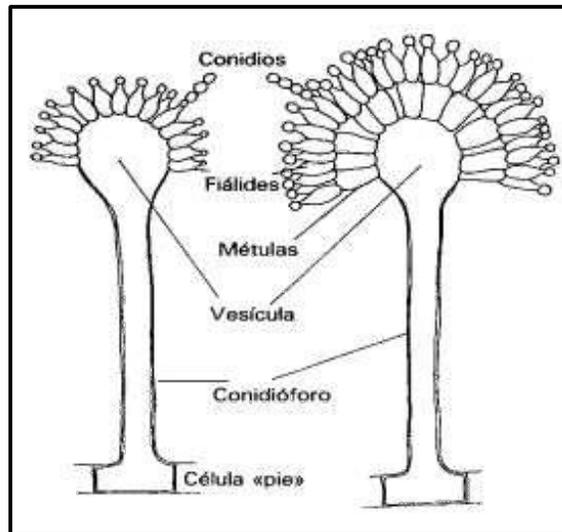
Sobre la vesícula pueden desarrollarse las métulas y las fiálides, formando una segunda capa. Las fiálides pueden crecer directamente sobre la superficie de la vesícula. Los hongos del género *Aspergillus* son hongos filamentosos que se ven influenciados en su crecimiento y biosíntesis como factores extrínsecos como agua, temperatura, pH y composición gaseosa del medio. Para su identificación cuando crecen en medios como agar de malta, las colonias se presentan extendidas, con colores que van desde el blanco al amarillo verdoso o al café maduro o negro, ocasionalmente dominadas por escleróticas duras, blancas al principio, transformándose a café maduras o negras con el tiempo y alcanzando un tamaño entre 400 a 700 micras. Las cabezas conidiales son típicamente radiadas, separadas por varias columnas, a veces poco definidas. Los conidióforos son paredes gruesas, incoloras, ordinariamente rugosas con 1 mm de largo y 10 a 20 micras de diámetro por debajo de la vesícula. Las vesículas jóvenes son alargadas, transformándose de sub-globosas a globosas en el tiempo y presentan fiálides de $6,5 \times 10^3$ - 5 micras. Los hongos deben encontrar en los medios de cultivo lo necesario para su crecimiento y desarrollo: materias nitrogenadas como la peptona, azúcares como glucosa o maltosa que son indispensables, un soporte sólido como la gelatina que permite a los hongos filamentosos desarrollar el micelio aéreo con hongos de fructificación, un pH más ácido (de 5 a 6) es más conveniente. Por sí mismos, los hongos sirven como alimento o se utilizan en la elaboración de otros: pan, vino, cerveza, quesos Roquefort y Camembert. Se usan para producir salsa de soja, fermentar la mandioca y producir tapioca. También sirven para elaborar antibióticos como la penicilina, las cefalosporinas, griseofulvina y ácido fusídico, así como hormonas y enzimas. Por sus usos en la industria se ha desarrollado mucho la ingeniería genética. **(Betancourt, 2003)**

2.1.1. *Aspergillus oryzae*

Características y Morfología del *Aspergillus oryzae*

Al comenzar su desarrollo, las colonias son de color blanco, y luego se convierten en amarillo verdosas. Los conidióforos son estructuras formadas a partir de hifas, que porta células conidiógenas productoras de conidios o esporas. Produce amilasas, proteasas y ácido kojico.

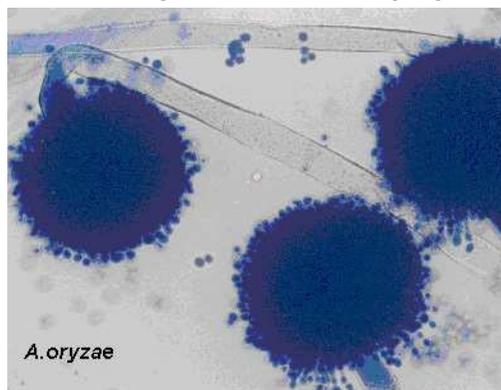
Figura 1: Partes del moho *Aspergillus oryzae*



Fuente: <http://www.telmeds.org/atlas/micologia/hongos-contaminantes/aspergillus-2>

Perel (2013) dice que “el moho *Aspergillus oryzae*, llamado koji se inocula sobre arroz cocido al vapor, y es incubado de 3 a 4 días a 42°C. Cuando el koji se desarrolla se observa una lana blanca como el algodón cubriendo completamente el arroz”. (**Sección de Características y morfología de *Aspergillus oryzae*, párr. 4**)

Figura 2: Morfología de la especie *Aspergillus oryzae*



Fuente: <http://s1.downloadmienphi.net/file/downloadfile9/222/1331339.pdf>

2.1.2. Bioquímica del proceso de Hidrólisis del almidón de arroz

Las hifas fúngicas penetran, mediante enzimas líticas, en el grano de arroz hasta alcanzar los estratos de tejido donde se encuentra el almidón en el grano de arroz. El hongo entonces libera las amilósacaridasas para que degraden el almidón. En primer lugar, la glucoamilasa empieza atacando por los extremos y a las cadenas ramificadas, mientras que la α -amilasa ataca a las cadenas por el medio, creando productos intermedios, que a su vez son atacados por la α -amilasa. Al final, solo quedan maltosas que la α -amilasa rompe, obteniendo así glucosa. Finalmente, esta glucosa puede ser absorbida por *Aspergillus*, o permanecer en el arroz y participar en su sacarificación. Debido a su gran actividad hidrolítica, la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, es muy utilizada en gran variedad de procesos industriales, y ha sido extensamente estudiada.

La producción de amilósacaridasas en el género *Aspergillus*, es mayor en fermentaciones en medio sólido (como es el caso del Sake) que en medio líquido, ya que al parecer las fermentaciones en estado sólido reproducen las condiciones naturales de crecimiento, creando variaciones locales de la concentración de sustrato que estimulan la producción de enzimas hidrolíticas por parte del organismo. No obstante, el ratio entre α -amilasa y glucoamilasa es diferente para cada cepa. Así, la cantidad de α -amilasa es más elevada en *Aspergillus oryzae* mientras que la producción de glucoamilasa es más elevada en *Aspergillus niger* pero el mecanismo de acción es el mismo. (García, 2010)

Este proceso, también llamado sacarificación, es llevado a cabo por dos enzimas: la α -amilasa, la enzima liquefactora, y la glucoamilasa. Estas se hallan entre las amilósacaridasas más estudiadas dadas su alta actividad y sus muchas aplicaciones industriales. El almidón es uno de los mayores glucopolímeros, y su estructura básica es la de una cadena central compuesta de α -D-glucosas unidas mediante enlaces α -1,4 y cadenas ramificadas mediante enlaces α -1,6. La cadena lineal no ramificada recibe el nombre de amilosa mientras que las cadenas ramificadas se denominan amilopectinas. Estas cadenas difieren no solo en cuanto a sus propiedades físicas, sino también en cuanto a proporciones ya que la amilosa representa entre el 17 y el 25% del almidón, mientras que el resto son principalmente amilopectinas. La estructura de estos dos polímeros en solución sigue siendo todavía objeto de debate. No obstante sí se ha observado que la distancia media entre ramificaciones de amilopectina y la cadena principal es variable. La α -amilasa es una endosacaridasa (por lo tanto no puede atacar a un polímero por sus extremos) que rompe exclusivamente enlaces de tipo α -1,4, mientras que la glucoamilasa es una exosacaridasa, que no solo puede atacar al almidón por los extremos de sus cadenas, sino que puede romper enlaces α -1,4 y α -1,6. Esto deja entender claramente que la α -amilasa actúa principalmente sobre la cadena principal, mientras que la glucoamilasa tiene una función desramificadora que puede colaborar en la ruptura de cadenas lineales.

La presencia de almidón y de maltosa son inductores de la actividad de la α -amilasa, mientras que altas concentraciones de glucosa tienen un efecto inhibitorio de su actividad. Afortunadamente, en la elaboración del sake esto no es un problema, ya que a medida que

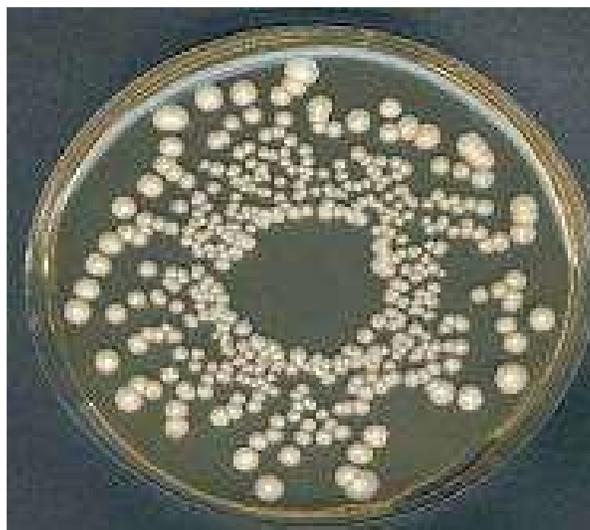
Aspergillus oryzae va generando glucosa, las levaduras fermentadoras la van utilizando para producir etanol, por lo que nunca se alcanzan concentraciones de glucosa suficientes para inhibir la actividad hidrolítica de la α -amilasa.

La α -amilasa, alcanza una actividad máxima para un pH de 4 – 6 y una temperatura de 55 °C. Para la glucoamilasa, por el contrario, el pH óptimo es de 4, teniendo a 4,7 una actividad equivalente al 70% de la actividad máxima, y la temperatura óptima 75 °C, aunque puesto que se trata de una enzima inestable a altas temperaturas, el límite para aplicaciones prácticas se halla entre los 40°C – 60 °C. Estos datos resultan aún más interesantes si se tienen en cuenta las condiciones de elaboración del koji y del moromi, ya que durante la elaboración del koji la temperatura nunca sobrepasa los 36 °C. (García, 2010)

2.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante de bordes irregulares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 47 °C. (Garzón y Hernández, 2009)

Figura 3: Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG



Fuente: Garzón y Hernández, 2009

El nombre de *Saccharomyces cerevisiae* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas, como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar masa de pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites.

Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta la lactosa. **(Garzón y Hernández, 2009).**

Saccharomyces cerevisiae pertenece al grupo de las levaduras de la familia Saccharomycetaceae. La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies pero presentan ausencia de hifas verdaderas. En presencia de oxígeno las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato.

Requerimientos nutricionales: *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable.

Requerimientos fisicoquímicos. El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento. **(Garzón y Hernández, 2009).**

2.1.4. Bioquímica del proceso de Fermentación

Cuando el medio es rico en azúcar, la transformación del mismo en alcohol hace que la presencia de una cierta concentración (generalmente expresada en grados Brix) afecte a la supervivencia de levaduras no pudiendo realizar la fermentación en tal medio (las altas concentraciones de

azúcar frenan los procesos osmóticos de las membranas de las células). Aunque hay distintos tipos de levaduras con diferentes tolerancias a las concentraciones de azúcares y de etanol, el límite suele estar en torno a los 14°GL de alcohol para las levaduras del vino, por ejemplo. Los azúcares empleados en la fermentación suelen ser: dextrosa, maltosa, sacarosa. Los microorganismos atacan específicamente a los hidratos de carbono, siendo la maltosa la más afectada por las levaduras. Otros factores como el número de levaduras (contadas en el laboratorio, o la industria, a veces mediante cámaras de Neubauer). Las propias levaduras se han empleado a veces en la alimentación humana como un subproducto industrial. Se ha descubierto que en algunos casos es mejor inmovilizar (reducir el movimiento) de algunas levaduras para que pueda atacar enzimáticamente mejor y con mayor eficiencia sobre el sustrato de hidratos de carbono evitando que los microorganismos se difundan facilitando su recuperación (los biocatalizadores suelen ser caros), para ello se emplean "fijadores" como agar, alginato de calcio, astillas de madera de bálsamo, etcétera.

(Garzón y Hernández, 2009).

2.1.5. Reacción bioquímica de Fermentación

La glicólisis es una ruta catabólica en la cual la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las cuales dependiendo de las condiciones, pueden tomar rutas diferentes, en la **figura 4**, se muestra la ruta que toma el piruvato en condiciones anaerobias.

En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas. **(Garzón y Hernández, 2009).**

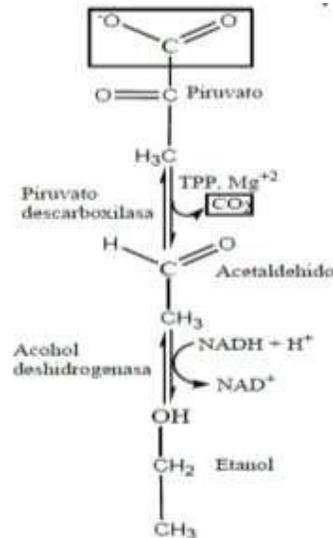
Figura 4: Ruta catabólica del Piruvato obtenido mediante Glicólisis



Fuente: Garzón y Hernández, 2009

Posteriormente el piruvato se descarboxila debido a la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol, para formar acetaldehído el cual se reduce a etanol por la presencia de NADH como agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está en todos los organismos capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica. La conversión del piruvato a etanol se muestra en la **figura 5. (Garzón y Hernández, 2009).**

Figura 5: Conversión del Piruvato en Etanol y Dióxido de Carbono



Fuente: Garzón y Hernández, 2009

En las levaduras, la producción de etanol se realiza principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales o melaza de azúcar. **(Garzón y Hernández, 2009).**

2.2. Enzimas Microbianas

Aspergillus oryzae, fue aislado sobre el arroz y ha sido muy empleado, junto con *A. awamori*, para producir amilasas y proteasas en las fermentaciones tradicionales del Asia oriental (China, Corea, Japón). El cultivo de estos hongos sobre arroz cocido al vapor, se llama koji.

El koji es la materia prima para la transformación del arroz cocido en azúcares para producir el vino, llamado en Japón, sake. O para producir los hidrolizados de pasta de soya cocida, llamados miso, que son muy utilizados para producir sopas vegetarianas con sabor a caldo de pollo. Estas tres especies son las más empleadas para producir enzimas porque no producen toxinas como las aflatoxinas, que son características de los cultivos *A. parasiticus*, o de *A. flavus*.

Las aflatoxinas son compuestos cancerígenos muy potentes cuya tolerancia en los granos alimentarios debe ser menor a 10 mg por tonelada (ppb). Afortunadamente, estas especies

patogénicas pueden distinguirse de las no toxicogénicas, debido a que tienen un color verdusco muy característico y porque es relativamente fácil medir la presencia de aflatoxinas, usando técnicas inmunológicas disponibles en los laboratorios especializados para el control de los alimentos. El ciclo biológico de *Aspergillus* comprende la germinación, a partir de esporas, el crecimiento micelial, es decir como árboles microscópicos ramificados y la esporulación, que incluye la formación de micelio aéreo que son la base de las estructuras llamadas conidióforos, de las cuales se desprenden las fialides o racimos de esporas. Muchas de las enzimas industriales producidas por *Aspergillus* están asociadas a la producción de micelio, durante la fase llamada vegetativa. (Viniegra, 2003)

2.2.1. Estructura y Actividad Catalítica

La α -amilasa de *Aspergillus oryzae* es una metaloproteína formada por una cadena polipeptídica que consta de 478 residuos. La estructura primaria se ha determinado mediante secuenciación directa de la cadena polipeptídica; y también por deducción a partir de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína. La molécula puede contener hasta 10 iones Ca^{+2} , aunque solamente uno de ellos no es dissociable, siendo esencial para mantener la actividad catalítica y para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína. (Bautista, 1997)

Figura 6: Diagrama de flujo de las principales operaciones para la producción de Glucosa y Fructosa



Fuente: Salvador Badui Dergal, 2006

La α -amilasa (1,4, α -glucanohidrolasa) es una enzima extracelular que hidroliza los enlaces α 1-4 glicósidos de polisacáridos, tales como el almidón, glicógeno o productos de degradación de los mismos. Tiene una actividad enzimática que oscila entre 53-129 U/L su peso molecular va de los 40 000 a 50 000 Da, su actividad requiere de la presencia de iones cloruro. Esta enzima tiene importancia en la industria alimentaria como en cervecería, dulcería, cereales y panadería, y específicamente en la sacarificación maltogénica, sin embargo, su producción es limitada y es un producto de exportación. La α -amilasa que es producida de manera natural por *Aspergillus oryzae* tiene un peso molecular de 52×10^3 . Las enzimas de origen microbiano presentan ventajas técnico-económicas: poseen tiempos de generación menores, tienen requerimientos de espacio menor por unidad de enzima producida y una potencialidad ilimitada en cuanto a la disponibilidad de nuevas enzimas. **(Guadarrama, Orozco y Morales, 2007).**

La α -amilasa es una enzima presente en prácticamente todos los organismos vivos. Se han identificado y estudiado α -amilasas desde células procariotas de los géneros (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Saccharomycopsis*, *Streptococcus*) y eucariotas (*Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Mucor*, *Candida*, *Rhizopus*), hasta plantas superiores (maíz, trigo, cebada), artrópodos (*Drosophila*) y mamíferos (cerdos, ratones, ratas, humanos), posiblemente por ser un mecanismo químico general para la obtención de glucosa para el metabolismo energético de estos organismos.

La mayoría, sino todas, las proteínas secretadas por hongos filamentosos se encuentran glicosiladas. En particular, la α -amilasa de *A. oryzae* contiene una sola cadena de oligosacárido unida a un residuo de asparragina (Asn-197). Se han propuesto diferentes estructuras constando todas ellas de varias subunidades de manosa unidas a la proteína a través de dos restos de N-acetil glucosamina.

La temperatura de actividad óptima de la α -amilasa producida por el hongo filamentoso *A. oryzae* varía entre 35 y 55 °C, en función de la cepa que lo produce. La actividad hidrolítica de la α -amilasa procedente de bacterias del género *Bacillus* es óptima, generalmente, a valores más altos de temperatura, llegando hasta los 100 °C en algunas cepas de *B. licheniformis*.

La α -amilasa de *A. oryzae* es una enzima extremadamente estable en el intervalo de pH 5 - 8, no detectándose desactivación, de forma significativa, tras largos períodos de tiempo en estas condiciones. **(Bautista, 1997)**

2.3. Almidón:

Exactamente no se sabe desde que época es conocido el almidón, los griegos lo llamaron Anylon quizás debido a que al contrario de lo que sucede con la harina, se obtenía no por el molino, sino por el lavado **(Ullman, 1954).**

Según rastros arqueológicos hallados en las tumbas de los reyes egipcios, presentan muestras de pegantes a base de almidón, los cuales datan aproximadamente del año 3500 AC.

En la industria del almidón se conoce muy poco acerca de su aparición. Se admite probablemente que los holandeses en el siglo XVI habían fabricado almidón a gran escala, pero usando como materia prima el trigo; el desarrollo debió efectuarse muy lentamente al igual que en otros países. Después de la celulosa, el almidón es la sustancia orgánica más ampliamente distribuida en la naturaleza, la celulosa forma parte del armazón de las plantas, mientras que el almidón representa su reserva de carbohidratos, transformándolos por hidrólisis en glucosa la cual es transformada por medio de la savia, aprovechando su solubilidad. En las plantas existen 3 clases de almidón: almidón de asimilación, transitorio y de reserva. El almidón de asimilación es aquel que ha de servir en la nutrición de la planta y el cual se encuentra en forma de almidón soluble.

El almidón en el interior de la planta, es transformado en azúcares por medio de enzimas diastásicas, pasando primero por la fase de almidón soluble, el cual puede transformarse algunas veces en gránulos muy finos, formando así al almidón transitorio. El resto del almidón es transportado a los sitios de almacenamiento donde tiene como función servir de alimento para los brotes jóvenes; este es llamado almidón de reserva.

Las amilasas actúan muy lentamente sobre el almidón, por lo que debe ser sometido a un proceso de cocción para obtener una buena dispersión y rompimiento de los granos de almidón llevándose a cabo una hidrólisis rápida.

La acción de la amilasa sobre el almidón depende del origen del mismo, ya que el almidón consta de una mezcla de 75-80% de amilopectina y el resto de amilosa. Esta última se compone de cadenas longitudinales que contienen unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glucosídico. Una cadena lineal puede contener de 70 a 100 unidades de glucosa aproximadamente. (**Linden, 1996**).

Desde el punto de vista químico, el almidón es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina; el primero es producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos (α 1-4), que establece largas cadenas lineales con 2000-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D-(1,4) glucana, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal (**figura 7**).

El almidón es el carbohidrato más importante en la actividad humana por su función alimenticia. Este polisacárido sirve de reserva energética en el reino vegetal, es una mezcla de 2 polisacáridos amilosa y amilopectina. Este carbohidrato ha sido parte fundamental de la dieta del hombre desde la prehistoria, además de que se le ha dado un gran número de usos industriales. Después de la celulosa, es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial. Se encuentra en los cereales, los tubérculos y en algunas frutas como polisacáridos de reserva energética.

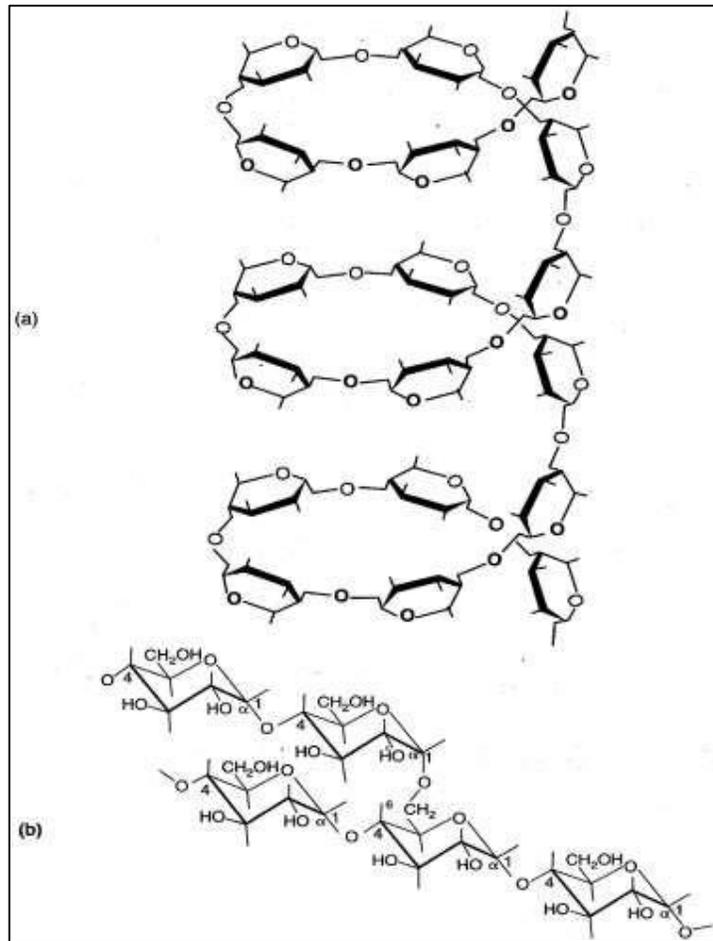
Su concentración varía según el estado de madurez de la fuente; el caso del plátano es una señal muy clara en este sentido: en estado verde o inmaduro constituye la mayor fracción de los hidratos de carbono, ya que los azúcares son muy escasos; a medida que la fruta madura, el polisacárido se hidroliza por la acción de las amilasas, y mediante otros sistemas enzimáticos se sintetizan la sacarosa y la fructosa que se encuentran cuando llega a la plena maduración. **(Badui, 2006).**

2.3.1. Amilosa

Es un polímero lineal formado por cadenas de glucosas unidas por enlaces α -1,4, que constituyen el 20-30% del gránulo de almidón en los órganos de almacenamiento y 4-20% en los gránulos provenientes de las hojas. Su peso molecular se encuentra en el orden de 250000 a 1000000 Da. **(Bernal y Martínez, 2006)**

Por su parte, la amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa **(figura 7 - 1b). (Badui, 2006).**

Figura 7: (a) Enrollamiento helicoidal de la Amilosa; (b) Estructura química de la Amilopectina



Fuente: Salvador Badui Dergal, 2006

Tabla 1: Características de algunos almidones usados en la Industria Alimentaria

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	T° de gelatinización (°C)	Tamaño del gránulo (micras)
Maíz	69-74	26-31	62-72	5-25
Maíz rico en amilosa	20-45	55-80	67-80	5-25
Papa	73-77	18-27	58-67	5-100
Arroz	83	17	65-75	2-5
Tapioca	82	18	51-65	5-35
Maíz céreo	99-100	0-1	63-72	5-25
Sorgo céreo	99-100	0-1	67-74	5-25
Trigo	76	24	58-64	11-41

Fuente: Salvador Badui Dergal, 2006

Algunos cereales, como el maíz, el sorgo y el arroz, tienen variedades llamadas céreas que están constituidas casi únicamente por amilopectina; hay otras que tienen hasta 90% de amilosa. La concentración relativa de estos dos polímeros está regida por factores genéticos típicos de cada cereal. El yodo reacciona con la amilosa y genera un fuerte color azul característico debido al complejo que se establece entre una molécula de este con cada 7-8 glucosas; para desarrollar adecuadamente la coloración se requiere un mínimo de 40 residuos de monosacárido, las cadenas muy cortas de amilosa, en lugar de azul producen un color rojo. Aparentemente el complejo amilosa-yodo se establece por inclusión del I_2 en la hélice, mecanismo semejante al que se observa en los monoglicéridos que se usan en la elaboración del pan. Por otra parte, la amilopectina solo forma complejos con una pequeña cantidad de I_2 y desarrolla una coloración roja. Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera determinante en las propiedades sensoriales y reológicas de los alimentos, principalmente mediante su capacidad de hidratación y gelatinización. En ciertos casos, cuando una de estas fracciones está en exceso, puede traer consigo algunos inconvenientes; esto se observa en el arroz cocido, cuya calidad mejora cuando se reduce el contenido de amilosa, pues resulta menos pegajoso. El almidón sirve de reserva energética en el reino vegetal, y se encuentra en pequeños corpúsculos discretos que reciben el nombre de gránulos; en el tejido vegetal, estos ejercen una presión osmótica muy baja, con lo que la planta almacena grandes cantidades de glucosa de una manera muy accesible sin romper el balance de agua interior.

El tamaño y la forma del gránulo son característicos de cada especie botánica; esto se ha aprovechado en el desarrollo de diferentes métodos microscópicos para identificar el origen de los distintos almidones de la **tabla 1**. En un mismo cereal se distinguen varios tipos de gránulos; en general, los que se encuentran en la zona más exterior del endospermo son poliédricos, mientras que los del interior son redondos. **(Badui, 2006)**.

2.3.2. Amilopectina

La amilopectina es un polisacárido altamente ramificado, con un esqueleto de enlaces α -1,4 y 4-5% de puntos de ramificación α -1,6. La amilopectina es una molécula de mayor tamaño que la amilosa y su peso molecular se encuentra entre 100-200 millones Da. El peso molecular y el grado de ramificación de la amilopectina varía ampliamente y esta variedad estructural contribuye a las diferencias en las propiedades químicas y físicas del almidón proveniente de diferentes fuentes. **(Bernal y Martínez, 2006)**

La estructura rígida de los gránulos está integrada por capas concéntricas de amilosa y de amilopectina (distribuidas radialmente) que permanecen inalterables durante la molienda, el procesamiento y la obtención de los almidones comerciales.

En términos generales, los almidones contienen aproximadamente 17-27% de amilosa, y el resto de amilopectina, como se muestra en la **Tabla 1**. **(Badui, 2006)**.

2.3.3. Materia Prima: “Arroz”

El arroz es un cereal de origen asiático que actualmente está difundido en todo el mundo, constituyéndose en uno de los productos más consumidos. El arroz (*Oryza sativa*) es una planta herbácea anual que se caracteriza por necesitar riegos intensos. Su grano se encuentra en una vaina de color castaño compuesto por un pericarpio, un endospermo voluminoso y un germen pequeño. El acondicionamiento del arroz para su consumo consiste en la eliminación de la cascara o vaina, del salvado o pericarpio, de la capa aleurónica y del germen. El valor comercial de los granos enteros es mayor por lo tanto hay que cuidar que no se rompan en este procesamiento.

◆ **Composición del grano de Arroz**

✓ **Carbohidratos**

El almidón es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad en el arroz: el 90% aproximadamente del peso seco del arroz elaborado. Entre otros hidratos de carbono se encuentran la celulosa y lignina. El arroz elaborado contiene un 88 - 90% de almidón, el 0,3 - 0,6% de pentosanas, el 0,2 - 0,6% de azúcares libres y el 0,2 - 0,5% de celulosa y lignina.

✓ **Compuestos Nitrogenados**

El contenido de proteínas es el segundo en importancia, después de los hidratos de carbono, en el arroz descascarillado y en el elaborado. Las proteínas se encuentran en el arroz en sus múltiples fracciones de aminoácidos.

✓ **Lípidos**

Las grasas, en el arroz descascarillado, representan aproximadamente el 2% del peso seco; se encuentran en mayor proporción en el germen, pericarpio y capas de aleurona, cerca de un 80%.; casi un tercio se extrae del germen.

✓ **Otros componentes orgánicos**

En el pericarpio, y fundamentalmente en las capas de aleurona y en el germen, se concentra la mayor parte de las vitaminas presentes en el arroz. El arroz sancochado tiende a mantener altos los valores de las vitaminas porque durante el proceso de precocción se difunden en el endospermo amiláceo.

✓ **Minerales**

Los constituyentes inorgánicos presentes en el arroz, ordenados según la proporción en que se encuentran son: fósforo, potasio, magnesio, silicio, calcio, cloro, sodio, hierro, zinc, manganeso y aluminio. **(Medin y Medin, 2003)**.

2.4. Bebidas Alcohólicas

Las bebidas alcohólicas tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica. Todo líquido azucarado sufre esta fermentación de manera espontánea debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol.

La vida de las levaduras en los líquidos es distinta a la de los mohos ya que, mientras estos últimos viven en la superficie, las levaduras crecen en la masa del líquido. En algunas ocasiones suben a la superficie creando una película llamada velo. La levadura del vino, por ejemplo, se encuentra sobre las vides en el período de maduración, pasa al mosto en la fase de estrujamiento y posteriormente inicia la fermentación del mosto para transformarlo en vino.

Dado que la mayoría de las levaduras sólo actúan sobre la glucosa mientras que, muy pocas lo hacen sobre la maltosa y la dextrina, en la obtención de alcohol a escala industrial hay que recurrir a hongos ricos en amilasas que hidrolizan el almidón y la dextrina. Algunos de estos hongos prosiguen la transformación descomponiendo los azúcares obtenidos en alcohol, como el *Aspergillus oryzae* que produce el sake. **(Carretero, 2008)**.

En la fermentación alcohólica las levaduras utilizan los azúcares, sacarosa, fructosa, maltosa y maltotriosa en este orden. La sacarosa es hidrolizada primeramente por la invertasa localizada en el espacio periplásmico extracelular. Aunque las fermentaciones alcohólicas son en gran medida anaerobias, las levaduras necesitan algo de oxígeno para sintetizar algunos esteroides y ácidos grasos insaturados. Muchas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pueden producir concentraciones de etanol de hasta el 12% al 14%. Existen cepas seleccionadas capaces de producir hasta un 18% a 20% de alcohol, aunque la velocidad de fermentación se ve fuertemente reducida cuando la concentración de etanol aumenta. En las levaduras los valores de pH comprendidos entre 3 y 6 son la mayoría de las veces favorables al crecimiento y actividad fermentativa. La velocidad de fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 °C y 35°C y los niveles de glicerol, acetona, gliceraldehído y piruvato se elevan en los medios de fermentación. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura. En la producción de bebidas alcohólicas deben controlarse las fermentaciones de forma que, por un lado se asimilen los carbohidratos y otros nutrientes y se conviertan en alcohol y en compuestos con aromas característicos y deseables, y por otro lado, se minimice la

formación de aromas y sabores indeseables. Entre los compuestos del aroma y sabor se encuentran otros alcoholes diferentes del etanol, ésteres, compuestos carbonílicos, ácidos orgánicos, compuestos azufrados, aminas y fenoles. A medida que la riqueza alcohólica aumenta, la población de otras levaduras que se encuentran en el medio a fermentar decrece y va siendo sustituida como población dominante por la *Saccharomyces cerevisiae*. Este patrón de sucesión está fuertemente influenciado por las condiciones de fermentación como son la temperatura y el pH; por ejemplo, a una temperatura de 25°C – 47°C y pH de 3.0 a 3.5, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* dominan la fermentación y las otras especies mueren. Como también la adición de SO₂ reduce la población de levaduras silvestres en el medio y de esta manera favorece la preponderancia de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que esta especie es más resistente a este biocida. **(Ramírez y Pedroza, 2010).**

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

A. Materia Prima:

- ✓ Arroz marca "Casserita"

B. Material Microbiológico:

- ✓ Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763)
- ✓ Cepa de moho *Aspergillus oryzae* (cepa nativa)

C. Materiales:

- ✓ 1 Pipeta graduada 2 ml (PYREX U.S.A.)
- ✓ 1 Pipeta graduada de 5 ml (MC, LBT Germany)
- ✓ 1 Pipeta graduada de 10 ml (PYREX U.S.A.)
- ✓ 1 Pera de jebe para pipetear (MILAB)
- ✓ 2 Fiolas de 1 L con tapa esmerilada (PYREX México)
- ✓ 1 Fiola de 250 ml (PYREX México)
- ✓ 1 Fiola de 100 ml (PYREX México)
- ✓ 6 Fiolas de 50 ml (PYREX México)
- ✓ 1 Probeta de 50 ml (PYREX VISTA)
- ✓ 1 Probeta de 250 ml (PYREX VISTA)
- ✓ 1 Embudo de vástago largo (PYREX MADE IN U.S.A.)
- ✓ 1 Porta embudos
- ✓ 1 Espátula plástica (BEL ART)
- ✓ 1 Luna de reloj
- ✓ Vaso de precipitación de 200 ml (Premium U.S.A., Boro 3.3)
- ✓ Matraz aforado de 100 ml (PYREX México)
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 250, 300 y 500 ml (Kintel)
- ✓ Placas Petri (Normax)
- ✓ Picnómetro (BRAND)
- ✓ Perlas de vidrio
- ✓ Mechero de alcohol (PYREX MADE IN U.S.A.)
- ✓ Bureta graduada de 50 ml (LMS Made in Germany)

- ✓ Tubos de ensayo (KIMAX)
- ✓ Soporte universal y anillo
- ✓ Pinzas para refrigerante, bureta y matraz
- ✓ Rejilla de asbesto
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Papel filtro (Whatman)
- ✓ Piceta (BEL ART)
- ✓ Bagueta (PYREX VISTA)
- ✓ Manguera (1.5m)
- ✓ Frascos de vidrio
- ✓ Caja conservadora plástica de 8 L (BASA)
- ✓ Caja térmica tecnopor
- ✓ Termómetro de alcohol (escala de -10 – 150 °C)
- ✓ Alcoholímetro (escala de 0 – 100 °GL)
- ✓ Balde plástico de 8 L (BASA)
- ✓ Tocuyo (1m)
- ✓ 2 Rollos de papel tissue (Scott)
- ✓ 4 pares de guantes desechables de látex (CAREPLUS)
- ✓ Marcador indeleble (Artesco)
- ✓ Tijeras
- ✓ Pegamento (Super Glue)
- ✓ Bolsas plásticas de polietileno, 7 x 10 x 2 (Kristal)
- ✓ Olla de acero inoxidable de 5 L (Premier Germany)
- ✓ 4 Cuberas de plástico (Pamolsa)
- ✓ Colador metálico
- ✓ Fósforos (Llama)

D. Equipos:

- ✓ Equipo de destilación (PYREX ENGLAND)
- ✓ Cámara cuenta colonias (SOL-BAT)
- ✓ Cocina eléctrica (BOECO Germany)
- ✓ Cocina ecológica (RAFPIN)
- ✓ pH-metro (HANNA)
- ✓ Refractómetro (escala de 0 – 60% Brix, SPER SCIENTIFIC)
- ✓ Estufa (memmert, CIMATEC S.A.C.)
- ✓ Balanza analítica (Sartorius)
- ✓ Baño María con control Digital de temperatura (Luda Aqualine, AL 12)
- ✓ Espectrofotómetro (Baush & Lomb, Espectronic 20)

- ✓ Microscopio con aumento 4X, 10X y 40X (BOECO Germany)

E. Insumos y Reactivos:

- ✓ Bisulfito de sodio (25 g – prueba de metanol)
- ✓ Bisulfito de sodio 0.05 N (prueba de aldehídos)
- ✓ Tiosulfato de sodio 0.05 N
- ✓ Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%
- ✓ Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 N
- ✓ Ácido cítrico
- ✓ Solución Fehling A y B
- ✓ Solución de glucosa anhidra al 0.5%
- ✓ Solución de Yodo 0.05 N
- ✓ Ron de quemar
- ✓ Medio de cultivo “Agar Sabouraud”
- ✓ Caldo: lactosa, maltosa, Sabouraud, Hipersacaroso, nutritivo.
- ✓ Agua embotellada sin gas “San Luis” (11 L)
- ✓ 225.5 ml de Alcohol Etilico Absoluto Anhidro (al 5.5 %)
- ✓ 2 ml de Metanol (99.9 %)
- ✓ Ácido sulfúrico 0.1 N y 105 ml de ácido sulfúrico concentrado (al 98%)
- ✓ Solución de Ácido Sulfúrico 0,1 N
- ✓ 14 ml de Permanganato de Potasio (KMnO₄) 0,1 N
- ✓ 7 ml de Ácido Cromotrópico (al 5 %)
- ✓ Ácido Clorhídrico 1:1
- ✓ Hipoclorito de sodio (lejía)
- ✓ Detergente (Opal)

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos Microbiológicos. (Según AOAC)

Siempre que trabajemos con un cultivo de hongos debemos tener en cuenta que estos se reproducen por medio de esporas, y que estas se dispersan muy fácilmente por el ambiente, contaminando el laboratorio. Por tanto, debemos tomar precauciones en la manipulación de los cultivos, de tal forma que se evite, en lo posible, la contaminación, para lo cual:

- Debemos tener las placas abiertas el menor tiempo posible.

- Las placas con crecimiento fúngico siempre se abren boca abajo, dejando la tapa en la mesa y manteniendo el cultivo hacia abajo con el fin de que las esporas no se diseminen.

◆ OBTENCIÓN DE UNA CEPA CON ACTIVIDAD HIDROLÍTICA

a. Toma de Muestra y Aislamiento de mohos

Bajo la denominación de muestra se incluye cualquier elemento orgánico, natural o patológico, procedente del animal vivo, del cadáver, o de su entorno, que sea susceptible de contener microorganismos. Son muestras por tanto, líquidos fisiológicos (sangre, orina, saliva, heces), líquidos patológicos (exudados, pus, esputos, vómitos) y sólidos como biopsias o piezas procedentes del cadáver; también son muestras los alimentos, camas y el propio ambiente en el que se encuentran situados los animales. Para la realización experimental del proyecto, la muestra (arroz) fue sometida a un tratamiento con calor (cocción al vapor), previamente para permitir la dextrinización del almidón del arroz y facilitar la hidrólisis por el moho identificado e inoculado.

b. Método de Siembra

▲ Técnicas para medios de cultivo sólido

Cuando el medio de cultivo a sembrar es sólido, se puede sembrar en superficie, por toques y estrías.

🚩 En Superficie:

- **Método de siembra por toques:** Introducir el asa en punta o pinzas con el inóculo (arroz cocido al vapor) a sembrar sobre la superficie de la placa Petri conteniendo el medio sólido de agar Sabouraud, formando un cuadrado con los granos de arroz colocados en las esquinas, al final en el centro un grano de arroz para completar la siembra. Se lleva a incubar a temperatura y periodo óptimos dependiendo del tipo de problema en estudio.

c. Método de Identificación de hongos aislados sobre medio de cultivo y Caracterización de las colonias

❖ Características macroscópicas

- Color (anverso y reverso), tonalidad y distribución.
- Textura superficial, surcos y/o estrías.
- Exudados y pigmentos.
- Tamaño.

❖ Características microscópicas

- Conidióforos de paredes rugosas, hialinos.
- Conidióforos de pared rugosa, vesículas globosas con masa de esporas en forma de columna o radiada, en algunas cabezas las fialides nacen directamente de la superficie de la vesícula y en otras nacen métulas.
- Vesículas subglobosa 40-80 μm de diámetro.
- Las fialides a menudo crecen sobre las vesículas o sobre las métulas midiendo 10-15 μm x 3-5 μm , métulas 8-12 μm x 4-5 μm .
- Conidios globosos a subglobosos 3.5-4 de color verde.

◆ **Caracteres que presentan valor Taxonómico:** En la identificación de hongos miceliares.

◆ **Criterios de Identificación para Hongos Miceliares:**

➤ **Características de Cultivo:** A partir de las colonias desarrolladas en medios de cultivo sólidos, ejem: agar extracto de Malta, agar Sabouraud, Czapek – Dox, etc.

➤ **Características de las Hifas:**

- Diámetro.
- Color: (hialino, dematiáceo = oscuro, marrón).
- Presencia o ausencia de septos.
- Presencia de determinadas formaciones características: hifas en raqueta, hifas en espiral, hifas peptinadas, formación de clamidosporas.

➤ **Características de las Estructuras Reproductoras Asexuales:**

Hongos no Septados:

- Presencia o ausencia de conidióforo.
- Morfología del conidióforo.
- Morfología y tipo de célula conidiógena.
- Tipo de conidiogénesis: tállica o blástica.
- Estructura y características de los conidios.

3.2.2. Métodos Físicos

◆ **OBTENCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS SENSORIALES Y PARÁMETROS FÍSICOS**

a. Determinación de Características Organolépticas. (Método Sensorial según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.010)

El color, sabor, olor y aspecto son propiedades sensoriales subjetivas que se miden con los sentidos como son: la vista, gusto, y el olfato. Según esta norma, se toma una muestra para poder apreciar todas las características de la bebida alcohólica.

b. Determinación de Grado Alcohólico °GL. (Método por Alcolimetría según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.005)

Es el grado de una mezcla hidroalcohólica pura, indicado por el alcoholímetro centesimal de Gay Lussac en una temperatura diferente a la de referencia. La lectura de un grado aparente debe darse siempre indicando la temperatura a la cual dicha lectura fue tomada. También se considera grado aparente la lectura alcohométrica de una mezcla que no sea pura, debido a la adición de sustancia que altera la densidad de la mezcla. En este caso, para determinar el grado alcohólico real, debe someterse a un proceso de destilación, hasta obtener una mezcla hidroalcohólica pura.

En el mosto de una bebida alcohólica, debido a la presencia de otros componentes, no se puede medir directamente el grado alcohólico midiendo su densidad, por lo que es necesario someter a la bebida alcohólica a un proceso de destilación.

La destilación, es la operación que se realiza para separar una mezcla de dos líquidos miscibles. Consiste en el calentamiento a ebullición de la mezcla, y la posterior condensación de los vapores formados. El líquido que se obtiene en la condensación será más rico en el componente más volátil, que el líquido que permanece en el matraz.

En este momento el alcoholímetro es introducido lentamente en el líquido hasta que flote libremente.

Tomar la medida en el punto donde el líquido intersecta al vástago. En otras palabras en el nivel de la superficie del líquido. Para ver la medición del alcoholímetro se debe estar en paralelo con el nivel del líquido.

c. Determinación de la Densidad. (Método por Picnometría según AOAC).

El picnómetro es un recipiente calibrado con el que se puede pesar un volumen de líquido con mucha precisión. Por comparación entre la masa del picnómetro lleno de agua destilada de la que se conoce con gran precisión su densidad a la temperatura del ensayo y la masa del picnómetro lleno con un líquido problema, se puede calcular la densidad de este último.

El método es general para el caso de compuestos sólido/líquido que no reaccionan entre sí.

3.2.3. Métodos Químicos

◆ OBTENCIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS Y EVALUACIÓN DE PRODUCTO TERMINADO

a. Determinación de Azúcares Reductores y Azúcares Totales. (Método de Fehling).

Este ensayo pone de manifiesto la presencia de azúcares reductores (aldosas: glucosa, ribosa, eritrosa, etc.). Se trata de una reacción redox en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ . Tanto los monosacáridos como los disacáridos reductores reaccionan con el Cu^{2+} dando un precipitado rojo de óxido cuproso. La reacción tiene lugar en medio básico por lo que es necesario introducir en la reacción tartrato sódico-potásico para evitar la precipitación del hidróxido cúprico. La prueba de Fehling no es específica; otras sustancias que dan reacción positiva son los fenoles, aminofenoles, benzofina, ácido úrico, catecol, ácido fórmico, hidrazobenceno, fenilhidrazina, pirogalol y resorcinol.

FUNDAMENTO DE LA REACCION DE FEHLING

Se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. Sirve para demostrar la presencia de glucosa y fructosa. El reactivo de Fehling consta de:

- **Fehling A** : CuSO_4 disuelto en H_2O
- **Fehling B**: NaOH y tartrato de $\text{Na} - \text{K}$ disueltos en agua.

Fundamentos de la reacción: En medio alcalino el cobre procedente del CuSO_4 se encuentra en forma de hidróxido cúprico, y se forma la correspondiente sal Na_2SO_4 . Cuando el $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (de color azul) se calienta en presencia de un compuesto reductor se forma óxido cuproso (de color rojo ladrillo).



Si hay un compuesto reductor, el Cu cambia su estado de oxidación de (+2 a +1), lo que se evidencia por el cambio de color.

b. Determinación de Acidez Total. (Método por Titulación según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.002)

La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos, es decir, midiendo los volúmenes. Ésta medición se realiza mediante una titulación, la cual implica siempre tres agentes o medios: el titulante, el titulado y el colorante. Cuando un ácido y una base reaccionan, se produce una reacción; reacción que se puede observar con un colorante. Un ejemplo de colorante, y el más común, es la fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$), que vira (cambia) de color a rosa cuando se encuentra presente una reacción ácido-base. El agente titulante es una base, y el agente titulado es el ácido o la sustancia que contiene el ácido. Este método se basa en determinar el volumen de NaOH estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, determinando el punto final por medio del cambio de color que se produce por la presencia del indicador ácido-base empleado.

c. Determinación de Acidez Volátil (Método por Destilación-Titulación según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.017)

La acidez volátil está constituida por los ácidos orgánicos pertenecientes a la serie acética que se encuentran en las bebidas alcohólicas: ácido acético, fórmico, propiónico y butírico, siendo alrededor de un 98% ácido acético. Se expresa en g ácido acético/L.

El método de análisis de la acidez volátil está basado en la destilación directa para separar los ácidos volátiles de la bebida alcohólica que se cuantifican globalmente por valoración ácido-base con una solución patrón de hidróxido sódico.

d. Determinación de Metanol en Bebida Alcohólica. (Método por Espectrofotometría según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.002.)

El método se basa en la oxidación del metanol a aldehído fórmico por acción del permanganato de potasio en medio ácido. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico para dar un compuesto colorido violeta que se lee en el espectrofotómetro a 575 nm. El metanol es un alcohol que se encuentra presente en todas las bebidas alcohólicas en mayor o menor proporción incluso en trazas. Proviene de la hidrólisis de las pectinas (pectinas solubles), de las materias primas vegetales que se fermentan. La pectina que es una cadena de núcleos galacturónicos (ácido péctico), se esterifica con el alcohol metílico, por esta razón, la fermentación se acompaña de la hidrólisis de este éster, donde se libera el metanol y el ácido péctico se insolubiliza. Por lo tanto el contenido de metanol está en función del contenido de pectinas de la materia prima vegetal que se fermenta.

e. Determinación de Ésteres. (Método Analítico según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.003)

Los ésteres forman el grupo más interesante y numéricamente mayor de compuestos aromáticos de las bebidas destiladas y aunque algunos pueden provenir de las materias primas, éste origen no se considera el más importante. Su cantidad y proporciones entre los diferentes tipos, son de gran importancia para el aroma de una bebida. Al determinar el contenido de ésteres como acetato de etilo, se ha encontrado en rones pesados más de 600 mg/L. Los ésteres presentes en una fermentación se encuentran distribuidos entre los solubles en el medio y los que están dentro de la célula de levadura. La proporción de los ésteres etílicos de ácidos grasos transferidos al medio, disminuyen con el aumento de la cadena carbonada. Así tenemos que el etil caproato se encuentra

todo en el medio, el etil caprilato de 54-68 %, el etil caprato 8-17 % y el etil laurato permanece todo en la levadura. La distribución de los ésteres depende de la cepa de levadura y la temperatura de fermentación, por lo que se transfieren cantidades mayores al medio a temperaturas mayores. Experimentos realizados han mostrado que el nivel de ésteres en una bebida alcohólica no depende solamente de la concentración de estos formados durante la fermentación. En presencia de levadura el nivel puede cambiar en dependencia de la temperatura, el pH, la concentración de alcohol y el tipo de levadura.

f. Determinación de Aldehídos. (Método según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.020)

Este método se basa en que se aprovecha la reactividad química del grupo carbonilo del acetaldehído para combinarse fácilmente con un exceso de agentes sulfatados y formar el ácido etanol sulfúrico; el contenido de aldehídos se puede determinar por el procedimiento indirecto con bisulfito de sodio, en el cual se valora mediante una titulación el exceso de yodo con tiosulfato de sodio. Los aldehídos son compuestos carbonílicos que se encuentran en la mayoría de las bebidas alcohólicas, se forman como productos de oxidación secundaria en los procesos de añejamiento de las mismas y durante los procesos de fermentación y destilación de los mostos para obtener bebidas alcohólicas, mediante una reacción en que cada molécula de aldehído se adiciona a una molécula de alcohol para formar un hemiacetal, que es un compuesto inestable, el cual se combina con una segunda molécula de alcohol y produce un acetal, la reacción es reversible y el acetal formado puede ser hidrolizado a aldehído y alcohol en soluciones alcohólicas diluidas. Ambas reacciones son catalizadas por ácidos, debido a esto, aunque estén presentes ambas sustancias es más frecuente la formación de aldehídos que de acetales.

3.2.4. Metodología Experimental

3.2.4.1. Métodos Microbiológicos

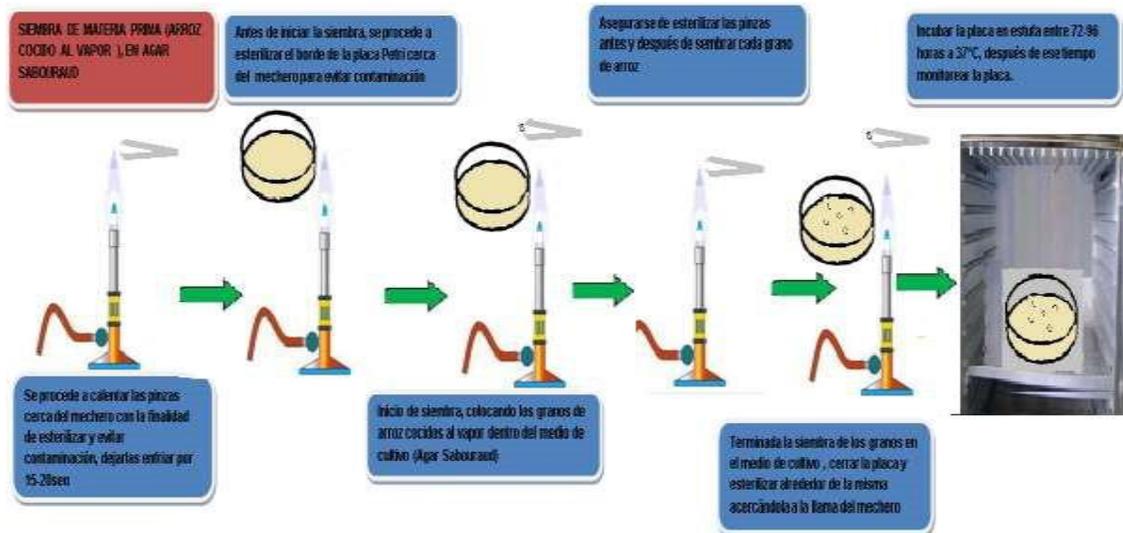
A. AISLAMIENTO PRIMARIO EN LA MATERIA PRIMA

- Se realizó una siembra de arroz cocido en medio de cultivo Agar Sabouraud (específico para crecimiento de mohos y levaduras) con la finalidad de aislar la cepa.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO “AGAR SABOURAUD”

- ✓ Peptona 1g
 - ✓ Glucosa 1g
 - ✓ Agua destilada.100ml
 - ✓ Agar-Agar 1,5g
 - ✓ Ajustar el pH a 6 - 6,2
-
- Se evidenció el crecimiento de colonias de mohos (a 26 días de la siembra primaria).
 - Se identificó por medio de un microscopio (BOECO Germany con aumento 4X, 10X y 40X) la cepa de moho que producirá la hidrólisis (ver con detalle siguiente punto).
 - Posteriormente se realizó una siembra secundaria (repique) con la finalidad de aislar la cepa identificada.

DIAGRAMA 1: SIEMBRA PRIMARIA DE MATERIA PRIMA EN AGAR SABOURAUD



Fuente: *Elaboración Propia*

Figura 8: Siembra de muestra de arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario por toques/0 horas)



Figura 9: Arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/72 horas)



Figura 10: Arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/12 días)

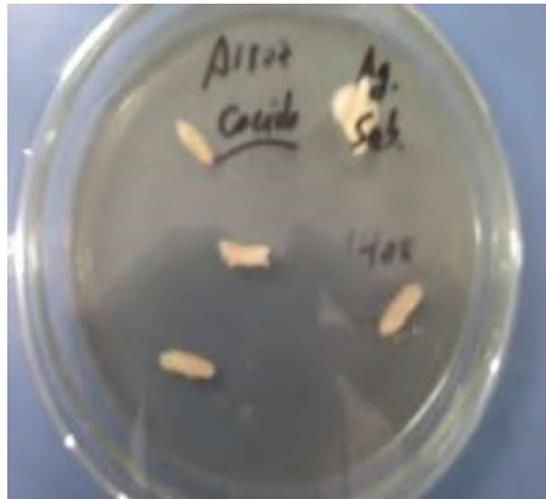


Figura 11: Micelio Vegetativo de las colonias sobre arroz cocido al vapor en Agar Sabouraud (Aislamiento Primario/26 días)



B. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE GÉNERO Y ESPECIE DE LA COLONIA (CEPA)

La identificación se realiza siguiendo las pautas:

- ♦ **Análisis Macroscópico:** Por el aspecto de la colonia podemos saber si se trata de una levadura o de un hongo miceliar o filamentoso.

Los caracteres macroscópicos de la colonia que presentan interés taxonómico son:

- ❖ Colonias en agar Sabouraud.
- ❖ Superficie densamente aterciopelada.
- ❖ Micelio vegetativo (blanco, con presencia de textura algodonosa blanca alrededor de la colonia); reverso de la placa es color blanco - crema, no presenta exudación.
- ❖ Micelio aéreo (verde – amarillo, crecimiento del velamen).

◆ **Análisis Microscópico.**

Para Hongos Miceliales: Las preparaciones para la observación microscópica se montan normalmente utilizando los siguientes elementos:

- KOH (hidróxido de Potasio) al 40% como agente de montaje.
- Asa microbiológica como instrumento de recojo de la muestra.

Técnica del Cubre – objetos

- ✓ La placa de cultivo se abre sobre la mesa.
- ✓ Con el asa microbiológica se recoge la muestra que va a ser depositada sobre la lámina porta objetos.
- ✓ Se adiciona una gota de KOH al 40% sobre la lámina porta objetos que contiene la muestra.
- ✓ Se coloca una lámina cubreobjetos sobre la preparación y se deja en reposo por 5 minutos.
- ✓ Se observa la preparación en el microscopio a distintos aumentos (4X, 10X y 40X).

Figura 12: Vista microscópica con aumento 10X que muestra una hifa reproductiva

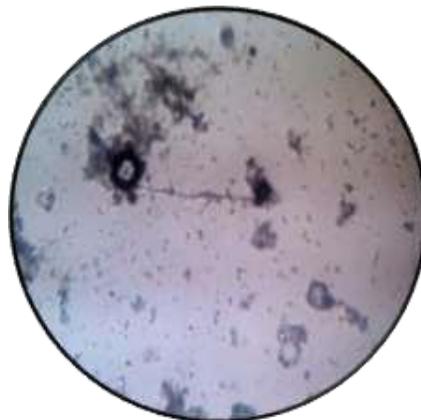


Figura 13: Vista microscópica con aumento 40X que muestra una hifa reproductiva con su respectivo esporangio

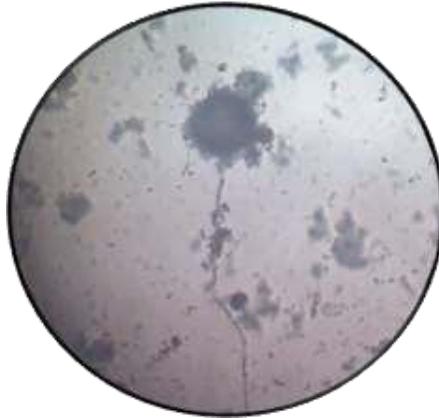


Figura 14: Vista microscópica con aumento 40X que muestra una hifa reproductiva con ausencia de septos



Figura 15: Vista microscópica con aumento 4X que muestra hifas entrelazadas con ausencia de septos

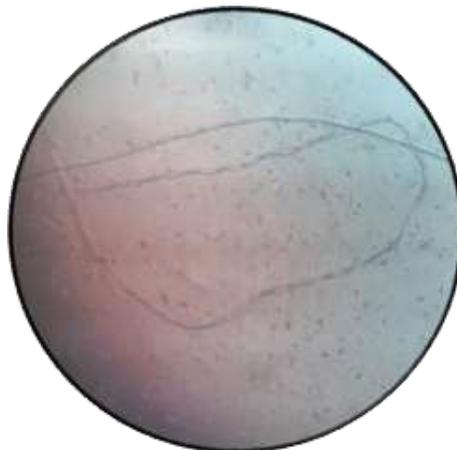
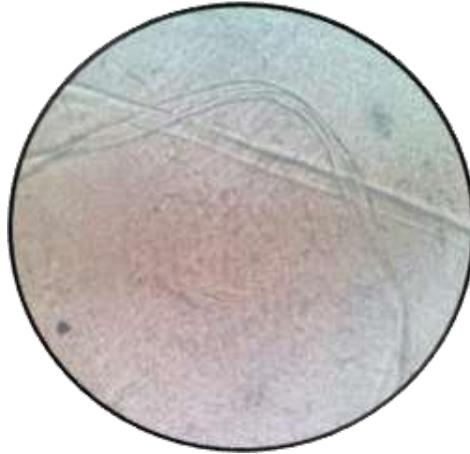


Figura 16: Vista microscópica con aumento 40X que muestra hifas entrelazadas con presencia de núcleo



CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE LA CEPA AISLADA

Figura 17: Clasificación Científica

DOMINIO	Eukaryota
REINO	Fungi
PHYLUM	Ascomycota
CLASE	Eurotiomycetes
ORDEN	Eurotiales
FAMILIA	Trichocomaceae
GENERO	Aspergillus
ESPECIE	Oryzae

Fuente: Elaboración Propia

Figura 18: Placa con presencia de micelio aéreo (esporas de moho *Aspergillus oryzae*)



C. AISLAMIENTO SECUNDARIO DE COLONIAS DE *Aspergillus Oryzae*

PROCEDIMIENTO:

- Posterior a la identificación de la cepa por el bioensayo y con la técnica del cubre – objetos con KOH, se procederá a anotar las características morfológicas de la colonia a nivel de microscopio.
- Se empleará como medio de cultivo (medio sólido) Agar Sabouraud en una nueva placa.
- Añadir 15 – 20 ml del medio previamente diluido (Agar Sabouraud), dejar solidificar por 20min.
- Tomar la placa inicial y realizar un repique en el medio sólido, teniendo cuidado de escoger la colonia más completa y uniforme, por medio de asadas (aprox. 10^2 UFC), al azar a través de toques en la nueva placa.
- Se procede a la esterilización del asa microbiológica y posteriormente al flameo de la placa.
- Se realiza el repique manteniendo la placa inicial (donde se encuentra el moho) por la parte posterior del mechero encendido y, con ayuda de una asa microbiológica se realizan las asadas, con la finalidad de recoger la cantidad suficiente de la cepa.

- Se flamea la placa que contiene el medio sólido nuevo, abriendo lentamente la placa se procede a realizar el repique a través de la técnica “por toques” con el asa cargada de la cepa, se repite tantas veces hasta que la superficie del medio sólido quede cubierto con la cantidad suficiente de la cepa.
- Finalmente se cierra y flamea la placa, luego se esteriliza el asa.
- Llevar a incubación la placa a 37°C por 72 – 96 horas para su observación.
- Expresar el resultado como unidades formadoras de colonias UFC/g de alimento.

Figura 19: Micelio aéreo de colonias en Agar Sabouraud (aislamiento de la cepa identificada)



Figura 20: Siembra secundaria (repique) de la colonia en Agar Sabouraud (aislamiento de la cepa identificada)



Figura 21: Siembra secundaria por toques en Agar Sabouraud para aislamiento de la cepa



Figura 22: Micelio vegetativo de colonia aislada



Figura 23: Comparación de placas: superior (arroz cocido, micelio aéreo); inferior (micelio vegetativo de colonias aisladas)

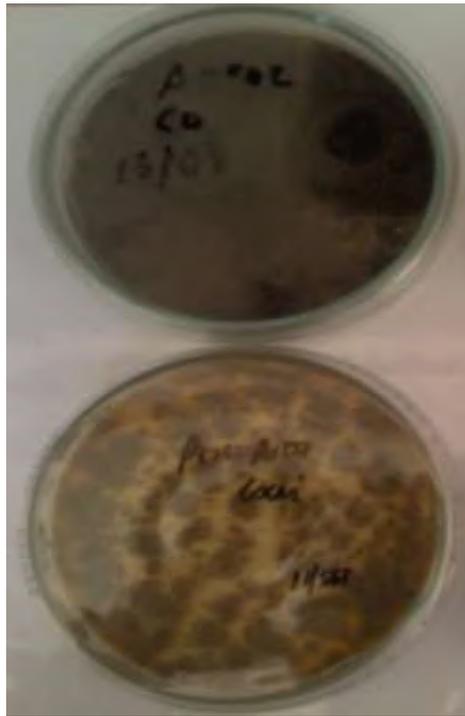
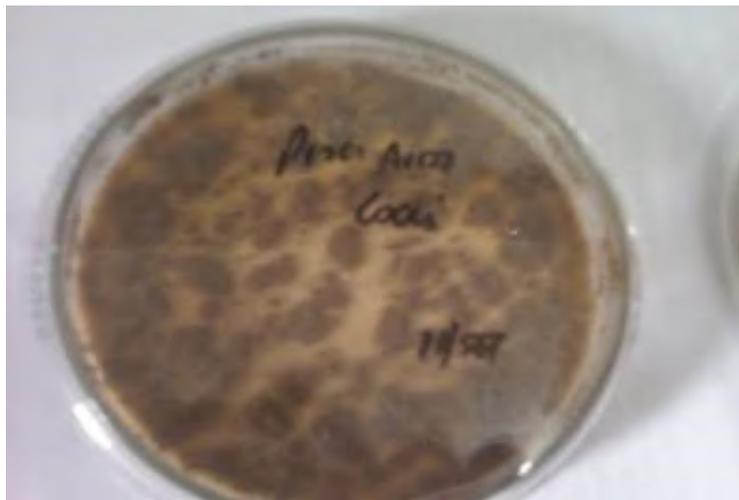
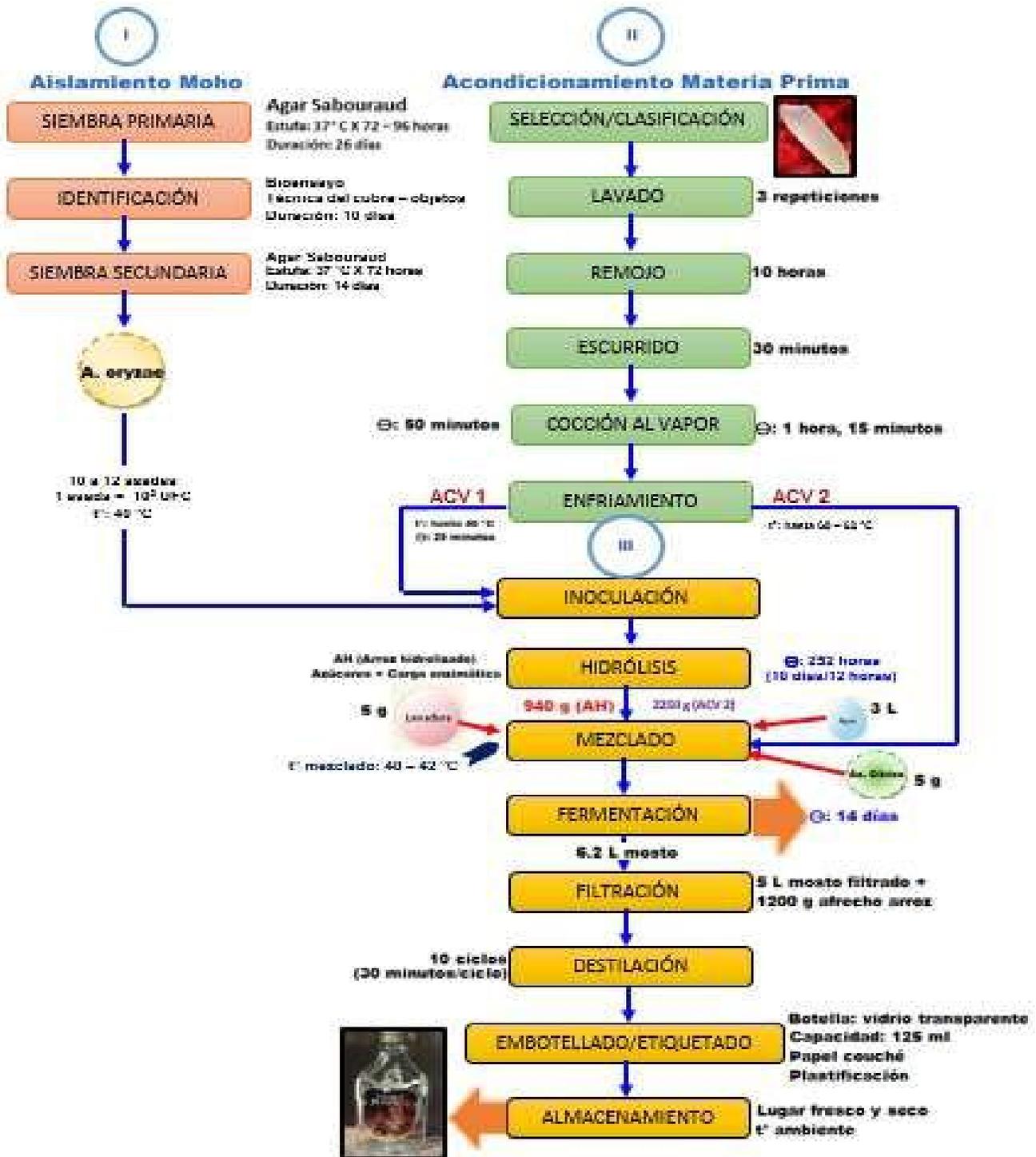


Figura 24: Micelio aéreo de colonias aisladas



3.2.4.2. Metodología del Proceso

DIAGRAMA 2: OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL *Aspergillus oryzae* (CEPA NATIVA) CON ACCIÓN SIMULTÁNEA DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) SOBRE ARROZ COCIDO AL VAPOR



Fuente: Elaboración Propia

**METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA POR
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL *Aspergillus oryzae* (CEPA NATIVA) CON
ACCIÓN SIMULTÁNEA DE *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) SOBRE
ARROZ COCIDO AL VAPOR**

1. ACONDICIONAMIENTO DE MATERIA PRIMA

❖ **ANÁLISIS FÍSICO DEL ARROZ**

Se analizó 100 gr del arroz escogido para el proceso y se separó las impurezas que este tenía como granos oscuros, rojos y rotos para que no altere de ninguna manera al producto final.

❖ **ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ARROZ**

No se realizó porque la materia prima iba a ser sometida a un tratamiento de cocción el cual elimina microorganismos patógenos de la materia prima.

a. Selección

Se escogieron debidamente los granos rotos, oscuros y se separaron las impurezas de la materia prima.



b. Lavado

Se lavó 3 veces para quitar residuos de almidón o polvo. Entonces se cubrieron los granos de arroz con agua para prepararlos para el siguiente proceso.



c. Remojo

Se dejó el arroz en remojo por 10 horas con la finalidad de que los granos se hidraten completamente y ablanden su estructura.



d. Ecurrido

Pasadas las 10 horas de remojo se elimina el agua y se deja escurrir por espacio de 30 minutos.



e. Cocción al Vapor

Los 500 g de materia prima (580 g después de escurrido) se sometieron a cocción al vapor sobre un colador cubierto para evitar pérdida de calor y por debajo del mismo hay vapor generado por el agua caliente, obteniéndose 750 g de arroz cocido al vapor (ACV 1); lo mismo se realizó para la segunda cocción al vapor, empleándose 1500 g de materia prima (1590 g después de escurrido), obteniéndose 2250 g de (ACV 2). Los tiempos de cocción para ACV 1 y ACV 2 fueron de 50 minutos y 1 hora con 15 minutos respectivamente.

La cocción al vapor genera dextrinización (facilita la hidrólisis).



f. Enfriamiento

El arroz cocido al vapor es retirado de la fuente de calor para ser enfriado hasta una temperatura aproximada de 40 °C por espacio de 25 minutos, debidamente tapado evitando que se contamine.



2. INOCULACIÓN DEL MOHO

Luego de enfriar el arroz, este es colocado en un recipiente térmico de plástico en el cual se va a inocular el moho identificado que producirá la sacarificación; la etapa de inoculación se realiza a una temperatura de 40°C.

Se inoculó de 10 a 12 asadas (1 asada = 10^2 UFC).



3. HIDRÓLISIS (SACARIFICACIÓN)

Después de 2 días de inocular o sembrar el moho sobre el arroz se evidencia el crecimiento de velamen blanco sobre la superficie del arroz (inicio de micelio vegetativo), posteriormente la masa inoculada tiene que mezclarse completamente a diario para evitar que el moho llegue a desarrollar un velamen verde, que significa el máximo desarrollo del moho (micelio aéreo: etapa reproductiva, esporas). Esto se llevó a cabo durante 10 días con 12 horas desde la inoculación del moho alcanzando un pH de 4.35 y un Brix = 45%.



4. MEZCLADO

- Se adicionó 5 g de ácido cítrico en 2.5 L de agua.
- A la solución anterior adicionar el arroz hidrolizado obtenido (940 g) y remover completamente.
- Después de 30 minutos agregar la masa de arroz cocido al vapor (ACV 2) que ha sido enfriado hasta una temperatura de 60 – 62°C, a la solución anterior y homogenizar completamente.
- Se completaron 500 ml de agua a la mezcla anterior.
- Se realizó la activación de la levadura, tomando un volumen de 20 ml de la mezcla anterior y calentando entre 40 a 42°C, se adicionaron los 5 g de levadura a los 20 ml de mosto extraído, se dejó en reposo por unos minutos para activar la levadura, esto se adicionó al mosto agitando hasta homogenizar completamente la mezcla.



5. FERMENTACIÓN

Las enzimas amilolíticas actúan mejor a un pH entre 4 – 5.

Se adicionan al bioreactor los ingredientes: agua, ácido cítrico, arroz hidrolizado. La mezcla debe estar a un pH inicial de 4.5, se verifica de que a un pH de 4.7 las enzimas amilolíticas actúan mejor, debido a que el ácido cítrico adicionado producirá una mejor acción de la enzima sobre el arroz cocido al vapor, seguidamente se adiciona la masa de arroz cocido al vapor (ACV 2) enfiada hasta una temperatura de 62 °C. Con todo esto la levadura tendrá suficiente sustrato para iniciar la reacción de fermentación. El tiempo de fermentación fue de 14 días.

(Cuarto día fermentación)



(Décimo cuarto día fermentación)



6. FILTRACIÓN

Se llevó a cabo usando como material para filtrar (tocuyo), filtrando un total de 6.2 L de mosto; se obtuvo 5 L de mosto filtrado y 1200 g de afrecho de arroz.



7. DESTILACIÓN

Se realizaron 10 ciclos de destilación recogiendo 850 ml de bebida alcohólica al 55% de volumen en alcohol de un total de 5 L de mosto filtrado (bebida alcohólica filtrada).



8. EMBOTELLADO/ETIQUETADO

Se esterilizó y desinfectó adecuadamente una botella de vidrio transparente con capacidad de 125 ml para su posterior embotellado y etiquetado; en la cara frontal y tapa de la botella (nombre de la bebida), cara posterior (descripción de la bebida). La etiqueta ha sido elaborada en papel couché seguido de un proceso de plastificación.



9. ALMACENAMIENTO

Nuestra bebida alcohólica fue almacenada en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente.

3.2.4.3. Métodos Físicos

A. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.013.

Cuadro N° 1: Características Organolépticas

ASPECTO	AROMA	SABOR	COLOR
Líquido cristalino, sin partículas en suspensión, ni sedimentos	Característico, libre de olores extraños	Característico, libre de sabores extraños	Incoloro

Fuente: Elaboración Propia

B. DENSIDAD. Método por Picnometría según AOAC.

- En primer término es necesario conocer el peso del picnómetro vacío, luego el peso del mismo con agua destilada así como también el peso con la muestra.
- El peso obtenido del picnómetro con agua y con la muestra quitar el peso del picnómetro vacío obteniéndose así el peso del agua y muestra respectivamente.
- La densidad se obtiene por la relación siguiente:

$$D_m = \frac{P_m - P_p}{P_a - P_p} (d_a)$$

Donde:

D_m = densidad de la muestra (g/ml)

P_m = peso del picnómetro con muestra en (g)

P_a = peso del picnómetro con agua destilada (g)

P_p = peso del picnómetro vacío (g)

d_a = densidad del agua (1 g/ml)

$$D_m = \frac{40.39 - 17.14}{41.96 - 17.14} \left(\frac{1g}{ml} \right)$$

$$D_m = 0.93674 \text{ g/ml}$$

C. GRADO ALCOHÓLICO EN °GL. Según Norma Técnica Peruana INDECOPÍ 211.005.

- Se tomaron aproximadamente 150 ml de la muestra, se dejaron enfriar hasta 10 °C durante 30 minutos en un frasco plástico bien tapado.
- Luego se depositó la bebida alcohólica en una probeta de 100 ml completamente seca y se introdujo el alcoholímetro controlando la temperatura hasta que llegue a los 20 °C, momento en el cual se tomó la lectura que marcaba el alcoholímetro. Se efectuaron por lo menos tres lecturas.

Grado alcohólico del mosto filtrado: 16%Vol.Alc.

Grado alcohólico de bebida alcohólica "Diablo Blanco"

°GL = 55% Vol. Alc.

D. RENDIMIENTO DE BEBIDA ALCOHÓLICA. Según fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Volumen del destilado}}{\text{Volumen del mosto}} \times 100$$

$$\%R = \frac{850 \text{ ml}}{5000 \text{ ml}} \times 100$$

%R = 17%

3.2.4.4. Métodos Químicos

A. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y AZÚCARES TOTALES

Estandarización de la Solución de Fehling:

1. Colocar 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B en una fiola de 250 ml. Añadir 20 ml de agua destilada (por duplicado).
2. En una bureta de 50 ml colocar la solución de glucosa al 0.5%. Dejar caer desde la bureta solución de glucosa y lleve a ebullición. Dejar calentar durante 2 minutos.
3. Continuar agregando pequeñas cantidades de solución de glucosa y calentar después de cada adición hasta que observe un precipitado rojo indicando el término de la titulación.
4. Tomar en cuenta el volumen de solución de glucosa gastado en la titulación final y calcule el título del licor de Fehling expresado en mg de glucosa anhidra.

Cálculos:

$$f = (\text{ml de sol. glucosa}/10\text{ml sol. Fehling}) * (0.5 \text{ sol. glucosa}/100\text{ml sol. glucosa}) * (1000\text{mg glucosa}/1\text{g glucosa})$$

Para los siguientes experimentos se necesitará el valor del título del licor de Fehling (1), para ello calcular un valor promedio con los valores obtenidos.

CALCULANDO FACTOR

$$f = [(\text{ml solución Gasto}) * (\% \text{ solución Glucosa}) * (10 \text{ ml solución Fehling})] / 1000$$

$$G_1 = 4.0\text{ml sol. glucosa}$$

$$G_2 = 4.7\text{ml sol. glucosa}$$

$$f_1 = (4.0\text{ml sol. glucosa}/10\text{ml sol. Fehling}) * (0.5\text{g glucosa}/100\text{ml sol. glucosa}) * (1000\text{mg glucosa}/1\text{g glucosa}) = 2\text{mg glucosa/ml sol. Fehling}$$

$$f_2 = (4.7\text{ml sol. glucosa}/10\text{ml sol. Fehling}) * (0.5\text{g glucosa}/100\text{ml sol. glucosa}) * (1000\text{mg glucosa}/1\text{g glucosa}) = 2.35\text{mg glucosa/ml sol. Fehling}$$

$$f = 2.175\text{mg glucosa/ml sol. Fehling}$$

Determinación de Azúcares Reductores:

1. Colocar en una bureta la solución problema.
2. Colocar en una fiola de 250 ml, 5 ml de la solución de Fehling A y 5 ml de solución de Fehling B, agregar 20 ml de agua destilada (hacerlo por duplicado).
3. Llevar a ebullición y vierta rápidamente la solución problema, con la ayuda de la bureta. A medida que la coloración (azul) cúprica se debilita, indica que la titulación está llegando a su fin. Continuar la titulación hasta que se observe un cambio de coloración azul a rojo ladrillo.
4. Anotar el volumen de la muestra problema consumido en la titulación.

$$\text{Cálculo: \%A.R.} = (f/\text{vol. Solución gastados}) * 100$$

▪ %AZÚCARES REDUCTORES (ARROZ COCIDO AL VAPOR)

$$G_1 = 50\text{ml sol. muestra}$$

$$G_2 = 48.5\text{ml sol. muestra}$$

$$\%AR_1 = (2.175\text{mg glucosa}/50\text{ml sol. muestra}) * 100\text{ml sol. muestra} = 4.35\% = 4.35\text{mg glucosa}/100\text{ml sol. muestra} = 4.35 \text{ g/L}$$

$$\%AR_2 = (2.175\text{mg glucosa}/48.5\text{ml sol. muestra}) * 100\text{ml sol. muestra} = 4.48\% = 4.4835\text{mg glucosa}/100\text{ml sol. muestra} = 4.48 \text{ g/L}$$

$$\%AR = 4.415\text{mg glucosa}/100\text{ml sol. muestra}$$

▪ **%AZÚCARES REDUCTORES (ARROZ HIDROLIZADO)**

$G_1 = 19.6$ ml sol. muestra

$G_2 = 19$ ml sol. muestra

$\%AR_1 = (2.175 \text{ mg glucosa} / 19.6 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 11.10\%$
 $= 11.10 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$

$\%AR_2 = (2.175 \text{ mg glucosa} / 19 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 11.45\%$
 $= 11.45 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml muestra}$

$\%AR = 11.28 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$

Determinación de Azúcares Totales:

1. Medir 50 ml de la solución problema con una pipeta y colocarlos en un matraz aforado de 100 ml.
2. Añadir 5 ml de HCL 1:1 y caliente a 70 °C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
3. Neutralizar con NaOH usando fenolftaleína como indicador.
4. Completar el volumen a 100 ml con agua.
5. Filtrar y determinar los azúcares totales, siguiendo los paso del 1 al 4 del experimento anterior.

Cálculo: $\%A.T. = (f/vol. Solución gastados) * 100$

Cálculos Típicos:

- Para el título del licor de Fehling:

Si 10 ml de licor de Fehling reaccionan por completo con 10 ml de solución de glucosa al 0.5%; el título de la solución de Fehling es de 50 mg de glucosa.

Si se gasta 11 ml de solución azucarada, el título de su solución será 55 mg de glucosa. Si el título del licor de Fehling es diferente debe ajustar los cálculos al título real.

▪ **%AZÚCARES TOTALES (ARROZ COCIDO AL VAPOR)**

$G_1 = 22$ ml sol. muestra

$G_2 = 20.9$ ml sol. muestra

$\%AT_1 = (2.175 \text{ mg glucosa} / 22 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 9.89\%$
 $= 9.89 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$

$\%AT_2 = (2.175 \text{ mg glucosa} / 20.9 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 10.41\%$
 $= 10.41 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$

$\%AT = 10.15 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$

▪ **%AZÚCARES TOTALES (ARROZ HIDROLIZADO)**

G₁ = 6.2 ml sol. muestra

G₂ = 6.0 ml sol. muestra

$$\begin{aligned} \%AT_1 &= (2.175 \text{ mg glucosa} / 6.2 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 35.08\% \\ &= 35.08 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \%AT_2 &= (2.175 \text{ mg glucosa} / 6.0 \text{ ml sol. muestra}) * 100 \text{ ml sol. muestra} = 36.25\% \\ &= 36.25 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra} \end{aligned}$$

$$\%AT = 35.67 \text{ mg glucosa} / 100 \text{ ml sol. muestra}$$

B. ACIDEZ TOTAL. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 211.002

- Se colocaron 25ml de muestra en un matraz de 200ml, se agregaron 4 gotas de solución de fenolftaleína 1%.
- Se tituló la acidez en la solución de NaOH 0,1N hasta la aparición de un color rosado persistente. (ESTO SE HIZO POR DUPLICADO).
- Se anotaron los ml gastados y se realizaron los cálculos, la acidez total se expresó en ácido acético en g/L.

$$AT = \frac{G \times N(\text{NaOH}) \times PE}{V_m}$$

Donde:

AT = acidez total, como ácido acético en g/L

G₁ = gasto de volumen 1 de NaOH (0.3ml)

G₂ = gasto de volumen 2 de NaOH (0.3ml)

N = normalidad de la solución de NaOH (Eq/L)

PE = peso equivalente del ácido acético (60g/Eq)

V_m = volumen de la muestra (ml)

$$AT_1 = \frac{(0.3 \text{ ml} \times 0.1 \text{ Eq/L} \times 60 \text{ g/Eq})}{25 \text{ ml}}$$

Conversión de unidades: 1L = 1000ml

1g = 1000mg

$$AT_1 = \frac{(0.0003 \cancel{\text{L}} \times 0.1 \cancel{\text{Eq/L}} \times 60 \cancel{\text{g/Eq}})}{0.025 \text{ L}}$$

$$AT_1 = 0.072 \text{ g/L}$$

$$\begin{array}{l} 0.072\text{g} \text{ --- --- --- } 1000\text{ml} \\ x \text{ --- --- --- } 100\text{ml} \end{array}$$

$$x = \frac{0.0072\cancel{\text{g}} \left(\frac{1000\cancel{\text{mg}}}{1\cancel{\text{g}}} \right)}{100\text{ml}}$$

AT1 = 7.2mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro

$$AT2 = \frac{(0.3\text{ml} \times 0.1\text{Eq/L} \times 60\text{g/Eq})}{25\text{ml}}$$

$$AT2 = \frac{(0.0003\cancel{\text{L}} \times 0.1\cancel{\text{Eq/L}} \times 60\cancel{\text{g/Eq}})}{0.025\text{L}}$$

$$AT2 = 0.072\text{g/L}$$

$$\begin{array}{l} 0.072\text{g} \text{ --- --- --- } 1000\text{ml} \\ x \text{ --- --- --- } 100\text{ml} \end{array}$$

$$x = \frac{0.0072\cancel{\text{g}} \left(\frac{1000\cancel{\text{mg}}}{1\cancel{\text{g}}} \right)}{100\text{ml}}$$

AT2 = 7.2mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro

AT promedio = 7.2mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro

C. ACIDEZ VOLÁTIL. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.017

- Se midieron 110ml de la muestra, colocándose en un balón de destilación de 500ml, que se llevó al equipo de destilación conectándose al tubo refrigerante, se instalaron las mangueras de agua (una para la entrada de agua y otra para la salida).
- Se colocó un mechero cerca para calentar la muestra y que por destilación se desprendan los ácidos volátiles presentes, se recibió el destilado en un Erlenmeyer de 250ml (aprox. hasta 100 ml).
- Se tituló el destilado con NaOH 0,1N hasta la aparición de un color rosado claro (antes de titular se agregó 3 a 5 gotas de fenolftaleína al 1%).
- Se realizaron los cálculos respectivos, la acidez volátil se expresa en ácido acético en g/100ml de alcohol anhidro.

$$AV = \frac{G \times N(\text{NaOH}) \times PE}{V_m}$$

Donde:

AV = acidez volátil, como ácido acético en g/L

G1 = gasto de volumen 1 de NaOH (0.6ml)

G2 = gasto de volumen 2 de NaOH (0.6ml)

N = normalidad de la solución de NaOH (Eq/L)

PE = peso equivalente del ácido acético (60g/Eq)

Vm = volumen de la muestra destilada (ml)

$$AV1 = \frac{(0.6\text{ml} \times 0.1\text{Eq/L} \times 60\text{g/Eq})}{100\text{ml}}$$

$$AV1 = \frac{(0.0006\cancel{\text{L}} \times 0.1\cancel{\text{Eq/L}} \times 60\text{g/Eq})}{0.1\text{L}}$$

$$AV1 = 0.036\text{g/L}$$

$$0.036\text{g} \text{ --- } 1000\text{ml}$$

$$x \text{ --- } 100\text{ml}$$

$$x = \frac{0.0036\cancel{\text{g}}}{100\text{ml}} \left(\frac{1000\text{mg}}{1\cancel{\text{g}}} \right)$$

AV1 = 3.6mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro

$$AV2 = \frac{(0.6\text{ml} \times 0.1\text{Eq/L} \times 60\text{g/Eq})}{100\text{ml}}$$

$$AV2 = \frac{(0.0006\cancel{\text{L}} \times 0.1\cancel{\text{Eq/L}} \times 60\text{g/Eq})}{0.1\text{L}}$$

$$AV2 = 0.036\text{g/L}$$

$$0.036\text{g} \text{ --- } 1000\text{ml}$$

$$x \text{ --- } 100\text{ml}$$

$$x = \frac{0.0036\cancel{\text{g}}}{100\text{ml}} \left(\frac{1000\text{mg}}{1\cancel{\text{g}}} \right)$$

AV2 = 3.6mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro

AV promedio = 3.6mg Ac. acético/100 ml alcohol anhidro

Despejando Acidez Fija (AF):

$$AF = AT - AV$$

Donde:

AF = acidez fija (mg Ac. Acético/100 ml alcohol anhidro)

AT = acidez total (mg Ac. Acético/100 ml alcohol anhidro)

AV = acidez volátil (mg Ac. Acético/100 ml alcohol anhidro)

Reemplazando:

$$AF = 7.2 - 3.6 \text{ mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro}$$

$$AF = 3.6 \text{ mg Ac. acético/100ml alcohol anhidro}$$

D. METANOL EN BEBIDA ALCOHÓLICA. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.002

❖ **Preparación de la Curva Estándar:**

1. Medir 0,2 ml de metanol puro y colocarlos en una fiola de 1 L y aforar con alcohol etílico al 5.5% y tratarlos de la misma forma que a la muestra.
2. Hacer lo mismo que en el paso 1 para 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml de metanol puro.

❖ **Preparación del Blanco:**

- Usar como blanco alcohol etílico a 5.5% tratado de forma similar a la muestra.

❖ **Preparación de la Muestra:**

- Medir 2 ml de solución de KMnO_4 0,1 N y colocarlos en una fiola de 50 ml y dejarlo en baño con hielo.
- Adicionar 1 ml de la muestra helada y dejar reposar 30 minutos en baño de hielo.
- Agregar una pequeña cantidad de bisulfito de sodio hasta decolorar.
- Añadir 1 ml de solución de ácido cromotrópico al 5%.
- Añadir 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%) lentamente por las paredes y mantener la fiola en baño de hielo por 3 minutos.

- Colocar la fiola en baño María a 60 °C por 15 minutos y enrasar con agua destilada, mezclar bien, enfriar y leer a 575 nm.

NOTA:

- **Ácido Cromotrópico al 5%:**

- Pesar 5 g de Ácido cromotrópico y colocarlos en una fiola de 100 ml, aforar con agua destilada.

- **Alcohol Etílico al 5.5%:**

- Medir 5.5 ml de Alcohol Etílico Absoluto Anhidro y colocarlos en una fiola de 100 ml y aforar con agua destilada (preparación del blanco).
- Para la preparación de la curva estándar; medir 55 ml de Alcohol Etílico Absoluto Anhidro, colocarlos en un fiola de 1 L y aforar con agua destilada (repetir este paso 5 veces).

Cálculos:

❖ $V1 = 0.2 \text{ ml metanol} \times (1 \text{ L}/1000 \text{ ml}) = 0.0002 \text{ L}$

Calculando la cantidad de metanol en gramos (densidad metanol 790g/L)

$$\begin{array}{r} 790 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ L} \\ X \text{ ----- } 0.0002 \text{ L} \end{array}$$

$$X = 158 \text{ mg/L}$$

❖ $V2 = 0.4 \text{ ml metanol} \times (1 \text{ L}/1000 \text{ ml}) = 0.0004 \text{ L}$

Calculando la cantidad de metanol en gramos (densidad metanol 790g/L)

$$\begin{array}{r} 790 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ L} \\ X \text{ ----- } 0.0004 \text{ L} \end{array}$$

$$X = 316 \text{ mg/L}$$

❖ $V3 = 0.6 \text{ ml metanol} \times (1 \text{ L}/1000 \text{ ml}) = 0.0006 \text{ L}$

Calculando la cantidad de metanol en gramos (densidad metanol 790g/L)

$$\begin{array}{l} 790 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ L} \\ X \text{ ----- } 0.0006 \text{ L} \end{array}$$

$X = 474 \text{ mg/L}$

❖ $V4 = 0.8 \text{ ml metanol} \times (1 \text{ L}/1000 \text{ ml}) = 0.0008 \text{ L}$

Calculando la cantidad de metanol en gramos (densidad metanol 790g/L)

$$\begin{array}{l} 790 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ L} \\ X \text{ ----- } 0.0008 \text{ L} \end{array}$$

$X = 632 \text{ mg/L}$

❖ $V5 = 1 \text{ ml metanol} \times (1 \text{ L}/1000 \text{ ml}) = 0.001 \text{ L}$

Calculando la cantidad de metanol en gramos (densidad metanol 790g/L)

$$\begin{array}{l} 790 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ L} \\ X \text{ ----- } 0.001 \text{ L} \end{array}$$

$X = 790 \text{ mg/L}$

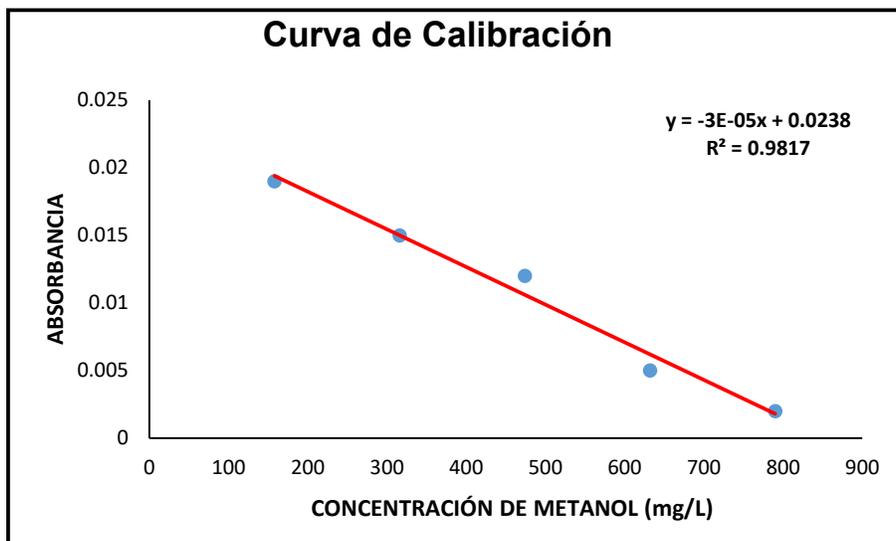
✓ **CURVA DE CALIBRACIÓN**

Cuadro N° 2: Curva de Calibración

Concentración de Metanol (mg/L)	ABSORBANCIA $\lambda = 575\text{nm}$
158	0.019
316	0.015
474	0.012
632	0.005
790	0.002

Fuente: Elaboración Propia

Gráfica N° 1: Curva de Calibración (Absorbancia Vs. Concentración de Metanol)



Fuente: Elaboración Propia

✓ **LECTURA DE ABSORBANCIA DEL BLANCO:**

A=0.004

Restando la lectura de absorbancia del blanco, a cada valor de absorbancias obtenidas para las diferentes concentraciones de metanol, empleados para elaborar la curva estándar.

Cuadro N° 3: Absorbancia de Metanol para la Curva Estándar – Absorbancia del Blanco

Concentración de Metanol (mg/L)	(Abs. Metanol – Abs. Blanco) $\lambda = 575\text{nm}$
158	0.015
316	0.011
474	0.008
632	0.001
790	-0.002

Fuente: Elaboración Propia

Reemplazando la absorbancia de la muestra en la ecuación de la recta de la curva estándar para obtener P:

$$y = -3 \times 10^{-5}x + 0.0198$$

Donde:

y = Absorbancia de la muestra

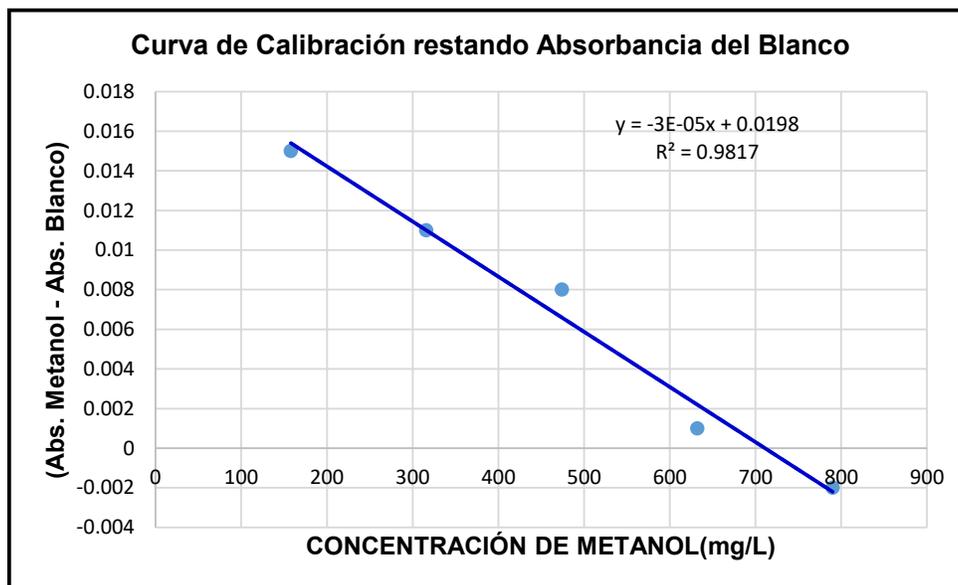
La bebida alcohólica al 55% (muestra), tiene una absorbancia de 0.008, restándole el blanco sería 0.004

Cuadro N° 4: Absorbancia de la Muestra – Absorbancia del Blanco

ABSORBANCIA MUESTRA	ABSORBANCIA BLANCO	ABS.MUESTRA – ABS. BLANCO
0.008	0.004	y = 0.004

Fuente: Elaboración Propia

Gráfica N° 2: Curva de Calibración restando Absorbancia del Blanco



Fuente: Elaboración Propia

Reemplazando:

$$0.004 - 0.0198 / -3 \times 10^{-5} = x$$

$$x = 526.67 \text{ mg/L}$$

$$\rightarrow \mathbf{P} = 526.67 \text{ mg/L}$$

$$\mathbf{M} = \mathbf{P} \times 10^{-3} \times \mathbf{D}$$

Donde:

M = metanol en mg/L

P = mg/L leídos en la curva estándar de la muestra

D = Factor de dilución de la muestra

$$\mathbf{M} = (526.67) \times (10^{-3}) \times (1/50)$$

$$\mathbf{M} = 0.010533 \text{ g/L}$$

$$0.010533 \text{ g} \text{ ----- } 1000 \text{ ml}$$

$$X \text{ ----- } 100 \text{ ml}$$

$$X = 1.0533 \times 10^{-3} \text{ g} / 100 \text{ ml} \times (1000 \text{ mg} / 1 \text{ g})$$

$$M = 1.0533 \text{ mg metanol} / 100 \text{ ml alcohol anhidro}$$

Interpretación:

- La pendiente de la curva de calibración es negativa, debido a que la relación entre sus variables presentan una relación inversa; es decir que: a mayor absorbancia, hay menor concentración metanol y a menor absorbancia, existe mayor concentración de metanol.
- El coeficiente de correlación R^2 es 0.9817, significa que mientras más próximo al valor 1, existe mayor correlación entre ambas variables.
- La mejor curva de calibración (curva estándar) es la generada por la resta de la absorbancia del blanco a las diferentes concentraciones de metanol empleadas para elaborar la curva estándar. Esto es debido a que puede haber presencia de algunas sustancias diferentes a metanol en la curva estándar y al restar la absorbancia del blanco, obtenemos las absorbancias reales de metanol.

E. ÉSTERES. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.020

- Se colocaron 50ml de muestra en un balón de 300ml.
- Se agregaron 4 gotas de la solución de fenolftaleína 1%.
- Se neutralizó exactamente la acidez con la solución de NaOH 0,1N.
- Se agregó un exceso de 20 ml de NaOH 0,1N.
- Se hirvió con un refrigerante de flujo en baño María por 30 minutos.
- Se dejó enfriar con el refrigerante colocado.
- Se agregaron 20 ml de solución de ác. Sulfúrico 0,1N.
- Se valoró el exceso de ácido con la solución de NaOH 0,1N.
- Se anotaron los ml gastados y se realizaron los cálculos para la fórmula:

$$E = N \times 0.176$$

Donde:

E = esteres expresados como acetato de etilo en g/L

N1 = mililitros de NaOH empleados en la valoración del exceso de ácido (0.2ml).

N2 = mililitros de NaOH empleados en la valoración del exceso de ácido (0.1ml).

0,176 = factor de conversión del acetato de etilo.

Reemplazando

$$E1 = 0.2 \times 0.176$$

$$E1 = 0.0352\text{g/L}$$

$$\begin{array}{l} 0.0352 \text{ g} \text{ --- } 1000 \text{ ml} \\ x \text{ --- } 100 \text{ ml} \end{array}$$

$$x = \frac{0.00352\cancel{\text{g}} \left(\frac{1000\text{mg}}{1\cancel{\text{g}}} \right)}{100\text{ml}}$$

E1 = 3.52mg Acetato de etilo/100ml alcohol anhidro

$$E2 = 0.1 \times 0.176$$

$$E2 = 0.0176\text{g/L}$$

$$\begin{array}{l} 0.0176 \text{ g} \text{ --- } 1000 \text{ ml} \\ x \text{ --- } 100 \text{ ml} \end{array}$$

$$x = \frac{0.00176\cancel{\text{g}} \left(\frac{1000\text{mg}}{1\cancel{\text{g}}} \right)}{100\text{ml}}$$

E2 = 1.76 mg Acetato de etilo/100ml alcohol anhidro

E promedio = 2.64mg Acetato de etilo/100ml alcohol anhidro

F. ALDEHÍDOS. Según Norma Técnica Peruana INDECOPI 210.020.

- Se determinó el grado alcohólico de la muestra (55°GL) en un matraz de 500ml de capacidad, se colocaron 200ml de muestra y se agregó 35ml de agua destilada y unas perlas de vidrio.
- Se destiló lentamente, y se recibió el destilado en un matraz aforado de 200ml hasta que llegara cerca de la marca.
- Se transfirió el destilado medido a un matraz aforado de 500ml.
- Se agrega 25ml de bisulfito de sodio 0,05N, se deja 30 minutos, agitándosele ocasionalmente.
- Se adiciona solución de Iodo 0,05N hasta que el color de la muestra que se observa es anaranjado, agregándole 1ml en exceso.
- Se procede inmediatamente a titular la muestra con tiosulfato de sodio 0,05N.
- Se realiza de modo similar una prueba en blanco utilizando agua destilada.

Cálculo de Resultados:

$$A = \frac{V \times N \times 22 \times 100}{M} \times \frac{100}{G. A. R.}$$

Donde:

A = aldehídos expresados en mg de acetaldehído por 100ml de alcohol anhidro

V = diferencia de volúmenes de tiosulfato en las titulaciones

N = normalidad de la solución de tiosulfato en las titulaciones

22 = m.eq. de acetaldehído expresado en mg

G. A. R.= grado alcohólico real de la muestra en escala Gay-Lussac

M = ml de la muestra utilizada

Reemplazando:

$$A = \frac{(5\text{ml} - 3\text{ml}) \times (0.05\text{Eq}) \times 22\text{mg/Eq} \times 100}{200\text{ml}} \times \frac{100}{55\text{ml}}$$

$$A = \frac{(2\cancel{\text{ml}}) \times (0.05\cancel{\text{Eq}}) \times 22\text{mg/}\cancel{\text{Eq}} \times 100}{200\cancel{\text{ml}}} \times \frac{100}{55\text{ml}}$$

$$A = 2 \text{ mg acetaldehído/100ml alcohol anhidro}$$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

➤ SIEMBRA PRIMARIA :

Cuadro N° 5: Siembra Primaria (26 días a 35-37 °C en estufa)

DURACIÓN	°T
26 días	35 – 37 °C

Fuente: Elaboración Propia

Cuadro N° 6: Características Macroscópicas y Microscópicas de la colonia

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
Superficie densamente aterciopelada	Conidióforos de paredes rugosas, hialinos
Borde irregular	Conidióforos : de pared rugosa , vesículas globosas con masa de esporas en forma de columna o radiada, en algunas cabezas las fiálides nacen directamente de la superficie de la vesícula y en otras nacen métulas
De tamaño mediano	Vesículas subglobosas, 40-80 µm de diámetro
Micelio vegetativo (velamen blanco), presencia de textura algodonosa blanca. Reverso de la placa es color blanco-crema, no presenta exudación	Las fiálides a menudo crecen sobre las vesículas o sobre las métulas midiendo 10-15 µm x 3-5 µm, métulas 8-12 µm x 4-5 µm
Micelio aéreo (amarillo verdoso) y mínima presencia de velamen blanco alrededor de la colonia	Conidios globosos a subglobosos 3.5-4 µm de color verde

Fuente: Manual de clave determinativa de las especies del género Aspergillus

Cuadro N° 7: Resultados de Cámara cuenta colonias en arroz cocido al vapor

SEGÚN: ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods)	
Menor a 30 colonias	(APTO)
Entre 30-300	(175 UFC/g; CONTABLE, APTO)
Mayor a 300	(INCONTABLE, NO APTO)

Fuente: Elaboración Propia

Figuras 25 y 26: Recuento de colonias en placas en Cámara cuenta colonias



Fuente: Elaboración Propia

➤ **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA:**

Duración: 10 días con 12 horas.

Análisis fisicoquímicos: pH, Brix, azúcares reductores (%AR), azúcares totales (%AT).

Otras pruebas: Análisis sensorial.

Cuadro N° 8: Resultados de pH y °Brix de la hidrólisis enzimática del arroz

Tiempo (horas)	T°	pH	Lectura Brix	Factor dil.	Brix correg.	Brix Muestra directa
0 horas (ACV)	28.2	7.14	0	5	0	0
60 horas	28.4	6.58	3	5	15	18
84 horas	28.3	6.11	4	5	20	21
132 horas	28.6	5.89	5	5	25	29
156 horas	28.2	5.65	6	5	30	32
180 horas	28.3	4.96	6.6	5	33	36
252 horas	28.2	4.35	8.8	5	44	45

Fuente: Elaboración Propia

Cuadro N° 9: Resultados de análisis de Azúcares Reductores y Azúcares Totales por el método Fehling

MUESTRA	%AR	%AT
ARROZ COCIDO AL VAPOR (2.05g)	4.415 mg glucosa/100ml sol. muestra	10.15 mg glucosa/100ml sol. muestra
ARROZ HIDROLIZADO (2.11g)	11.28 mg glucosa/100ml sol. muestra	35.67 mg glucosa/100ml sol. muestra

Fuente: Elaboración Propia

Cuadro N° 10: Resultados de Análisis Sensoriales

Tiempo	T°	Olor	Sabor	Color	Aspecto	Observación
0 horas	40°C	caract. arroz, sin olor residual	caract. arroz, sin sabor	blanco - cremoso	granos enteros y graneados	La inoculación se llevó a cabo a 40 °C
60 horas	33°C	Ligeramente ácido, residual afrutado	ligeramente dulce	blanco - cremoso	presencia velamen blanco en superficie de los granos	algunos granos tienen presencia de humedad, se homogenizaron los granos
84 horas	33°C	olor afrutado	dulce	blanco - cremoso	presencia de líquido lechoso en algunos granos	consistencia pastosa
132 horas	32°C	olor ligeramente a sillao	dulce sin residual ácido	blanco - cremoso	Semi pastoso	se removieron los granos homogenizando la pasta
156 horas	32°C	característico a sillao	incrementa acidez, disminuye el sabor dulce	blanco - cremoso	pastoso	presencia de un líquido ligeramente amarillo
180 horas	32°C	característico a sillao	incrementa sabor dulce, la intensidad de la acidez se mantiene	blanco - cremoso	muy pastoso (arroz con leche)	se percibe un olor a fermentado (alcohol)
228 horas	31°C	característico a sillao	incremento sabor dulce	blanco - cremoso	consistencia semi-batida	la mayoría de granos están digeridos o batidos
252 horas	30°C	característico a sillao	incremento de sabor dulce y ácido	blanco - cremoso	Batido (digerido)	olor intenso a alcohol

Fuente: Elaboración Propia

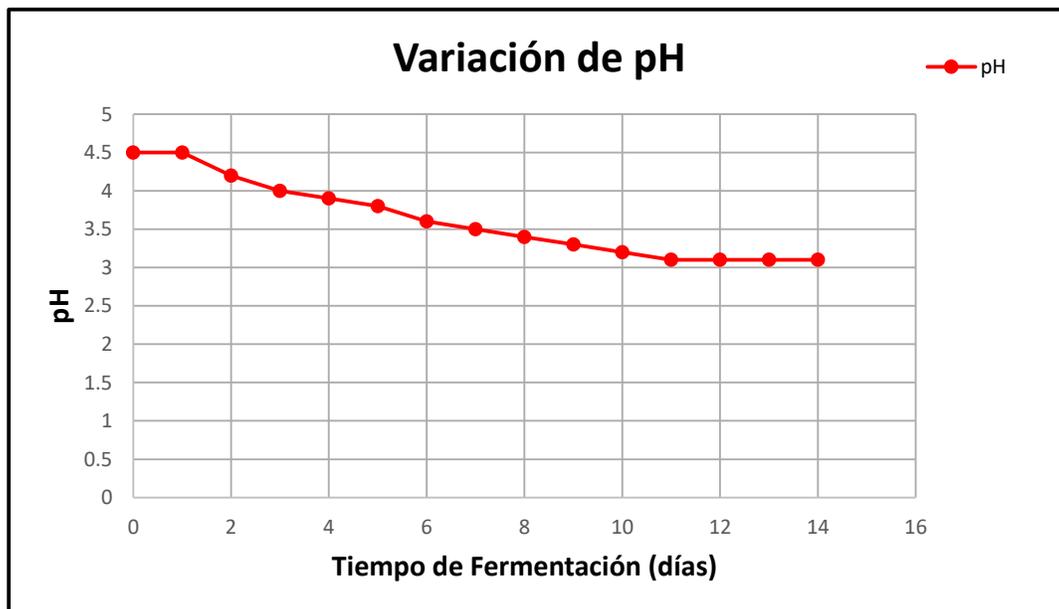
➤ **FERMENTACIÓN:**

Cuadro N° 11: Resultados de Sólidos Solubles y pH en Fermentación Alcohólica

FERMENACIÓN DEL MOSTO		
Día	pH	Brix
0	4.5	13
1	4.5	13
2	4.2	11.8
3	4.0	10.3
4	3.9	9.8
5	3.8	8.6
6	3.6	8.2
7	3.5	7.8
8	3.4	6.8
9	3.3	5.9
10	3.2	5.2
11	3.1	4.7
12	3.1	4.0
13	3.1	4.0
14	3.1	4.0

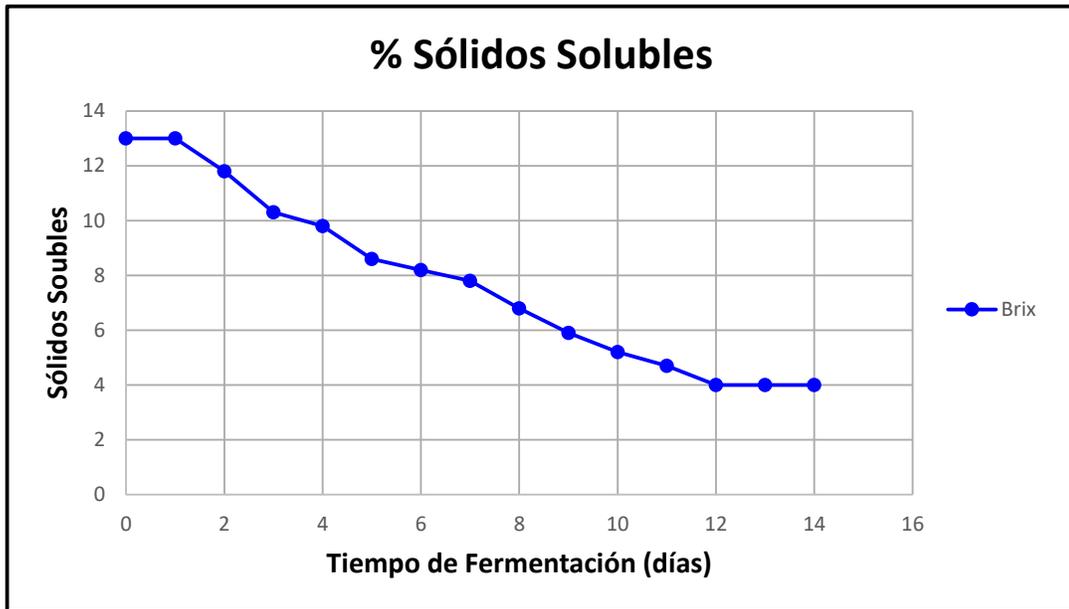
Fuente: Elaboración Propia

Gráfica N° 3: Variación de pH durante la Fermentación Alcohólica



Fuente: Elaboración Propia

Gráfica N° 4: Variación de % Sólidos Solubles durante la Fermentación Alcohólica



Fuente: Elaboración Propia

➤ DESTILACIÓN:

Cuadro N° 12: Resultados de la Destilación

CICLOS	VOLUMEN DE MOSTO FILTRADO	VOLUMEN DE BEBIDA ALCOHÓLICA DESTILADA
1	500 ml	85 ml
2	500 ml	80 ml
3	500 ml	85 ml
4	500 ml	90 ml
5	500 ml	90 ml
6	500 ml	90 ml
7	500 ml	85 ml
8	500 ml	85 ml
9	500 ml	80 ml
10	500 ml	80 ml

Fuente: Elaboración Propia

➤ **CONTENIDO DE ALCOHOL:** Se obtuvo una bebida alcohólica con 55% de volumen en alcohol.

➤ **ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL PRODUCTO TERMINADO:**

Cuadro N° 13: Resumen de resultados Físicoquímicos del Producto Terminado

RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS	
DENSIDAD: Método por picnometría	Dm=0.93674 g/ml
GRADO ALCOHÓLICO	°GL = 55% (55ml de alcohol en 100ml de bebida alcohólica)
ACIDEZ TOTAL	%AT = 7.2%
METANOL	%M = 1.0533%
ÉSTERES	%E = 2.64%
ACIDEZ VOLÁTIL	%AV = 3.6%
ALDEHÍDOS	%A = 2%

Fuente: Elaboración Propia

CAPÍTULO V

DISCUSIONES

- Durante el desarrollo de la parte experimental de esta investigación; se aplicó el método Fehling para determinar azúcares reductores y azúcares totales en arroz cocido al vapor y arroz hidrolizado obteniéndose los siguientes resultados: ACV = 4.415% (AR) y 10.15% (AT); AH = 11.28% (AR) y 35.67% (AT), la presencia de estos azúcares se debe a la hidrólisis; es decir las enzimas liquefactoras actúan licuando el almidón generando una ruptura de enlaces glucosídicos con la generación de glucosa y con la formación de agua observándose una ganancia de peso de la masa de arroz.
- Lo citado en la página 20 (inoculación del moho) fundamentado teóricamente por García (2010), quien afirma lo siguiente: “El sake se produce a partir del grano del arroz; pero a diferencia de otras bebidas producidas por fermentación, las enzimas que rompen las moléculas del almidón y lo transforman en azúcares fermentables, se encuentran en el moho *Aspergillus oryzae*, ninguna de las otras levaduras puede degradarlo. Este proceso, también llamado sacarificación, es llevado a cabo por dos enzimas: la α -amilasa (enzima liquefactora), y la glucoamilasa (enzima Deshidrogenasa)”. Confirmándose lo dicho por la autora, mediante los análisis fisicoquímicos como azúcares reductores, azúcares totales y sólidos solubles.
- En **la gráfica N°3**, podemos observar cuantitativamente que la variación de pH en la fermentación alcohólica muestra un descenso de 3.5 hasta el día 7, continúa bajando el pH a 3.2 al décimo día y termina la fermentación con un pH de 3.1 el día 14, lo cual fue controlado para evitar la acidificación del mosto y con respecto al porcentaje de sólidos solubles en la fermentación (**gráfica N°4**); se observa un descenso rápido hasta el día 12 de la fermentación alcohólica, terminando con un de 4% de sólidos el día 14, lo cual según Benavides y Pozo (2008) en su trabajo de investigación llamado “ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA DESTILADA (Vodka) A PARTIR DE TRES VARIETADES DE PAPA (*Solanum tuberosum*) UTILIZANDO DOS TIPOS DE ENZIMAS”, los datos de pH y porcentaje de sólidos solubles obtenidos se encuentran dentro del rango de 3.02 – 4.5 y 3.45% – 14% respectivamente.

- Algunos autores consultados como García 2010, dan mayor énfasis al grado alcohólico del sake destilado que se encuentra entre un rango de 45 - 65 °GL, además lo compara con una bebida alcohólica destilada como el whisky y no precisamente con el vino; ya que su grado alcohólico es aproximado al del sake filtrado: entre 17 – 20 °GL. Por lo cual, con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación y según la autora encontramos que el grado alcohólico de la bebida obtenida (55 °GL), se encuentra dentro del rango establecido para una bebida alcohólica destilada.
- Los análisis fisicoquímicos realizados a la bebida alcohólica (tomando cabeza y cuerpo del destilado), como densidad, acidez total, metanol, ésteres, aldehídos y acidez volátil fueron comparados con los requisitos establecidos para bebidas alcohólicas destiladas (Vodka) según la Norma Técnica Peruana (NTP 211.013 – 2004/revisada el 2014), debido a que la materia prima empleada en ambas bebidas alcohólicas son cereales y son destiladas. Obteniéndose resultados que se encuentran dentro de los requisitos establecidos por la Norma Técnica, excepto para acidez total; ello es debido a que para la obtención de la bebida alcohólica se debió descartar la cabeza del destilado tomando únicamente el cuerpo del mismo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una bebida alcohólica destilada con 55 °GL, por hidrólisis enzimática del *Aspergillus Oryzae* (cepa nativa) con acción simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) sobre arroz cocido al vapor.
- La técnica del cubre – objetos con KOH al 40% confirmó taxonómicamente al compararse con el “Manual de claves determinativa de las especies del género *Aspergillus*” que el microorganismo usado en la parte experimental del trabajo perteneció al género *Aspergillus* y a la especie *oryzae*. El bioensayo (prueba cualitativa) permitió determinar la capacidad del microorganismo para hidrolizar y fermentar los azúcares presentes en los caldos.
- La bebida alcohólica presentó un rendimiento del 17% tomando las dos partes del destilado (cabeza y cuerpo).
- Durante la cocción al vapor (ACV 1 y ACV 2), se observó que los parámetros adecuados de temperatura y tiempo para la cocción al vapor del arroz no superaban los 100°C (65 – 70 °C del vapor de cocción); esta etapa se llevó a cabo por un periodo de 50 minutos y 1 hora con 15 minutos respectivamente, esto facilitó la hidrólisis generando dextrinización en el almidón del arroz.
- La bebida alcohólica destilada a base de arroz (“Diablo Blanco”) cumplió con la mayoría de los requisitos fisicoquímicos y sensoriales de la Norma Técnica Peruana: NTP 211.013.2004 (BEBIDAS ALCOHÓLICAS-Vodka/2004 – revisada el 2014); siendo de mayor relevancia el análisis de metanol, cuyos niveles en nuestra bebida alcohólica estuvieron por debajo de los niveles establecidos por la Norma Técnica Peruana para Vodka, en el caso de la acidez total, no cumplió con la Norma, elevándose ligeramente el parámetro debido a que se tomó la cabeza del destilado; en cuanto a las propiedades organolépticas, cumplió con los parámetros establecidos por la Norma.
- Se logró establecer la hidrólisis enzimática por *Aspergillus oryzae* sobre arroz cocido al vapor y la fermentación como los procesos biotecnológicos para la obtención de una bebida alcohólica.

RECOMENDACIONES

- Esta investigación recomienda que el repique (siembra secundaria) y la inoculación de la cepa en el arroz cocido al vapor sea lo más cuidadosa posible, garantizando la esterilidad de los materiales de laboratorio y posible contaminación por otros microorganismos.
- Es recomendable que desde la aparición de velamen blanco (micelio vegetativo) se mezcle completamente a diario la masa de arroz cocido al vapor, permitiendo que las enzimas del moho actúen completamente sobre el arroz.
- En la etapa de fermentación se recomienda utilizar agua potable para bajar los costos de producción.
- Después de la filtración se recomienda dejar reposar el mosto por al menos siete días con el propósito de concentrar más los olores y sabores característicos del producto que permite mejorar las características organolépticas en la bebida.
- Se sugiere descartar el 5% del destilado total (inicio de destilación) que forma parte de la “cabeza” del destilado con la finalidad de eliminar la posible presencia de metanol.
- Se recomienda evitar recoger las cabezas del destilado durante el proceso, debido a la presencia de sustancias tóxicas en esta fracción del destilado y también porque afectaría el resultado de los análisis fisicoquímicos, en especial los resultados de acidez total y metanol.
- Se recomienda evitar recoger las colas del destilado durante el proceso, debido a que esto afecta el color (transparencia) y demás características organolépticas; así como también el grado alcohólico de la bebida.
- Se recomienda destinar los residuos obtenidos en la etapa de filtración a la alimentación de aves de corral.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*, 4ta. Ed. México. Editorial Pearson Educación de México S.A. 81, 83, 84, 321, 323 pp.
- Bautista, L. (1997). *Purificación de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* por Adsorción*. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería química, Carrera de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, España. 4,5, 10, 15, 16 pp.
- Benavides, I. y Pozo, M. (2008). *Elaboración de una bebida alcohólica destilada (Vodka) a partir de tres variedades de papa (*Solanum Tuberosum*) utilizando dos tipos de enzimas*. Tesis para optar por el Título de Ingeniera Agroindustrial, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Técnica del Norte, Ibarra – Ecuador. 76, 78 pp.
- Bernal, L. y Martínez E. (2006). *Una nueva visión de la Degradación del Almidón*. Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle. México. Vol. 7 (25): 79, 80, 82
- Betancourt, A. (2003). *Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por Fermentación en cultivo Líquido*. Tesis para optar por el Título de Ingeniera Química, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Carrera de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 27 – 32 pp.
- Carretero, F. (2008). *Innovación Tecnológica en la Industria de Bebidas y Procesos de Fabricación de Bebidas Alcohólicas*. Tesis para optar por el Título de Ingeniero de Producción Agroindustrial, Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial, Carrera de Ingeniería de Producción Agroindustrial de la Universidad de la Sabana, Bogotá, D.C. 3, 5 pp.
- García, G. (2010). *Elaboración de Sake o Vino de Arroz, por medio de la fermentación con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* y arroz Ecuatoriano*. Tesis para la obtención del título de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Carrera de Ingeniería de alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito – Ecuador. 1 – 3, 1,14, 15, 24,31 pp.

- Garzón, S. y Hernández, C. (2009). *Estudio Comparativo para la producción de Etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Tesis para la obtención del Título de Química Industrial, Facultad de Tecnologías, Escuela de Tecnología Química, Carrera de Química Industrial de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira – Colombia. 41 – 43, 48 – 50pp.
- Gómez, J. “Clave determinativa de las especies del género *Aspergillus*”.
- Guadarrama, A., Orozco, J. y Morales, M. (2007). *Obtención de α -amilasa a Partir de Aspergillus oryzae*. Tesis para la optar por el título de Ingeniero Químico, Facultad de Química, Carrera de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México. 1 pp.
- Linden, G. (1996). *Bioquímica Agroindustrial: Revalorización Alimentaria de la Producción Agrícola*, 4ta. Ed. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA. 10,19 pp.
- Medin, R. y Medin, S. (2003). *ALIMENTOS: Introducción, Técnica y Seguridad*, 2° Ed. Buenos Aires, Argentina. Ediciones Turísticas de Mario Banchik. 307 – 308 pp.
- Ramírez, G. y Pedroza, J. (2010). *Desarrollo de una Fermentación Alcohólica a pH Regulado y Temperatura de 25 °C en el Biorreactor Bioflo 3000 M1227 y Estudio Inicial de Fermentaciones en Sistema Continuo*. Tesis para optar por el título de Ingeniero de Producción Agroindustrial, Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial, Carrera de Ingeniería de Producción Agroindustrial de la Universidad de la Sabana, Bogotá, D.C. 8-9 pp.
- Ullman, F. (1954). *Enciclopedia de Química Industrial*. Tomo IV. Barcelona: Gustavo Gill, 10 pp.
- Vásquez, H. y Dacosta, O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. Ingeniería. Investigación y Tecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. Vol. 8 (4): 252
- Viniegra, G. (2003). “*Producción de Enzimas por Aspergillus*”. Revista Mexicana de Biotecnología, México. Vol. 8 (2): 3, 8 pp.

RECURSOS DE INTERNET

PEREL, Y. (2013). *Cultivo de Aspergillus oryzae*. Recuperado el 26 de marzo del 2015 de <http://www.blog.naturaleza.eldietista.es/2013/06/cultivo-de-aspergillus-oryzae.html>

Análisis de Bebidas Alcohólicas. Recuperado el 28 de enero del 2015 de <http://chemistrypage.galeon.com>

(2012). *Proceso de fabricación de Amilasa de microorganismos*. Recuperado el 22 de junio del 2015 de <http://s1.downloadmienphi.net/file/downloadfile9/222/1331339.pdf>

Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá). (2009). *Aspergillus*. Recuperado el 15 de octubre del 2014 de <http://www.telmeds.org/atlas/micologia/hongos-contaminantes/aspergillus-2>

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

MÉTODO MICROBIOLÓGICO (IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DEL MOHO)

ANEXO N° 1: MATERIALES PARA LA IDENTIFICACION MICROSCÓPICA DEL MOHO *Aspergillus oryzae*



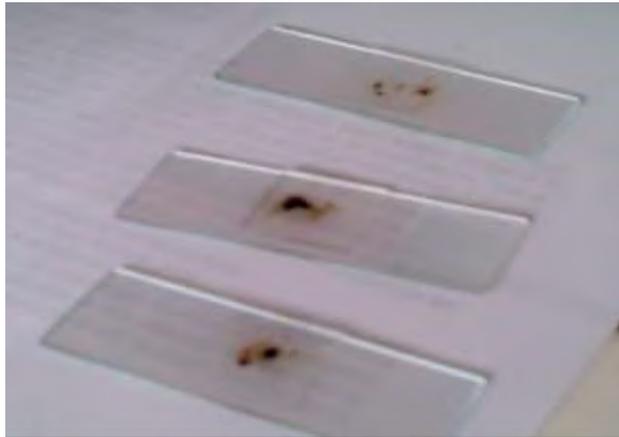
ANEXO N° 2: ADICIÓN DE MUESTRA SOBRE LÁMINA PORTA OBJETOS



ANEXO N° 3: ADICIÓN DE KOH AL 40% SOBRE LA MUESTRA



ANEXO N° 4: COLOCACIÓN DE LÁMINA CUBRE OBJETOS SOBRE LA MUESTRA ACONDICIONADA



ANEXO N° 5: VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA



“BIOENSAYO”

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA – DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE CARBOHIDRATOS

Objetivo: Determinar presencia de metabolismo anaeróbico de degradación del moho aislado para comprobar evidencia de fermentación, usando caldos: Hipersacarosado, Maltosa, Lactosa, Sabouraud y Nutritivo.

Procedimiento:

1. Lavar los frascos con abundante agua y detergente
2. Esterilizar los frascos a 120°C/20min en autoclave.
3. Dejar enfriar los frascos
4. Distribuir los caldos aproximadamente 200 ml por cada frasco
5. Realizar 2 asadas de cada placa y sembrar en los frascos conteniendo los caldos

COMPOSICIÓN CALDO HIPERSACAROSADO

Extracto de levadura 0.5 g

Triptona 1 g

Citrato de sodio 0.1 g

Glucosa 0.5 g

Gelatina 0.2 g

Sacarosa 10 g

Agua destilada 100ml

pH: 7.2

COMPOSICIÓN CALDO MALTOSA

Peptona 1 g

Maltosa 1g

NaCl 0.5g

Extracto de carne 0.3 g

Rojo de fenol 0.002 g

Agua destilada 100 ml

pH: 7 – 7.2

COMPOSICIÓN CALDO LACTOSA

Lactosa 1.2 g

NaCl 0.5 g

Extracto de carne 0.3g

Agua destilada 100 ml

Rojo neutro (sol. acuosa)

pH: 7.0

COMPOSICIÓN CALDO SABOURAUD

Peptona 1g

Glucosa 1g

Agua destilada 100 ml

Ajustar pH: 6 – 6.2

COMPOSICIÓN CALDO NUTRITIVO

Triptona 1g

Triptosa 1g

NaCl 0.5 g

Extracto de carne 0.3 g

Agua destilada 100 ml

pH: 7

✓ BIOENSAYO

El Bioensayo se llevó a cabo durante aproximadamente (10 días), con la finalidad de verificar la degradación de carbohidratos y la identificación bioquímica de la cepa del moho aislada en caldos que contenían soluciones de carbohidratos.

Se inoculó por duplicado la cepa *Aspergillus oryzae*, para verificar cualitativamente la degradación del sustrato en los medios propuestos (caldos).

ANEXO N° 6: INICIO DE BIOENSAYO

(CALDO HIPERSACAROSADO) pH=7.2	(CALDO MALTOSA) pH=7.2	(CALDO NUTRITIVO) pH=7.0	(CALDO LACTOSA) pH=7.0	(CALDO SABOURAUD) pH=6.2
1a (cepa de A. oryzae)	2a (cepa de A. oryzae)	3a (cepa de A. oryzae)	4a (cepa de A. oryzae)	4b (cepa de A. oryzae)
1b (cepa de A. oryzae)	2b (cepa de A. oryzae)		5a (cepa de A. oryzae)	

Fuente: Elaboración Propia

**ANEXO N° 7: TERCER DIA
DE BIOENSAYO**

MUESTRA	T °C	pH
C.HIPERSACAROSADO		
1a (cepa de A. oryzae)	23.1	7.15
1b (cepa de A. oryzae)	23	6.76
C.MALTOSA		
2a (cepa de A. oryzae)	23.1	7.00
2b (cepa de A. oryzae)	22.9	6.93
C.NUTRITIVO		
3a (INCREMENTO DE BIOMASA)	--	--
C.LACTOSA		
4a (cepa de A. oryzae)	23.1	7.20
5a (cepa de A. oryzae)	22.8	7.25
C.SABOURAUD		
4b (cepa de A. oryzae)	23.0	6.03

Fuente: Elaboración Propia

**ANEXO N° 8: FINAL DE
BIOENSAYO**

MUESTRA	T °C	pH
C.HIPERSACAROSADO		
1a (cepa de A. oryzae)	23	6.96
1b (cepa de A. oryzae)	22.8	5.37
C.MALTOSA		
2a (cepa de A. oryzae)	22.9	6.27
2b (cepa de A. oryzae)	23.1	6.10
C.NUTRITIVO		
3a (INCREMENTO DE BIOMASA)	--	--
C.LACTOSA		
4a (cepa de A. oryzae)	23.0	7.25
5a (cepa de A. oryzae)	22.9	7.25
C.SABOURAUD		
4b (cepa de A. oryzae)	22.9	5.51

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO N° 9: ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN BIOENSAYO

ATRIBUTO MEDIO DE CULTIVO	COLOR / OBSERVACIÓN			OLOR / OBSERVACIÓN		
	D ₀	D.I.	D.F	D ₀	D.I	D.F
C. HIPERSACAROSADO	1a. Ámbar	Anaranjado, turbidez, formación de película superficial	Ligeramente marrón; incremento turbidez, sedimentos, espuma	Característico a azúcar de caña	Olor a chicha (evidencia de fermentación)	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)
	1b. Ámbar	Anaranjado; turbidez, formación de película superficial	Ligeramente marrón; incremento turbidez, sedimentos, espuma	Característico a azúcar de caña	Olor a chicha (evidencia de fermentación)	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)
C. MALTOSA	2a. Rojo	Anaranjado rojizo; presenta turbidez y sedimentos	Anaranjado rojizo; mayor presencia sedimentos, formación de espuma	Característico a cebada malteada	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)	Olor muy intenso a chicha (evidencia de fermentación)
	2b. Rojo	Anaranjado; presenta turbidez y formación sedimentos	Anaranjado; mayor presencia sedimentos, formación de espuma	Característico a cebada malteada	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)	Olor muy intenso a chicha (evidencia de fermentación)
C. LACTOSA	4a. Rojo intenso	Rojo; turbidez, muy pocos sedimentos	Rojo; mayor turbidez, formación de espuma	Ligeramente a leche	Casi sin cambio de olor	Casi sin cambio de olor
	5a. Rojo intenso	Rojo; turbidez, muy pocos sedimentos	Rojo; mayor turbidez, formación de espuma	Ligeramente a leche	Casi sin cambio de olor	Casi sin cambio de olor
C. SABOURAUD	4b. Amarillo	Amarillo; presenta turbidez y sedimentos, espuma	Amarillo; incremento turbidez, sedimentos, espuma	Ligeramente a algas	Olor a chicha (evidencia de fermentación)	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)
C. NUTRITIVO	3a. Amarillo	Amarillo oscuro, turbidez y sedimentos	Amarillo ligeramente oscuro; incremento turbidez, sedimentos y espuma	Ligeramente a algas	Ligeramente a chicha (evidencia de fermentación)	Olor intenso a chicha (evidencia de fermentación)

Fuente: Elaboración Propia

Leyenda:

D₀: Día de inicio de bioensayo (día 0).

D.I.: Día quinto de bioensayo (día 5).

D.F.: Día final de bioensayo (día 10).

ANEXO N° 10: DÍA DE INICIO DE BIOENSAYO



ANEXO N° 11: DÍA QUINTO DE BIOENSAYO

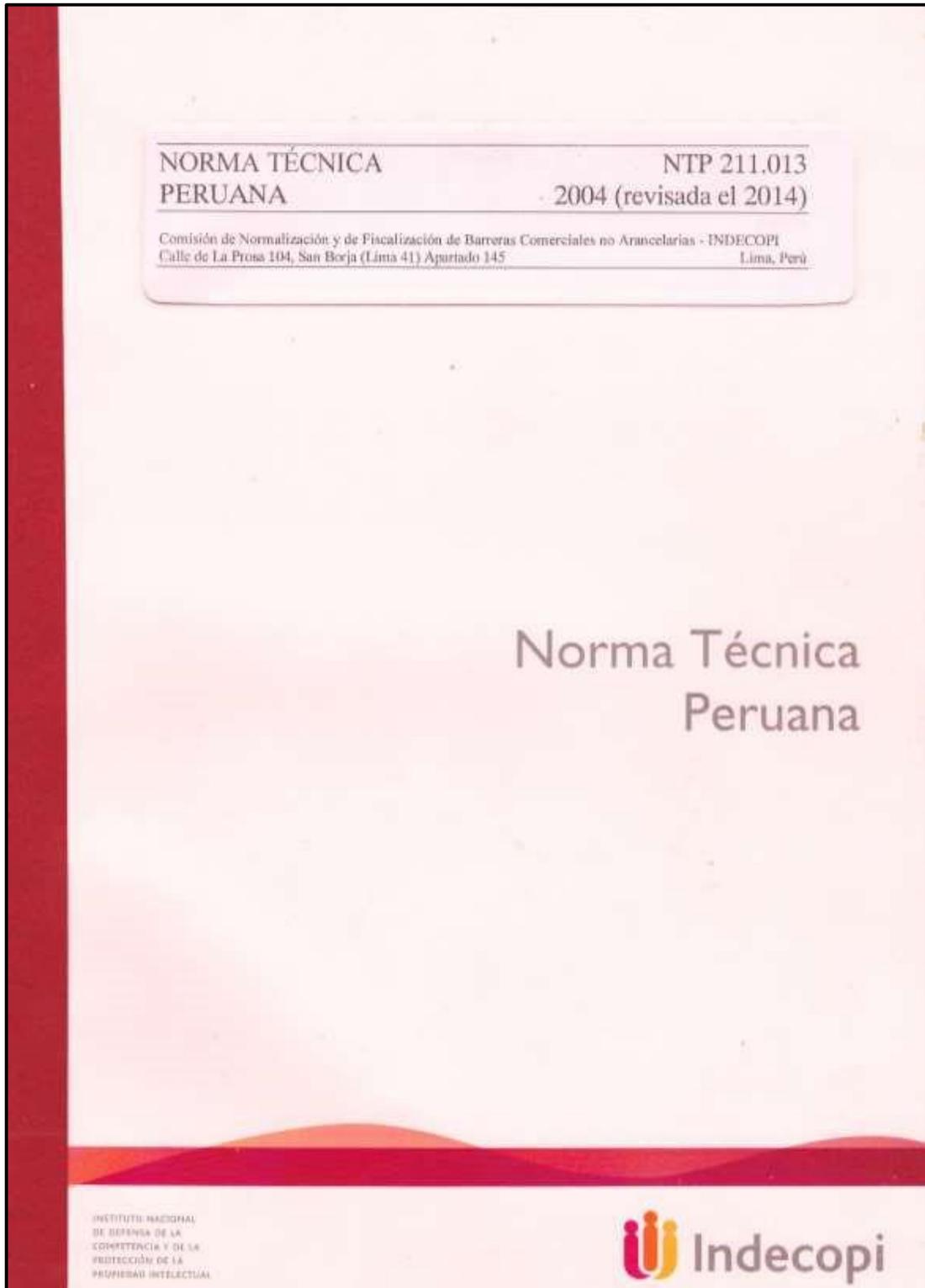


ANEXO N° 12: DÍA FINAL DE BIOENSAYO



NORMA TÉCNICA PERUANA - INDECOPI
NTP 211.013 2004 (revisada el 2014)

ANEXO N° 13



**NORMA TÉCNICA
PERUANA**

**NTP 211.013
2004 (revisada el 2014)**

Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias - INDECOPI
Calle de La Prosa 104, San Borja (Lima 41) Apartado 145 Lima, Perú

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Vodka. Requisitos

ALCOHOLIC BEVERAGES. Vodka. Requirements

2014-12-11
2ª Edición

R.0137-2014/CNB-INDECOPI. Publicada el 2014-12-28

Precio basado en 07 páginas

I.C.S.: 67.160.10; 71.080.60

ESTA NORMA ES RECOMENDABLE

Descriptor: Bebida alcohólica, vodka, requisito, especificación

© INDECOPI 2014

ANEXO N° 15

	ÍNDICE	página
	ÍNDICE	ii
	PRÓLOGO (de revisión 2014)	iii
	PREFACIO	v
1.	OBJETO	1
2.	REFERENCIAS NORMATIVAS	1
3.	CAMPO DE APLICACIÓN	3
4.	DEFINICIONES	3
5.	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	3
6.	REQUISITOS	4
7.	MUESTREO	5
8.	ROTULADO Y ENVASADO	6
9.	ANTECEDENTES	6

ANEXO N° 16

PRÓLOGO (de revisión 2014)

A.1 La Norma Técnica Peruana (NTP) NTP 211.013:2004 BEBIDAS ALCOHÓLICAS, Vodka, Requisitos, 2ª Edición, se encuentra incluida en el Plan de Revisión y Actualización de Normas Técnicas Peruanas que cumplieron 10 años de vigencia.

A.2 La NTP referida, aprobada mediante resolución N° 0123-2004/INDECOPI-CRT, por la Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales (CRT), fue sometida a consulta en el 2014 al Comité Técnico de Normalización (CTN) de Bebidas alcohólicas a fin de ratificar su vigencia.

A.3 El CTN de Bebidas alcohólicas recomendó mantener la vigencia de la NTP sin modificaciones y la comisión aprobó la versión revisada, el 11 de diciembre de 2014.

A.4 Los métodos de ensayo y de muestreo cambian periódicamente con el avance de la técnica. Por lo cual, recomendamos consultar en el Centro de Información y Documentación del Organismo de Normalización, la vigencia de los métodos de ensayo y de muestreo en esta NTP.

B. INSTITUCIONES QUE PARTICIPARON EN LA ELABORACIÓN DE LA NORMA TÉCNICA PERUANA

Secretaría	Sociedad Nacional de Industrias- Comité de la Industria de Bebidas Alcohólicas y Destilados
------------	---

Presidente	Mercedes Valdívía Barrera Cartavio Rum Company S.A.C.
------------	--

Secretaría	Carmen Chávez Juárez
------------	----------------------

PREFACIO

A. RESEÑA HISTÓRICA

A.1 La presente Norma Técnica Peruana fue elaborada por el Comité Técnico de Normalización de Bebidas Alcohólicas, mediante el Sistema 2 u Ordinario, durante los meses de mayo a julio del 2004, utilizando como antecedente a los que se indican en el capítulo correspondiente.

A.2 El Comité Técnico de Normalización de Bebidas Alcohólicas presentó a la Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales -CRT-, con fecha 2004-07-15, el PNT 211.013:2004, para su revisión y aprobación, siendo sometido a la etapa de Discusión Pública el 2004-09-13. No habiéndose presentado observaciones fue oficializado como Norma Técnica Peruana NTP 211.013:2004 BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Vodka. Requisitos, 2ª Edición, el 02 de diciembre de 2004.

A.3 Esta Norma Técnica Peruana reemplaza a la NTP 211.013:1995. La presente Norma Técnica Peruana ha sido estructurada de acuerdo a las Guías Peruanas GP 001:1995 y GP 002:1995.

B. INSTITUCIONES QUE PARTICIPARON EN LA ELABORACIÓN DE LA NORMA TÉCNICA PERUANA

Secretaría	Sociedad Nacional de Industrias- Comité de la Industria de Bebidas Alcohólicas y Destilados
Presidente	Mario Maggi Pacheco
Secretario	Luis Taipe Palacios

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Vodka. Requisitos**1. OBJETO**

Esta Norma Técnica Peruana establece las definiciones, requisitos, métodos de muestreo y análisis, rotulado y envasado, que debe cumplir la bebida alcohólica denominada vodka.

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Técnica Peruana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda Norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos en base a ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones recientes de las normas citadas seguidamente. El Organismo Peruano de Normalización posee, en todo momento, la información de las Normas Técnicas Peruanas en vigencia.

2.1 Normas Técnicas Peruanas

2.1.1	NTP 211.020:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Alcohol etílico. Definiciones
2.1.2	NTP 210.019:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Definiciones
2.1.3	NTP 210.001:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Extracción de muestras
2.1.4	NTP 211.004:2004	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de grado alcohólico volumétrico

ANEXO N° 19

NORMA TÉCNICA PERUANA	NTP 211.013 2 de 7
--------------------------	-----------------------

2.1.5	NTP 211.040:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de acidez
2.1.6	NTP 210.020:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de aldehídos totales
2.1.7	NTP 210.022:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de metanol
2.1.8	NTP 211.003:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de ésteres totales
2.1.9	NTP 210.021:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de alcoholes superiores
2.1.10	NTP 210.025:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de furfural
2.1.11	NTP 211.041:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de extracto seco total
2.1.12	NTP 211.035:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de metanol y de congéneres en bebidas alcohólicas y alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases
2.1.13	NTP 210.003:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de grado alcohólico volumétrico. Picnometría
2.1.14	NTP 211.007:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Alcohol etílico, Rectificado, Neutro (Rectificado fino), Extraneutro (Rectificado extrafino). Requisitos.

© INDECOPI 2014 – Todos los derechos son reservados

2.1.15 NTP 210.027:2004 BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Rotulado

2.2 Normas Metroológicas Peruanas

2.2.1 NMP 001:1995 PRODUCTOS ENVASADOS. Rotulado

2.2.2 NMP 002: 1995 PRODUCTOS ENVASADOS. Contenido neto

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Técnica Peruana se aplica en todas las actividades productivas y/o comerciales que involucren a la bebida alcohólica denominada vodka.

4. DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Técnica Peruana se aplican las definiciones dadas en las NTP 210.019 y NTP 211.020 y la siguiente:

4.1 vodka: Producto obtenido a partir de alcohol etílico rectificado bien por rectificación (alcohol etílico neutro o alcohol etílico extraneutro), bien por adsorción a través de carbón activado o bien por un tratamiento equivalente que tenga por efecto atenuar selectivamente los caracteres organolépticos inherentes a las materias primas empleadas, de manera que el producto no tenga rasgos distintivos de aroma, sabor u olor.

5. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Véase la NTP 211.020.

6. REQUISITOS

6.1 Disposiciones generales

6.1.1 El alcohol etílico empleado en la elaboración del vodka debe cumplir con los requisitos indicados en el capítulo 6 de la NTP 211.007.

6.1.2 Se puede utilizar aditivos alimentarios permitidos por el organismo de control correspondiente, para mejorar la palatabilidad del producto; no se permite el uso de edulcorantes artificiales para estos fines.

6.2 Requisitos del proceso tecnológico

Las fábricas para elaboración y/o envasado de vodka, deben cumplir con los dispositivos sanitarios vigentes, y hacer uso de buenas prácticas de manufactura.

6.3 Requisitos organolépticos (requisitos sensoriales)

6.3.1 **Aspecto:** Líquido cristalino, sin partículas en suspensión, ni sedimentos.

6.3.2 **Aroma y sabor:** Característico, libre de olores y sabores extraños.

6.3.3 **Color:** Incoloro.

ANEXO N° 22

NORMA TÉCNICA
PERUANA

NTP 211.013
5 de 7

6.4 Requisitos fisicoquímicos

Requisito	Valores Límite	Métodos de ensayo
Grado alcohólico a 20 °C, % Alc. Vol. ¹	Mín. 38 Máx. 50	NTP 211.004 ó NTP 210.003
Acidez total como ácido acético, (*)	Máx. 2	NTP 211.040
Metanol como metanol, (*)	Máx. 10	NTP 210.022 ó NTP 211.035
Ésteres totales como acetato de etilo, (*)	Máx. 3	NTP 211.003 ó NTP 211.035
Alcoholes superiores como aceite fusel, (*)	No detectable	NTP 210.021 ó NTP 211.035
Furfural como furfural, (*)	No detectable	NTP 210.025 ó NTP 211.035
Extracto seco total a 100 °C, (g / L)	Máx. 10	NTP 211.041
Suma de componentes volátiles diferentes al alcohol etílico, ² (*)	Máx. 10	NTP 211.040, NTP 210.020, NTP 210.022, NTP 211.003, NTP 211.021, NTP 210.025 ó NTP 211.035
(*) : Expresado en mg/100 mL AA		
¹ En cuanto al grado alcohólico indicado en el rotulado, se permitirá una tolerancia de $\pm 0,5$ grados alcoholométricos		
² La determinación de componentes volátiles se realiza con la suma de los resultados de: aldehídos, ésteres, metanol, alcoholes superiores, y acidez volátil.		

7. MUESTREO

Véase la NTP 210.001.

8. ROTULADO Y ENVASE**8.1 Rotulado**

Cada envase del producto objeto de esta NTP deberá estar rotulado de conformidad con la NMP 001, NTP 210.027 y cualquier otro dispositivo vigente.

8.2 Envase

8.2.1 El envasado del producto objeto de esta NTP debe cumplir con los requerimientos de la NMP 002 y cualquier otro dispositivo vigente.

8.2.2 Para el envasado del producto objeto de esta NTP, se emplearán envases y cierres adecuados, con las siguientes características: inertes, limpios y que no impartan al producto olores o sabores extraños ni sustancias nocivas que afecten la salud del consumidor. Los cierres deberán ser herméticos para asegurar la integridad del producto que contienen.

9. ANTECEDENTES

9.1	NTP 210.019:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Definiciones
9.2	NTP 211.007:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Alcohol etílico, Rectificado, Neutro (Rectificado fino), Extraneutro (Rectificado extrafino). Requisitos
9.3	NTP 211.011:2003	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Ron. requisitos
9.4	NTP 211.013:1985	BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Vodka

ANEXO N° 24

NORMA TÉCNICA
PERUANA

NTP 211.013
7 de 7

- | | | |
|-----|---------------|--|
| 9.5 | NTC 305:1999 | BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Vodka. |
| 9.6 | SAZS-S28:1970 | Cane spirit and vodka |
| 9.7 | CR No 1576/89 | Definitions of categories of alcoholic beverages |