

COMPARACIÓN DE PRODUCCIÓN DE α - AMILASA DE *Aspergillus oryzae* EN
CULTIVARES DE ARROZ (*Oryzae sativa* L.) Nishiki, vs FEDEARROZ 68 Y 67 POR
MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA ELABORACIÓN DE
UNA BEBIDA TIPO SAKE.

YARARDIN XIOMARA CUBIDES ROJAS

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EXTENSIÓN FACATATIVÁ

2019

COMPARACIÓN DE PRODUCCION DE ALFA- AMILASA DE *Aspergillus oryzae*
EN CULTIVARES DE ARROZ (*Oryzae sativa* L.) Nishiki, vs FEDEARROZ 68 Y 67 POR
MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA ELABORACIÓN DE
UNA BEBIDA TIPO SAKE.

YARARDIN XIOMARA CUBIDES ROJAS

REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTOR

Dr. CARLOS ZULUAGA Profesor Asistente Facultad de Ciencias Agrarias

CO-DIRECTOR

M.Sc. DANIEL CUBILLOS Profesor Técnico Facultad de Ciencias Agrarias.

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EXTENSIÓN FACATATIVÁ

2019

DEDICATORIA

Las herramientas que nos conducen a la realización de nuestras metas son la fortaleza frente a las adversidades y el ideal del propósito.

A Francisco Castañeda, quien da origen a los fundamentos de esta investigación, por ser parte importante de mi formación profesional además de su constante apoyo a lo largo de este proceso como pareja, compañero, amigo y profesional tanto en momentos de adversidad y en momentos inolvidables.

A mi hermana, Indi Moreno, que hace parte importante de mi vida, porque a pesar de las dificultades que se nos han presentado como familia siempre tuve el apoyo fraternal y la motivación a lo largo de este proceso.

A Alejandra Saavedra y Giomara Castro por sus consejos y constante apoyo como amigas a lo largo del desarrollo de la carrera y la presente investigación.

Al sector agrícola de mi país, el cual es el motor y la motivación de esta investigación, por ser el campo donde nacen grandes seres humanos quienes mantienen nuestra nación con los más variados productos y de donde se origina nuestra riqueza.

A todas aquellas personas que tienen propósitos a simple vista difíciles de alcanzar, pero que jamás se dejan vencer por las adversidades que surgen en el proceso, haciendo de la perseverancia un aliado.

AGRADECIMIENTOS

A Francisco Castañeda, por estar presente en cada instante del desarrollo de esta investigación, por su apoyo en las adversidades que surgieron en la misma, al haber brindado diversas herramientas para su ejecución, consejos y cariño.

A la Universidad de Cundinamarca por ser el inicio de este proceso al acogerme en mi formación como profesional y ser puente que condujo diversos conocimientos adquiridos en el transcurso de la carrera al servicio del desarrollo de esta investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia por prestar los espacios, equipos necesarios, material bibliográfico para el desarrollo de esta investigación, por la calidad humana de funcionarios, profesores y estudiantes siempre dispuestos a colaborar y a aportar en pro del beneficio de la ciencia.

A Fedearroz, por compartir información relevante, por aportar los cultivares seleccionados para el desarrollo de la parte experimental, haciendo posible la realización de la presente investigación.

A mis compañeras y amigas Giomara y Alejandra, de quienes recibí apoyo incondicional y de múltiples formas en los momentos más difíciles desde el inicio de la carrera.

Al Ingeniero Elkin Flores por su disposición y diversos aportes en el desarrollo de la investigación, los cuales hicieron posible gran parte de la parte experimental de la investigación.

Al Dr Carlos Zuluaga por su colaboración, importantes aportes además de su tiempo y accesibilidad para la realización de esta investigación.

Al profesor Daniel Cubillos por su colaboración y accesibilidad para el desarrollo en la investigación.

A la Directora Liz Karen Bohórquez por su calidad humana, profesional y constante disposición e interés en colaborar en el desarrollo de esta investigación, lo cual hizo posible la ejecución de diversos procesos en la misma.

A la Ingeniera Sandra Mendoza por su disposición, tiempo y su calidad humana al aportar críticas e ideas valiosas a la investigación.

A cada uno de los profesores que hicieron parte de mi formación profesional, por su calidad humana y profesional, la cual condujo al desarrollo de la investigación.

Tabla de contenido

	Pág.
Resumen.....	12
Introducción.....	13
1. Planteamiento del problema15
2. Justificación17
3. Objetivos19
3.1.General19
3.2.Específicos19
4. Estado del arte20
5. Marco teórico22
5.1.La cariósida del arroz (<i>Oryzae sativa</i> L.)22
5.1.1. Origen22
5.1.2. Taxonomía23
5.1.3. Morfología24
5.1.3.1.Generalidades morfológicas de las tres variedades24
5.1.3.1.1. <i>Japónica</i>24
5.1.3.1.2. <i>Indica</i>24
5.1.3.1.3. <i>Javanica o Bulú</i>24
5.1.3.2.Planta25
5.1.3.2.1. <i>El sistema radicular</i>25
5.1.3.2.2. <i>El tallo</i>25
5.1.3.2.3. <i>Las hojas</i>26
5.1.3.2.4. <i>La inflorescencia</i>28
5.1.3.2.5. <i>La Espiguilla</i>28
5.1.3.2.6. <i>La lemma y palea</i>29
5.1.3.2.7. <i>Grano de arroz (<i>Oryzae sativa</i> L.)</i>30
5.1.4. Industrialización del arroz31
5.1.5. Composición nutricional del grano31
5.1.6. Variables de evaluación para registro de cultivares de arroz32
5.1.7. Cultivares seleccionados33
5.1.7.1. Cultivar FEDEARROZ 6734
5.1.7.1.1. <i>Características agronómicas</i>34
5.1.7.1.2. <i>Características y calidad culinaria</i>34
5.1.7.2. Cultivar FEDEARROZ 6834
5.1.7.2.1. <i>Características agronómicas</i>35
5.1.7.2.2. <i>Características y calidad culinaria</i>35
5.1.8. Arroz (<i>Oryzae sativa</i> L.) como sustrato35
5.2.Sake36
5.2.1. Historia36
5.2.2. Características37
5.2.3. Elaboración38

5.2.3.1. Proceso	39
5.2.3.1.1. <i>Pulido del arroz</i>	39
5.2.3.1.2. <i>Lavado, remojo y cocción al vapor del grano</i>	39
5.2.3.1.3. <i>Producción de Kome-koji</i>	39
5.2.3.1.4. <i>Levaduras</i>	39
5.2.3.1.5. <i>Masa principal</i>	40
5.2.3.1.6. <i>Fermentación alcohólica</i>	40
5.2.3.1.7. <i>Filtración (prensado) de la masa</i>	40
5.2.3.1.8. <i>Sedimentación y filtración</i>	41
5.2.3.1.9. <i>Pasteurización</i>	41
5.2.3.1.10. <i>Añejamiento y embalaje</i>	41
5.3. <i>Aspergillus oryzae</i> (Alhburg) Chon	41
5.3.1. Taxonomía	41
5.3.2. Morfología	43
5.3.2.1. <i>Microscópica</i>	43
5.3.2.2. <i>Macroscópica</i>	44
5.3.3. Crecimiento	45
5.3.4. Historia	45
5.3.5. La α-amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	46
5.3.5.1. <i>Estructura de α-amilasa</i>	46
5.3.5.2. <i>Hidrólisis de almidón por α-amilasa</i>	47
5.3.5.3. <i>Condiciones para la producción enzimática</i>	49
5.4. Fermentación en estado sólido	51
5.4.1. Proceso fermentativo	52
5.4.2. Principales características de la FES y la fermentación líquida ...	52
5.4.3. Variables de importancia	55
5.4.3.1. <i>Oxígeno</i>	55
5.4.3.2. <i>Sustrato</i>	55
5.4.3.3. <i>Temperatura</i>	56
5.4.3.4. <i>Humedad</i>	56
5.4.4. Tipos de biorreactores	56
5.4.4.1. <i>Bandeja</i>	57
5.4.4.2. <i>Lecho empacado</i>	59
5.4.4.3. <i>Tambor rotatorio y tambor agitado</i>	60
5.4.4.4. <i>Aireación forzada y mezclado intermitente o continuo</i>	60
6. Metodología	62
6.1. Diseño experimental de bloques al azar	63
6.2. Determinación de actividad enzimática	64
6.2.1. <i>Preparación del arroz</i>	64
6.2.2. <i>Lavado y remojo del grano</i>	64
6.2.3. <i>Cocción al vapor</i>	65
6.2.4. <i>pH inicial del sustrato</i>	66
6.2.5. <i>Inoculación con <i>Aspergillus oryzae</i></i>	66
6.2.6. <i>Fermentación en estado sólido en bandejas</i>	67
6.2.7. <i>24 horas de fermentación</i>	69
6.2.8. <i>Extracción enzimática</i>	70

6.2.9. Determinación de actividad de α -amilasa.....	71
6.2.10. Curva de calibración de almidón.....	73
6.3.Preparación de bebida tipo sake.....	74
6.3.1. Shubo.....	75
6.3.2. Moromi.....	75
6.3.2.1.Primer día.....	75
6.3.2.2.Segundo día.....	76
6.3.2.3.Tercer día.....	76
6.3.2.4.Cuarto día.....	77
6.3.2.5.Filtración.....	77
6.3.2.6.Decantación.....	78
6.4.Análisis fisicoquímicos de la bebida tipo sake.....	78
6.4.1. Porcentaje de alcohol.....	78
6.4.2. Acidez titulable total (ATT).....	79
6.4.3. Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix).....	80
6.4.4. Potencial de Hidrógeno (pH).....	81
7. Resultados.....	82
7.1.PH inicial de los tratamientos.....	82
7.2.Fermentación en estado sólido.....	83
7.3.Actividad de α .amilasa.....	83
7.3.1. Coeficiente de variación de cada tratamiento.....	85
7.4. Análisis fisicoquímicos de una bebida tipo sake.....	86
7.4.1. Porcentaje de alcohol.....	86
7.4.2. Acidez titulable total.....	87
7.4.3. Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix).....	88
7.4.4. Potencial de Hidrógeno (pH).....	88
8. Conclusiones.....	90
9. Recomendaciones.....	92
10. Bibliografía.....	93
Anexos.....	98

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Formación radicular.....	25
Figura 2. Tallo joven de arroz.....	26
Figura 3. Estructuras que componen el tallo maduro de arroz.....	27
Figura 4. Macollamiento primario y secundario.....	27
Figura 5. Espiga y sus principales estructuras.....	28
Figura 6. Estructura de una espiguilla.....	29
Figura 7. Estructura floral.....	30
Figura 8. Composición del grano de arroz	31
Figura 9. Conidios <i>Aspergillus oryzae</i>	42
Figura 10. Vista microscópica de <i>Aspergillus oryzae</i>	44
Figura 11. Colonia <i>Aspergillus oryzae</i>	44
Figura 12. α -amilasa en enlace alfa 1-4.....	47
Figura 13. Descomposición de α -amilasa.....	48
Figura 14. Puntos de ataque degradativo sobre la amilopectina por α -amilasa, β -amilasa, almidón fosforilasa y una enzima desramificante.....	49
Figura 15. Relación entre partícula sólida con el estado líquido y gaseoso.....	56
Figura 16. Biorreactor de bandeja.....	57
Figura 17: Macro escala de los fenómenos de transferencia de calor y masa dentro y entre los diversos subsistemas en el biorreactor del grupo I.....	58
Figura 18. Distribución del oxígeno entre las bandejas no perforadas y perforadas.....	59
Figura 19: Esquema reactor de lecho empacado.....	59
Figura 20: Esquema biorreactor de tambor rotatorio y agitado.....	60
Figura 21. Esquema de biorreactor con aireación forzada y mezclado intermitente o continuo.....	61
Figura 22. Metodología planteada para determinación de actividad enzimática de α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> en tres diferentes cultivares de arroz <i>Oryzae sativa</i> L.....	62
Figura 23 Cultivares de arroz: Arriba derecha FEDEARROZ 67. Arriba izquierda Nishiki y abajo FEDEARROZ 68.....	63

Figura 24. Lavado de arroz.....	64
Figura 25. Remojo de arroz.....	65
Figura 26. Cocción al vapor en autoclave de olla.....	65
Figura 27. Gelatinización del grano de arroz.....	66
Figura 28. Koji comercial de <i>Aspergillus oryzae</i>.....	67
Figura 29. Fermentador de bandeja en madera.....	68
Figura 30. Altura del sustrato de 1.5cm.....	68
Figura 31. Fermentación en cámara de ensayo ambiental versátil SANYO modelo MLR-351H.....	68
Figura 32. Agitación de sustrato.....	69
Figura 33. Muestreo sistemático en tratamientos de fermentación en estado sólido.....	69
Figura 34. Sustrato en solución NaCl (1%) a 28°C en plancha de agitación.....	70
Figura 35. Filtración de extracto acuoso.....	71
Figura 36. Extracto separado de conidios y restos de micelio después de centrifugar.....	71
Figura 37. Reacción de extracto enzimático con Buffer de acetato y lugol.....	72
Figura 38. Diluciones de diferentes concentraciones de almidón soluble.....	73
Figura 39. Metodología para elaboración de sake con variedad de arroz nacional con mayor actividad de α-amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>.....	74
Figura 40. Shubo con proceso de 3 semanas.....	75
Figura 41. Primer día de elaboración de Moromi.....	76
Figura 42. Tercer día de elaboración de Moromi.....	76
Figura 43. Fermentación de moromi durante 20 días.....	77
Figura 44. Filtración de bebida tipo sake.....	77
Figura 45. Decantación de la bebida tipo sake en refrigerador y bebida resultante.....	78
Figura 46. Lectura de densidad con aerómetro.....	79
Figura 47. Titulación de bebida tipo sake.....	80
Figura 48. Medición de sólidos solubles totales en bebida tipo sake.....	80
Figura 49. Lectura de pH de bebida tipo sake a 20°C.....	81
Figura 50. Muestras con crecimiento <i>Aspergillus oryzae</i> en los 3 tratamientos.....	83
Figura 51. Barras de error con promedio de cada tratamiento.....	86

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje aproximado en la composición del grano de arroz.....	32
Tabla 2. Composición química del sake.....	37
Tabla 3. Principales diferencias entre la fermentación en estado sólido y líquido.....	53
Tabla 4. pH inicial de los tres tratamientos desviación estándar y ANOVA FEDEARROZ 68, 67 y Nishiki.....	82
Tabla 5. Datos de absorbancia desviación estándar y ANOVA de los 3 tratamientos y 3 repeticiones.....	84
Tabla 6. Concentraciones de almidón en $\mu\text{g/mL}$ desviación estándar y ANOVA correspondiente a las pruebas de cada tratamiento.....	85
Tabla 7. Gasto de NaOH en titulación de bebida tipo sake.....	87
Tabla 8. Solidos solubles totales ($^{\circ}\text{Brix}$).....	88
Tabla 9. Relación de análisis fisicoquímicos de bebida tipo sake con características de sake convencional.....	89

Resumen

Con el fin de tener en cuenta nuevas alternativas para diversificar el propósito del arroz nacional debido a la problemática de importación y descenso de los precios se seleccionaron los cultivares de arroz (*Oryzae sativa* L.) FEDEARROZ 67 y 68 por el contenido de amilosa, peso por cada 1000 semillas y características agronómicas, los cuales mostraron aptitud para ser usados en la elaboración de sake, siendo este el licor japonés que se encuentra en auge a nivel mundial y en Colombia a causa del aumento de la gastronomía oriental. Por lo anterior se evaluó el crecimiento de *Aspergillus oryzae* en fermentación en estado sólido con los dos cultivares ya mencionados y uno japonés por medio de la producción de α -amilasa hidrolizando almidón con la prueba del reactivo de Yodo, donde el cultivar nacional que arrojó mayor actividad enzimática fue FEDEARROZ 68 con el cual se efectuó la elaboración de una bebida tipo sake y mediante análisis se obtuvo porcentaje alcohólico de 7, acidez titulable total de 0.58g/100mL ,pH de 3.5 y sólidos solubles totales de 5.4°Brix.

Palabras clave: Cultivares, sake, *Aspergillus oryzae*, Fermentación en estado sólido, α -amilasa, *Oryzae sativa* L.

Introducción

La creciente popularidad del sushi y en general la gastronomía japonesa ha ayudado a popularizar el sake en el resto del mundo, su suave sabor también va bien con la cocina francesa, italiana y china, y está ganando popularidad como una nueva bebida alcohólica distinta del vino y la cerveza, sin mencionar que en parte del proceso se incluye otros productos como salsa de soya (Naohisa, 2016). Además el arroz que usualmente se usa en la elaboración de sake es japonés y también utilizado como alimento, el cual permite el crecimiento de *Aspergillus oryzae* en la primera fermentación de la bebida mencionada, debido a su alto contenido de almidón concentrado en el interior del grano, el cual es hidrolizado por enzimas que convierte posteriormente en azúcares que luego pasan a transformarse en alcohol (Shinbashi y Ku, 2011).

El *Aspergillus oryzae* es un hongo filamentosos el cual se utiliza en el este de Asia (especialmente Japón y China) para la producción de alimentos, como por ejemplo en salsa de soya y sake por medio de fermentación en estado sólido (FES), llevando a la producción de muchas enzimas tales como amilasas, proteasas, lipasas y taninasas, que descomponen (hidrolizan) macromoléculas, entre ellas almidones, proteínas o grasas, las cuales son fuente de alimento para el microorganismo (Shurtleff y Aoyagi, 2012), lo que se lleva a cabo durante el metabolismo primario del hongo permitiendo su crecimiento (Roussos y Perraud-Gaime, 1996).

Por otra parte es de prioridad para los investigadores y empresarios potenciales explorar otras opciones para el destino final del arroz nacional y minimizar el impacto de la baja en los precios y las crecientes importaciones (Fedearroz, 2019 y Monterrosa, 2018), por lo anterior se tiene en cuenta el fitomejoramiento que se ha llevado a cabo en el país generando cruces de progenitores con buenas características genéticas, físicas, fisiológicas y sanitarias (Barona,

2010), un claro ejemplo de lo mencionado son los cultivares FEDEARROZ 68 y 67 los cuales se producen en casi todo el territorio nacional con buenos resultados agronómicos (Castilla; *et al*, 2010), sumado a lo anterior el porcentaje de amilosa que se encuentra entre 24-30, centro blanco de almidón 10.5 y 1.6-7.0% respectivamente, peso por cada 1000 semillas de más de 26g (FEDEARROZ, 2014; FEDEARROZ, 2007), son aspectos de gran importancia para el crecimiento de hongos benéficos para la agroindustria (Shurtleff; Aoyagi, 2012).

Al ser la producción α -amilasa directamente proporcional al crecimiento del hongo y este mismo dependiente del sustrato en la fermentación en estado sólido (Chancharoonpong *et al*, 2012), se realiza la comparación en tres cultivares de arroz (*Oryzae sativa* L.) FEDEARROZ 68, 67 y Nishiki como sustratos, con el objetivo de determinar la producción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en la primera fermentación que constituye el proceso tradicional de elaboración de bebidas alcohólicas tipo sake, para luego caracterizar el licor resultante del cultivar que arrojó mayor actividad enzimática, con ello se podría generar un producto que se utilice en la gastronomía oriental que existe en el país, en lugar de importarlo, diversificando el uso del arroz nacional.

1. Planteamiento del problema

En Colombia desde el 2015 según las estadísticas del DANE el precio del arroz ha aumentado hasta un 17.5% su precio definiendo que existe un escaso abasto del grano; Debido a la reducción de área destinada a su cultivo y el ingreso de arroz de contrabando, se generó una falta de condiciones adecuadas para los productores (Fajardo, 2015). Sumado a lo anterior, desde el 2017 el precio ha caído abruptamente debido principalmente a una sobreproducción (Monterrosa, 2018) a pesar que esto se contradice al registrarse el aumento de las importaciones del grano hasta en un 484% desde el 2000 hasta el 2018 (Fedearroz, 2019).

En la tarea de diversificar el propósito del arroz nacional se seleccionaron dos cultivares desarrollados por Fedearroz y que actualmente se cultivan en Colombia, FEDEARROZ 67 y 68, cuyos atributos los ubican como sustratos potencial para *Aspergillus oryzae* o Koji (FEDEARROZ, 2014; FEDEARROZ, 2007 y Shimbashi y Ku, 2011), así se podrá comparar con el arroz Japonés Nishiki la producción de α -amilasa mediante su actividad hidrolítica del almidón por medio de la prueba del reactivo de Yodo (Torres et al, 2013; Terebiznik, 1998) después de la fermentación en estado sólido tradicional para elaboración de sake.

El sake es una bebida tradicional en países como Japón y China presentándose como una insignia de su cultura, este licor se caracteriza por sus aromas afrutados a pesar de ser de las bebidas fermentadas con más graduación alcohólica lo cual actualmente lo ha popularizado como un buen maridaje con diferentes platos (Atsuko, 2018). La popularidad y el aumento de la gastronomía oriental en occidente ha generado el mismo impacto para tal licor, el cual requiere para su elaboración de forma tradicional del hongo *Aspergillus oryzae*, el crecimiento de tal hongo requiere un arroz que posea un peso por cada 1000 semillas de 26 g o más, un

considerable contenido de almidón y presente gelatinización para la fermentación en estado sólido del mismo (Shimbashi y Ku, 2011).

La alimentación de *Aspergillus oryzae* como muchos hongos es adsortiva lo cual permite liberar enzimas que hidrolizan moléculas complejas como almidón, una de ellas es α -amilasa, esta hidroliza una molécula completa e intacta de almidón rompiendo enlaces al azar para liberar glucósidos lo cual permite que su producción dependa del sustrato (Graber y Combes. 1989) esta endoamilasa llega a su máxima producción de 48-60 horas de fermentación (Chancharoonpong et al, 2012; Terebiznik, 1998), que representa el tiempo que lleva realizar adecuadamente la producción de koji o arroz inoculado con *Aspergillus oryzae*, en el caso del sake si hay mayor actividad enzimática en el proceso de fermentación en estado sólido se generará más contenido de glucosa lo cual beneficia el sabor del producto final (Shimbashi, Ku, 2011). Por lo anterior se hace necesario evaluar si los cultivares nacionales comparados con el japonés poseen una actividad enzimática similar en el proceso de fermentación para la elaboración del sake, evaluando mediante diferentes atributos fisicoquímicos.

Con base en lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál de los tres cultivares de arroz arroja mayor producción de α -amilasa en el proceso de fermentación en estado sólido de *Aspergillus oryzae* que pueda ser empleado en la elaboración de una bebida tipo sake determinado por las características fisicoquímicas de la misma?

2. Justificación

En la composición de la agricultura colombiana el cultivo del arroz ocupa un lugar de gran importancia, su apego hace parte de la historia de diversas regiones que encontraron en este grano el sustento de su actividad económica, contribuyendo al mismo tiempo a la seguridad alimentaria de la Nación (FAO, 2004). Con el fin de potencializar las características fitosanitarias y productivas del grano se han desarrollado cultivares por Fedearroz (Castilla; *et al*, 2010). De los cultivares que más se siembran en Colombia y que poseen buenas características agronómicas y en contenidos de amilosa se incluyen FEDEARROZ 67 y 68 (FEDEARROZ, 2014; FEDEARROZ, 2007) los cuales podrían tener la facultad de ser sustrato para multiplicar *Aspergillus oryzae* inclinados a la producción de Sake.

De los principales componentes del grano de arroz se incluye el almidón, pero aparte de esto, el exterior y germen de arroz integral contienen una capa de nutrientes, como proteínas, grasas, minerales y vitaminas conocida como aleurona (Olmos, 2006). Estos nutrientes hacen parte de la proliferación de *Aspergillus oryzae* y levaduras en el proceso que lleva a la elaboración del sake, pero un exceso de esta capa externa acelera el proceso de fermentación causando desequilibrio en la calidad del sake, debido a lo anterior en la producción de tal bebida se requiere de granos grandes con alto peso, con contenidos de almidón apropiados así como un bajo contenido de proteínas (Shinbashi, Ku, 2011).

Actualmente no se encuentran muchos estudios en los que se haya elaborado bebidas alcohólicas tipo sake con arroz nacional, lo cual es contradictorio teniendo en cuenta que este licor no cuenta con ninguna restricción en el país (Gaviria y Lacouture, 2017), en contraste la gastronomía oriental junto con el sake ha tomado fuerza en países de occidente (Takaaki, 2015) y aunque en Colombia existen más de 20 marcas de comida oriental todo el sake que se

comercializa en los mismos es importado. Además que el mercado de bebidas alcohólicas en Colombia en especial las exóticas ha venido en aumento llegando hasta el 8% con el whisky, ron y vino (Dinero, 2015).

Debido a lo anterior se han seleccionado dos cultivares desarrollados por Fedearroz que se siembran actualmente en la mayoría del territorio nacional, no solo por sus propiedades en resistencia a la Sogata (*Tagosodes orizicolus*) sino también por su rendimiento, porcentaje de amilosa de 30 y 24-27 respectivamente, centro blanco de almidón 10.5 y 1.6-7.0% distributivamente y mediana gelatinización, aspectos de gran importancia para el crecimiento de *Aspergillus oryzae* protagonista en la producción de sake (Shurtleff; Aoyagi, 2012), la buena calidad de tal bebida requiere que el grano tenga un peso por 1000 semillas de 26g o más (Shinbashi, Ku, 2011), y en los cultivares FEDEARROZ 68 y 67 es de 28-30 y 24-28 respectivamente (FEDEARROZ, 2014; FEDEARROZ, 2007).

Existen varias formas para evaluar la calidad del sustrato y la eficacia de la fermentación en estado sólido (FES) entre las que se encuentra consumo de nutrientes actividad celular y la producción de enzimas (Arnaiz; Isac y Lebrato, 2000). La producción de α -amilasa define la hidrólisis de la molécula de almidón en glucósidos y el biocatalizador se favorece con el tipo o concentración de sustrato o las condiciones de fermentación (Graber y Combes, 1989; Terebiznik, 1998). Esta enzima que es más estable que las de origen bacteriano, es la única en atacar un gránulo de almidón intacto degradándolo a glucosa y siendo herramienta en la alimentación de *Aspergillus oryzae* en el transcurso del proceso de fermentación en estado sólido (Gupta et al, 2008; Fogarty y Kelly, 1979; Pardo y Rivera, 2001; Terebiznik, 1998).

3. Objetivos

3.1. General

Evaluar la producción de α -amilasa a partir de *Aspergillus oryzae* en tres cultivares de arroz (*Oryzae sativa L.*) mediante fermentación en estado sólido para su uso como materia prima en la elaboración de una bebida alcohólica tipo sake.

3.2. Específicos

1. Determinar producción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* entre los tres cultivares de arroz mediante una prueba de hidrólisis de almidón.
2. Replicar un proceso de fermentación en estado sólido tradicional de una bebida tipo sake con *Aspergillus oryzae* en tres cultivares de arroz (*Oryzae sativa L.*)
3. Caracterizar mediante análisis fisicoquímicos una bebida tipo sake con el cultivar colombiano que arroje mayor actividad catalítica de α -amilasa.

4. Estado del arte

Reinoso en 2015 basado en Mitchell *et al.*, 1999 reportó que la altura del lecho o sustrato en un fermentador de bandeja es un factor de gran relevancia a la hora de mantener constante la temperatura y la distribución del oxígeno al igual que el nivel de Humedad. Como factor de interés para la actividad metabólica del organismo está el diseño del fermentador con fondo perforado distribuyendo mejor el oxígeno en el interior de todo el sustrato para generar una buena actividad enzimática.

Shurtleff y Aoyagi 2012 basados en Chen *et al.* 2008 indicaron que *Aspergillus oryzae* produce muchas enzimas, incluyendo amilasas, proteasas, lipasas y taninasas, que se hidrolizan macromoléculas tales como almidones, proteínas y grasas en sus partes constituyentes, tales como dextrina, glucosa, péptidos, aminoácidos, y cadenas de ácido grasos. Las culturas antiguas han usado los beneficios de estos metabolitos primarios para producir una variedad de productos alimenticios fermentados, incluyendo salsas de soya, miso, soya negra fermentadas y sake.

Chancharoonpong *et al.*, 2012 indicaron que la producción de enzimas de *Aspergillus oryzae* estaba relacionada con las propiedades físicas de un sustrato diferente al arroz utilizado ya en agroindustria japonesa el soya koji durante la fermentación. El crecimiento de micelio del hongo también se relacionó con el aumento de la producción de enzimas tanto en la etapa de formación de esporas de *A. oryzae* así como en la producción de micelio en el período de fermentación. Puede resumirse que el koji de soja fermentado a las 48 h podría ser utilizado como una fuente de enzima activada para acelerar la fermentación en productos de agroindustria. Aunque en este trabajo se utilizó un sustrato diferente pero sin menos importancia al utilizado normalmente en la producción del hongo, se tiene en cuenta que la producción

máxima de α -amilasa llega hasta 48 horas, el pH del sustrato tiene gran importancia estando alrededor de 6.

FEDEARROZ en 2014 y 2007 desarrolló la variedad FEDEARROZ 67 debido a su gran capacidad de resistencia a las altas temperaturas máximas y mínimas y su buen rendimiento en molino y cocción, y actualmente es de los cultivares más sembradas en la mayoría del territorio colombiano (Castilla; *et al*, 2010) al igual que FEDEARROZ 68 que posee una significativa cantidad de amilosa y centro blanco que es el almidón, lo cual es de gran importancia para la investigación.

5. Marco teórico

5.1. La cariósida del arroz (*Oryzae sativa* L.)

5.1.1. Origen.

El arroz es considerado una de las plantas cultivadas por el hombre más antiguas y se ha mencionado en la literatura china desde el año 3000 a.C. con propósitos religiosos, aunque se le atribuye el origen a dos especies una de origen africano *Oryzae glaberrima* Steud y de Asia la conocida como *Oryzae sativa* L. a la cual se le atribuye la expansión del cultivo en el mundo y su antepasado es conocido como *Oryzae fatua* Koenig, el origen como tal de la planta se encuentra entre el sur de la India, de la península de Indochina o el valle del río Yan-tse Kiang en China (Tascón *et al*, 1985; Degiovanni *et al*, 2010; Angladette, 1969).

El origen del arroz también lo han considerado posible en el sur de la India o la antigua Cochinchina debido a la existencia de muchas especies silvestres del género *Oryzae* Roschevicz, y por las condiciones ambientales se presentan idóneas para el cultivo en el lugar (Degiovanni *et al*, 2010), el orden de dispersión sería de China a Malasia luego de Burna al norte del valle del río amarillo, de Indochina al valle inferior de Yangtze donde seguramente se formó la variedad Japónica (León, 1987).

En Colombia se registra que este cultivo se inició en el 1580 en Mariquita (Tolima), luego los llanos se empezaron a proclamar como las zonas más arroceras en el 1908 y posteriormente se intensificaron en Armero, Venadillo y Campoalegre (Fedearroz, 2019). Actualmente somos de los países más consumidores del grano a pesar de la situación precaria del cultivo a nivel nacional presentando un aumento de las importaciones desde el año 2000 .y

descenso de precios, atribuyendo esto a la sobreproducción del grano desde el 2018 (Monterrosa, 2019; Fedearroz, 2019).

5.1.2. Taxonomía

División Magnoliophyta

Clase Liliopsida

Orden Glumiflora

Familia Gramíneaceae

Subfamilia Panicoideas

Tribu Oryzae

Subtribu Oryzineas

Genero Oryzae (Angladette 1969, Tascón *et al*, 1985)

Oryzae sativa L. pertenece a la familia de las gramíneas o poaceas, hace parte de la subfamilia de las panicoideas debido a su disposición floral en panícula y se le ubica en el género Oryzae (SAG y DICTA, 2003)

El género oryzae reconocido por sus espiguillas compuestas por uniflores, algunas veces carentes de glumas o con dos o tres flores (Tascón *et al*, 1985), comprende alrededor de 24 especies tropicales distribuidas y concentradas en África central, Malasia y Filipinas aunque en América latina se presentan 5 especies de las cuales una es silvestre conocida como *Oryzae perennis* que también se puede ubicar en África y Asia (León, 1987). Aunque se llegaron a describir hasta 28 especies de este género (Degiovanni *et al*, 2010), el mismo se llegó a

clasificar en cuatro partes *Padia*, *Euroriza*, *Malbrunia* y *Potamophila* (Degiovanni *et al*, 2010). También se ha descubierto que la especie *Oryzae sativa* L. contiene en cantidad de cromosomas $2n=24$ y $n=12$ y cuenta con 430 millones de pares de bases en su ADN (SAG y DICTA, 2003).

5.1.3. Morfología

5.1.3.1. Generalidades morfológicas de las tres variedades

5.1.3.1.1. Japónica.

Poseen menor capacidad de macollamiento en comparación que las indicas, y mejor respuesta al rendimiento de Nitrógeno, también cuentan con hojas erectas de un color verde intenso (Tascón *et al*, 1985)

5.1.3.1.2. Indica.

Mayor contenido de almidón y granos más alargados, delgados y poco glutinosos a la cocción comparándolos con Japónica (Tascón *et al*, 1985).

5.1.3.1.3. Javanica o Bulú.

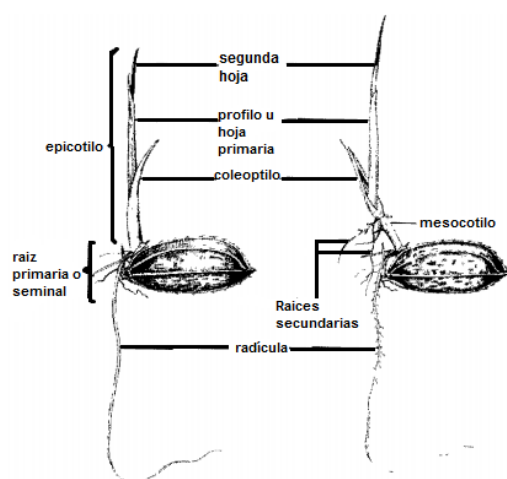
Morfológicamente es similar a la japónica pero sus hojas son pubescentes y más anchas, aunque la planta es fuerte y rígida pero no cuenta con buen macollamiento con granos tienden a ser en forma de arista (Tascón *et al*, 1985; Franquet, 2004).

5.1.3.2. Planta

5.1.3.2.1. El sistema radicular.

Presenta dos tipos de raíces primarias y secundarias también llamadas seminales o adventicias respectivamente, las raíces primarias no tardan mucho en ser reemplazadas por las secundarias las cuales emergen de los nudos subterráneos o como en el arroz flotante de los aéreos (ver Figura 1) (Tascón *et al*, 1985). La longitud del conjunto radicular disminuye su crecimiento al presentarse aumento de Nitrógeno en el sustrato o suelo (Degiovanni *et al*, 2010).

Figura 1. Formación radicular



Fuente: (Tascón *et al*, 1985 pág. 66)

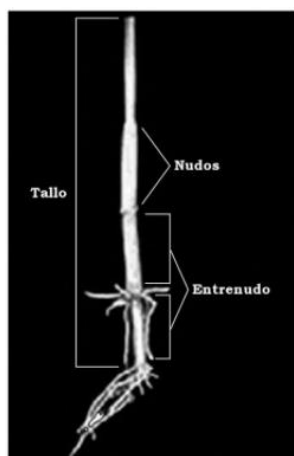
5.1.3.2.2. El tallo.

Su apariencia externa tanto brillo, textura y color varía según el cultivar, pero en general como el resto de gramíneas realiza en su formación una sucesión alterna de nudos y entrenudos donde se desarrolla una hoja y una yema de la cual se produce una macolla (ver Figura 2). El nudo inicial es el más importante, debido a que de ahí se originan las raíces adventicias que absorben los nutrientes que aprovecha la planta (León, 1987).

5.1.3.2.3. Las hojas.

Presentan crecimiento en forma alterna del entrenudo y la componen la vaina cuello y lámina cuando ya están completas, la primera se origina del nudo basal del tallo principal, sin embargo de los entrenudos inferiores que además de cubrir la hoja forman las bases de las siguientes estructuras foliares (ver Figura 3), pero la última de estas que provee el tallo es conocida como hoja bandera, la cual se ubica justo debajo de la panícula (León, 1987; Degiovanni *et al*, 2010).

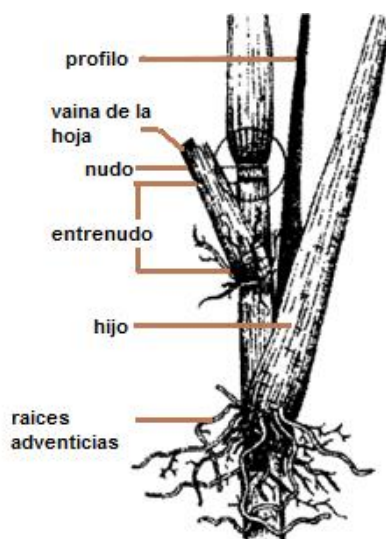
Figura 2. Tallo joven de arroz



Fuente: (Degiovanni *et al*, 2010 pág. 51).

La presencia de enfermedades como el añublo bacteriano de la panícula por el agente causal *Burkholderia glumae*, las cuales afectan la formación de hojas y panícula, se deben prevenir con siembras en épocas adecuadas, adecuada densidad de siembra y cultivares resistentes (Pérez y Saavedra, 2011)

Figura 3. Estructuras que componen el tallo maduro de arroz



Fuente: (Tascón *et al*, 1985 pág. 67)

Se presenta generación de hijuelos en forma ascendente y alterna del tallo principal, los mismos llegan a ser hasta de tercer nivel formando inicialmente ángulos de 30° hasta finalizar en 60° lo cual conforma la macolla, el macollamiento de la planta se presenta como primario y secundario (ver Figura 4) pues tanto las macollas iniciales como las secundarias y las que siguen emergen del tallo principal (Tascón *et al*, 1985; Degiovanni *et al*, 2010).

Figura 4. Macollamiento primario y secundario

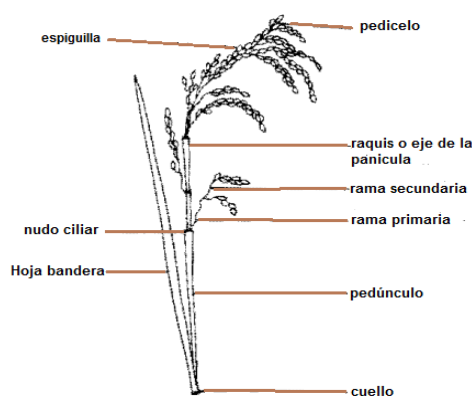


Fuente: (Degiovanni *et al*, 2010 pág. 51)

5.1.3.2.4. La inflorescencia.

Está dispuesta en panícula, la cual se origina del nudo apical conocido como ciliar el cual carece de hojas y yemas, al finalizar el entrenudo superior se origina el pedúnculo el cual se toma de referencia para la longitud de la planta, esta flor es protegida por el raquis que es la terminación del tallo el cual posee varias ramificaciones llegando a las espiguillas (Tascón *et al*, 1985; León, 1987). Existe una relación de gran importancia después de la floración con la panícula y el cuello de la hoja (ver Figura 5).

Figura 5. Espiga y sus principales estructuras



Fuente: (Degiovanni *et al*, 2010 pág. 72)

5.1.3.2.5. Espiguilla.

Es también conocida como la unidad de la inflorescencia y está formada por tres flores de las cuales solo una es fértil la cual termina desarrollando completamente, a su vez se conforma por dos glumas estériles, raquilla y la flor. Las lemmas estériles (glumas rudimentales) al final conforman la cascara del fruto (ver Figura 6), nacen desde el pedicelo y rodea desde abajo la raquilla se conocen como palea con tres nervaduras y al lado opuesto lema

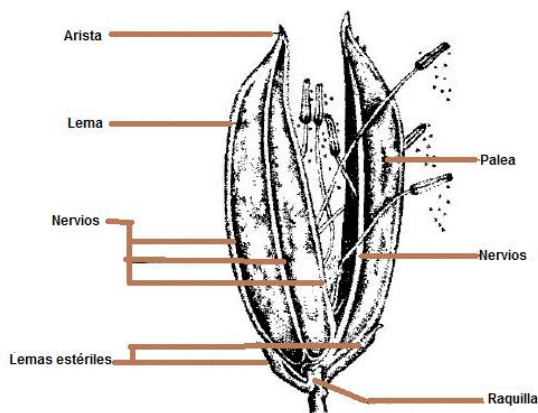
que posee cinco con una prolongación filiforme al final conocida como arista (Franquet, 2004; Degiovanni *et al*, 2010)

5.1.3.2.6. La lemma y la palea

Presenta cinco nervaduras longitudinales la central más desarrollada y termina en una arista de aproximadamente dos 2 cm que varían según cultivar, la presencia de la misma determina la finalización de la floración (León, 1987). La palea se ubica opuesta a la lemma cuenta con tres nervaduras carece de quilla y arista. Ambas brácteas pueden presentar pubescencia o numerosas espículas que posteriormente se convertirán en la cascara del fruto mostrando variedad de colores (Degiovanni *et al*, 2010).

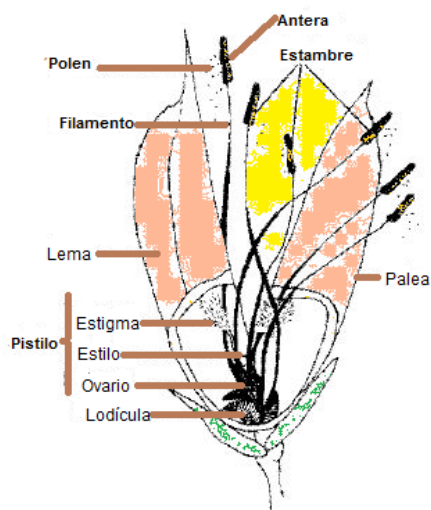
La flor fértil está compuesta por seis estambres y el gineceo cuenta con un ovario supero de un ovulo y tres ramas estigmáticas de las cuales una es notablemente más pequeña, sujetando las glumas se encuentra un cuerpo carnososo conocido como perianto que hace parte importante de la apertura floral (ver Figura 7) (León, 1987)

Figura 6. Estructura de una espiguilla



Fuente: (Tascón *et al*, 1985 pág. 74)

Figura 7. Estructura floral

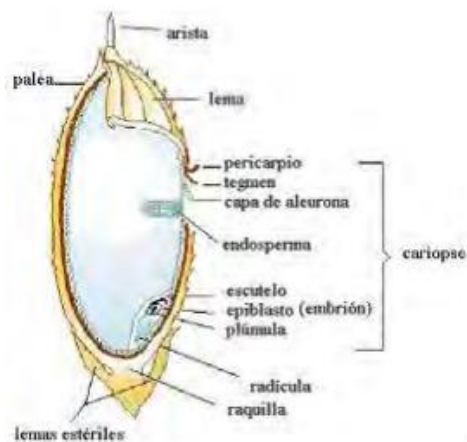


Fuente: (Tascón *et al*, 1985 pág. 74)

5.1.3.2.7. Grano de arroz.

Se caracteriza por ser un ovario maduro e indehisciente, el cual alimenta el embrión por medio del endospermo el cual está cubierto por el pericarpio, este primero está constituido por células de parénquima que se elongan en forma radial y está compuesto por gránulos de almidón y algunos cuerpos proteicos, la cascara se encuentra constituida por dos glumelas (lema y palea) y con ellas se conoce industrialmente como arroz cascara el interior de esas dos capas se encuentra la aleurona (ver Figura 8), la cual está compuesta por capas de un tejido rico en proteínas, el tegmen que es una cubierta seminal (Pincirolí, 2010).. El grano de arroz sin cascara se denomina carióspside o arroz integral con todas las proteínas y vitaminas que conserva el color marrón del pericarpio. Los granos se clasifican según su longitud existen extra largo (7.6 mm o más), largo (7.5- 6.6mm), medio (6.5- 5.6) y corto 5.5mm o menos (Arregocés *et al*, 2005).

Figura 8. Composición del grano de arroz



Fuente: (Pincirolí, 2010).

5.1.4. Industrialización del arroz.

Según Pincirolí, 2010 el proceso de industrialización tradicional del arroz involucra las actividades que transforman el arroz cáscara (materia prima) en arroz elaborado (blanco o pulido), con el objetivo de hacer el producto apto para el consumo humano. El anterior proceso difiere de los otros cereales, en donde el grano es molido para convertirlo en harina, en el proceso del arroz el objetivo consiste en mantener la mayor cantidad posible de granos intactos como arroz entero, la eficacia de tal técnica se traduce en rendimiento industrial, se juzga por la cantidad de arroz entero obtenido a partir de una cantidad determinada de arroz cáscara. El resto del proceso de pulido se descarta para alimento de animales.

5.1.5. Composición nutricional del grano de arroz

Del grano cosechado, aproximadamente 20 % es cáscara, y 10 % es salvado, ambos elementos se eliminan en los procesos de descascarado y pulido respectivamente, el resto (70%), está formado por granos de arroz blanco o pulido, entero y partido (o quebrado). El arroz

pulido está constituido fundamentalmente por el endospermo, el salvado por el embrión y las capas externas (aleurona, tegmen, y pericarpio) y el arroz integral por ambos (endosperma y salvado) (Pincirolí, 2010). Aunque el consumo de este cereal se hace a partir del endospermo, en la actualidad se incentiva su consumo como arroz integral pues al solo estar descascarado se mantiene endospermo más aleurona, embrión y pericarpio, estos granos enteros son ricos en fibra, vitaminas del complejo B, minerales, tocoles, fitonutrientes y antioxidantes (Nelina y Ruíz, 2005) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje aproximado en la composición del grano de arroz

Propiedad	Arroz integral	Arroz cáscara	Grano pulido
Proteína	8,3-9,6	6,7-8,3	7,3-8,3
Lípidos	2,1-3,3	2,1-2,7	0,4-0,6
Fibra cruda	0,7-1,2	8,4-12,1	0,3-0,6
Cenizas	1,2-1,8	3,4-6,0	0,4-0,9
Almidón	77,2	62,1	90,2
Fibra dietaría	4,5	19,1	2,7

Fuente: (Pincirolí, 2010).

5.1.6. Variables de evaluación para registro de un cultivar de arroz (Matheus, 2009).

✓ Ciclo de vida: Se encuentra el tiempo de siembra a emergencia, de allí a la floración luego a la madurez y finalmente a la cosecha

- ✓ Características agronómicas: Altura de la planta, hábito de crecimiento, macollas por planta, color de la hoja, pubescencia de la hoja, color de lemma y palea, senescencia, reacción al desgrane, excursión de panícula, reacción al volcamiento, longitud hoja bandera, ancho hoja bandera, longitud lígula, vigor, vaneamiento, granos llenos por panícula y longitud de panícula.

- ✓ Características de la semilla: Longitud (mm), ancho (mm), espesor (mm), aristas en las semillas, peso de 1000 semillas (g) y periodo de dormancia.

- ✓ Calidad molinera: rendimiento de pilada (%), índice de pilada (%) y grano partido (%).

- ✓ Apariencia del grano: Centro blanco (%) y longitud del grano blanco (mm)

- ✓ Calidad culinaria: Gelatinización, contenido de amilosa (%).

- ✓ Reacción a insectos y enfermedades.

El método para generar los cultivares de arroz en Colombia se realiza en su mayoría mediante selección por pedigrí, en el cual se toman dos progenitores (masculino y femenino) con características deseables para posteriormente realizar retro cruces hasta F10, tomando como factores de selección en cada uno el rendimiento, hábito de crecimiento y resistencia a plagas y enfermedades (Degiovanni, 2010).

5.1.7. Cultivares seleccionados

Se seleccionaron dos cultivares entre los que se comercializan en el territorio nacional por sus buenas características agronómicas, usando como criterio principalmente el grano, el cual se acercara a las que requiere el sake para su elaboración.

5.1.7.1. Cultivar FEDEARROZ 67

En el registro nacional de cultivares comerciales se presenta el cultivar FEDEARROZ 67 registrado en el 2007 con nombre experimental FLV586-M-5-41S-MS

El progenitor femenino fue LV1063-7-3-MV-4 y el masculino FL03174.

Cuenta con un ciclo total de vida de 1-135 días desde la emergencia de la semilla hasta cosecha, un rendimiento experimental de 9 To/Ha aproximadamente y adaptada a la subregión Alto Magdalena

5.1.7.1.1. Características agronómicas.

Presenta resistencia a Sogata (*Tagosodes orizicolus*) además de presentar altura de 105-115cm, 20-30 macollas por planta, una senescencia intermedia, un porcentaje de 0-10 en volcamiento, bajo vigor y 80-160 granos llenos por panícula

5.1.7.1.2. Características y calidad culinaria del grano.

Cuenta con un peso por cada 1000 semillas de 24-28 g, calidad de gelatinización intermedia a baja, centro blanco 1.6-7.0% y contenido de amilosa 24-27% (ver Anexo 1)

(Fedearroz, 2007)

5.1.7.2. Arroz (*Oryzae sativa* L.) Cultivar FEDEARROZ 68

En el registro nacional de cultivares comerciales se presenta el cultivar FEDEARROZ 68 registrado en el 17 de octubre de 2014 con nombre experimental FL08468-1P-2-3P-4P-3SR-MC

El progenitor femenino fue FL02066-4P-1-1P-2-M-1P-M-M-M-F11/FL05602-12P-2-2P y el masculino FEDEARROZ LA VICTORIA I

Cuenta con un ciclo total de vida de 1-110 días desde la emergencia de la semilla hasta cosecha, lo cual lo hace tener una cosecha rápida, un rendimiento experimental de 4 To/Ha aproximadamente y adaptada a la región natural de los llanos

5.1.7.2.1. Características agronómicas.

Presenta resistencia a Sogata (*Tagosodes orizicolus*) además de presentar altura de 105-110cm, 20-30 macollas por planta, una senescencia lenta, tolerante al volcamiento, bajo vigor y 65-120 granos llenos por panícula

5.1.7.2.2. Características y calidad culinaria del grano

Cuenta con un peso por cada 1000 semillas de 28-30 g, calidad de gelatinización intermedia a baja, centro blanco 10.5% y contenido de amilosa 29-30% (ver Anexo 2)

(Fedearroz, 2014)

5.1.8. Arroz (*Oryza Sativa* L.) como sustrato

El arroz se encuentra compuesto principalmente por almidones los cuales son aprovechados y degradados por hongos como *Aspergillus oryzae*, así mismo su crecimiento con ayuda de varias enzimas, las cuales tienen funciones catalíticas convirtiendo almidón en azúcares fermentables antes de que ejerzan acción las levaduras para producir alcohol. Para el licor conocido como sake las capas externas del grano de arroz contienen concentraciones de proteína y grasas crudas que contribuyen a sabores extraños para el mismo. El arroz adecuado

para sake es el llamado arroz de grano corto que puede ser pulido extensivamente para producir sake de mayor calidad (Eckhardt, 2008).

Los granos de arroz ideales para el proceso de fermentación en estado sólido en la elaboración de sake son largos y tienen un núcleo blanco compuesto por una matriz de almidón, así mismo bajos contenidos de proteína. Al referirse a grano largo se reconocen los cuales pesen 26 g o más por cada 1000 granos, pero la calidad del arroz al momento de obtener sake se reduce a su resistencia en la cocción a vapor y gran contenido de almidón (Shinbashi y Ku, 2011).

5.2. Sake

5.2.1. Historia

El sake es una bebida alcohólica originaria de Japón, producto de la fermentación alcohólica del arroz (*Oryzae sativa L.*), también se le da el nombre en Japonés de Nihonshu que significa vino de arroz, aunque la palabra sake se refiere a toda bebida alcohólica debido a que a mediados del siglo XIX cuando se empezó la exportación hacia mercados occidentales era la única bebida alcohólica para toda su población desde el siglo III en el periodo Yayoi, su elaboración formaba parte de su cultura, eso fue antes de conocer la cerveza, el whisky por esa razón se vio la necesidad de darle a su bebida tradicional un nombre específico.(oficina nacional de turismo de Japón, 2017).

Actualmente se producen más de 10,000 marcas. La historia y las tradiciones con relación a la elaboración y consumo del Sake, es otro aspecto de la vida de Japón que contribuye a comprender mejor la historia de Japón, su cultura y su ambiente social y físico (Shinbashi y Ku, 2011).

5.2.2. Características

El sake es una bebida alcohólica elaborada principalmente de arroz y agua, su apariencia transparente con notas amarillas lo asemeja al vino su sabor suave con poca astringencia debido a su significativo contenido en cuanto a glucosa, componentes nitrogenados y aminoácidos (ver Tabla 2) (Shinbashi y Ku, 2011). La graduación alcohólica de muchas variedades supera al jugo de la vid llegando a ser 13- 17% dependiendo del pulido del grano, debido a la glucosa que se produce a partir de la hidrólisis de almidón, mediante la generación de enzimas por parte de *Aspergillus oryzae* en el proceso de fermentación en estado sólido (Eckhardt, 2008)

Tabla 2. Composición química del sake

Característica	Contenido
Alcohol	13-17%
Extracto	3-6 g/100mL
Glucosa	0,5-4,2 g/100mL
Nitrógeno	700-1900 mg/L
Ácido glutámico	100-250 mg/L
Acidez titulable	01-02 g/100mL
pH	4,2- 4,7
Ácido succínico	200-500 mg/L
Ácido málico	100- 400 mg/L
Ácido tartárico	0 mg/L
SO ₂ total	0 mg/L

Fuente; (Shinbashi y Ku, 2011)

A diferencia de la cerveza que contiene -20 mg/l de Dióxido de Azufre, el vino que contiene 1200/4000 mg/l de ácido tartárico y -250 mg/l de Dióxido de azufre entre el sake que no contiene estos compuestos desfavorables para su consumo. Aunque contiene el mayor porcentaje de alcohol entre las bebidas fermentadas que existen (Shinbashi y Ku, 2011).

5.2.3. Elaboración

El arroz es de los factores con mayor importancia pues requiere tener buen contenido de almidón, poco contenido de proteínas pues altera el sabor del producto, además que sea un grano largo es decir que su peso por cada 1000 granos sea 26g o más, finalizando con su resistencia a la cocción al vapor es decir que sea hidrófilo, lo anterior permite una buena multiplicación del hongo *Aspergillus oryzae* en el proceso de fermentación en estado sólido durante 48 horas para que permita degradar el almidón en azúcares, el pulido va desde 40- 70% definiendo la calidad del licor (Eckhardt, 2008; Shinbashi y Ku, 2011).

La disponibilidad y calidad del agua tiene gran importancia no solo debe ser favorable sino debe cumplir las normas para ser utilizada en la industria alimentaria, y de mayor importancia que su contenido de Fe no exceda los 0.02 ppm, también es eficaz el agua dura o con buenos contenidos de Magnesio, Potasio y Fosfatos (Shinbashi y Ku, 2011).

5.2.3.1 Proceso

5.2.3.1.1. Pulido del arroz.

Generalmente se extrae el 40-60% de la capa externa del arroz que contienen grasas y proteínas perjudiciales para el sabor del sake, se realiza con un rodillo giratorio que deja solamente la parte central y perlada.

5.2.3.1.2. Lavado, remojo y cocción a vapor del grano.

Se remoja el arroz por 20 minutos hasta absorber aproximadamente 30% de su peso en agua y luego se cocina al vapor por una hora (MASUMI, 2014).

5.2.3.1.3. Producción de Kome-koji.

El hongo *Aspergillus oryzae* tiene la función de convertir el almidón del grano en azúcar mediante la liberación de enzimas para después fermentarlo, tal proceso se lleva a cabo por medio de una fermentación anaerobia donde se sacarifican los granos de arroz (Ingraham, 1997).

Las esporas del hongo se inoculan en el arroz cocido a vapor aportando al mismo el sustrato adecuado, brindando una temperatura aproximada de 30-32°C y una humedad relativa entre 50-80% para su adecuado crecimiento (Shinbashi y Ku, 2011), a los dos días se podrá observar el micelio cubriendo el grano. La cantidad de esporas que se agregan son 2gr/kg de arroz (Sánchez, 2017).

5.2.3.1.4. Levaduras

Existe una levadura especial para la elaboración del sake que se le ha dado el nombre de kyokal- kobo el cual para la elaboración del licor se utilizan los números 6, 7, 9 y 10 se

realiza una masa de semillas con los microorganismos y el arroz cocido, que permitan un alto grado de acidez evitando a la vez bacterias indeseadas, por ello se utilizan bacterias de ácido láctico (Shinbashi y Ku, 2011).

5.2.3.1.5. *Masa principal.*

Primero se realiza el Shubo o madre de sake que ejerce la función de un motor para el proceso de fermentación con levaduras antes mencionadas, agua, arroz cocido, koji y bacterias de ácido láctico.

5.2.3.1.6. *Fermentación alcohólica.*

En un tanque se agrega el arroz cocido al vapor, arroz koji, y el agua, en proporciones de 80, 20, 130, no se agrega el total de los mismos sino periódicamente permitiendo la multiplicación adecuada de las levaduras con la masa de semillas hecha con estos hongos. Así empezara la fermentación (moromi). El primer día a 12°C se agrega el arroz cocido al vapor, el koji, el agua y la semilla de levaduras siendo un sexto del total, el segundo día 10°C no se agrega nada permitiendo la fermentación, el tercer día estando a 8°C se agrega la cantidad de dos sextos del total y finalmente en el cuarto se agregan los tres sextos restantes (Shinbashi y Ku, 2011; MASUMI, 2014).

5.2.3.1.7. *Filtración (prensado) de la masa.*

Por medio de una prensa y un papel de tela que filtre se separa el jugo del arroz quedando el primer sake.

5.2.3.1.8. *Sedimentación y filtración*

La apariencia del primer líquido es turbia por ello se deja sedimentar a baja temperatura para luego pasar la sustancia más cristalina a otro tanque y así agregar tanino caqui o sílice coloidal para quitar la turbidez que aún queda.

5.2.3.1.9. *Pasteurización.*

Luego se someten a una temperatura 60-65°C con el propósito de esterilizar el producto antes de su almacenamiento y desactivar enzimas, es posible hacer nuevamente pasteurización antes de embotellar.

5.2.3.1.10. *Añejamiento y embalaje*

Al calentar el sake en la pasteurización se pierden aromas por ello se puede mejorar las características dejándolo añejar de 6 meses a un año.

5.3. *Aspergillus oryzae* (Alhburg) Cohn

5.3.1. *Taxonomía*

Reino Fungi

Subreino Dikarya

División Ascomycota

Subdivisión Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

Subclase Eurotiomycetidae

Orden Eurotiales

Familia Aspergillaceae

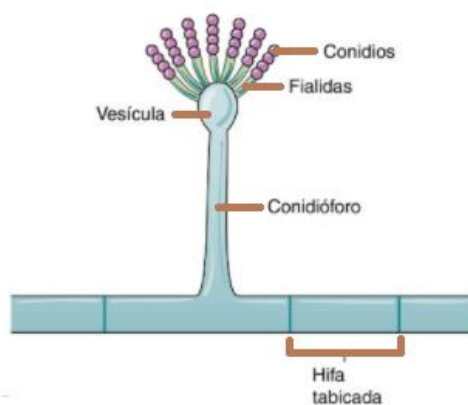
Genero *Aspergillus*

Especie *Aspergillus oryzae* (Alhburg) Cohn.

(Golden, 1898; NCBI, 2018)

La clase de hongos Eurotiomycetes lleva a cabo la reproducción con el uso de sacos conocidos como ascas el cual alberga y protege las ascosporas haploides, el género *Aspergillus* se conoce principalmente por sus hifas septadas que albergan los conidióforos que dan origen a los conidios y de allí a las esporas (Golden, 1898) (ver Figura 9). Existe un matiz de pertenecer a esta clase hongos patógenos para los humanos conocidos como Onygenales, aunque del orden eurotiales es de gran interés para la biotecnología como son el *Aspergillus* y *Penicillium*, (Murray *et al*, 2017).

Figura 9. Conidios *Aspergillus oryzae*



Fuente: (Murray *et al*, 2017).

El grupo al que pertenece *A. oryzae* es *A. flavus* (Raper y Fennell 1965) o también considerado su pariente silvestre, aquel nombre fue dado a cepas domesticadas inicialmente

desde hace muchos años en China y Japón, usadas para la elaboración de bioproductos a base de arroz y productos de soya (Golden, 1898). Este grupo fue identificado como variedad después de encontrar diferencias en su morfología de *A. flavus* y *A. parasiticus*, pero con similitudes metabólicas principalmente para la elaboración por medio de fermentación en estado sólido de koji (Samson, 1985).

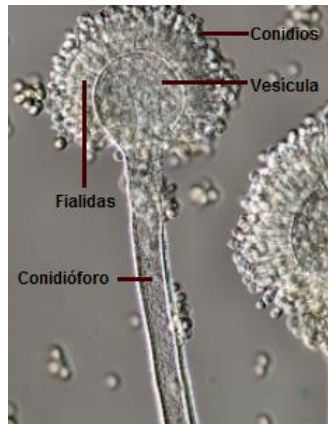
5.3.2. Morfología

5.3.2.1. Microscópica.

Aspergillus oryzae como los demás hongos filamentosos están compuestos por hifas las cuales a su vez comprenden el conjunto llamado micelio, al no producir su propio alimento y ser heterótrofos toman el alimento en forma de compuestos orgánicos de un sustrato o ser vivo que produzca celulosa o lignina, el cual aporta energía para la producción sus estructuras reproductivas (Chang y Quimio, 1982).

Los conidióforos poseen una pared áspera o de diminutas espículas y las cabezas conidiales son biseriales y los conidios son lisos (Mier *et al*, 2002) el conidio es globoso y grueso de 2,5 μm de diámetro, de color transparente y crecimiento tipo radial (ver Figura 10) (Sari *et al*, 2013).

Figura 10. Vista microscópica de *Aspergillus oryzae*

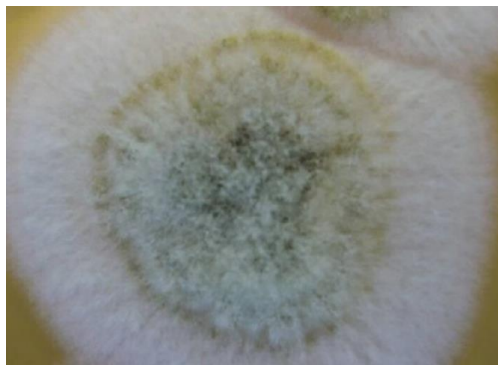


Fuente: (Vargas *et al*, 2011)

5.3.2.2. Macroscópica

Los colores de las colonias van desde verde, amarillo y una mezcla de los dos y el revés de la colonia es incoloro (Mier *et al*; 2002) y al madurar demasiado se torna de color café y en medio de cultivo Dox de Czapek alcanzan un diámetro de 4-5 cm en 7 días. Otros autores aseguran que el diámetro no se puede calcular por su forma de polvo amarillo y verde que luego termina siendo el medio (ver Figura 11) (Sari *et al*, 2013)

Figura 11. Colonia *Aspergillus oryzae*



Fuente: (Sari *et al*; 2013)

5.3.3. Crecimiento

Requiere de un sustrato poroso como el arroz (*Oryzae sativa* L) como en el caso de la producción de sake, ya que retiene gran cantidad de humedad y posee un centro de almidón, el cual el microorganismo utiliza como fuente de carbono orgánico (Arima y Uozumi, 2014) para convertir en azúcares y posteriormente en alcohol, siempre y cuando en los dos días de crecimiento máximo se mantenga una Temperatura de 30-36°C, aunque en la habitación es recomendable mantener 30-32°C y Humedad Relativa de 50-80% (Shinbashi y Ku, 2011). Aunque el arroz ha sido el sustrato ideal para multiplicar el microorganismo, sus enzimas solo se liberan de forma adecuada si se realiza un pulido del grano. El micelio puede penetrar en el sustrato sólido con la acción de 4 capas de penetración de micelio; La primera capa son las hifas, seguidas de las hifas aeróbicas húmedas y las hifas anaeróbicas húmedas, la última capa son las hifas penetrantes (Chancharoonpong *et al*, 2012).

5.3.4. Historia

En el 300 a.C *Aspergillus oryzae* es mencionado por primera vez en los Ritos de la dinastía Zhou en China. Su desarrollo es un hito en la tecnología de la comida china, en Japón desde el siglo III (Shimbashi y Ku, 2011) ya que proporciona el marco conceptual de los principales alimentos fermentados de soya: la salsa soya, miso y bebidas como el sake. El koji y la salsa soya se han elaborado desde el año 1000 a.C y desde entonces ha sido por medio de la fermentación en estado sólido (Chen, 2013).

5.3.5. La α -amilasa de *Aspergillus oryzae*

Los hongos se alimentan de forma adsortiva por lo cual utilizan enzimas para hidrolizar el almidón o fuente de Carbono orgánico, logrando que sea posible la asimilación por el microorganismo, lo anterior es evidencia una de las tantas reacciones químicas desarrolladas en el metabolismo primario donde se generan un gran número de moléculas como alcoholes y enzimas como amilasas, todo lo anterior ocurre durante el crecimiento exponencial del micelio (Roussos y Perraud-Gaime, 1996). Las enzimas que realizan esa función para tal hongo son, β -amilasa, almidón fosforilasa, una enzima desramificante, La glucoamilasa, γ -amilasa y α -amilasa (Schlegel, 1993), esta última es la enzima de *Aspergillus oryzae* que fue la primera en ser aislada con fines comerciales, ya que fue purificada y cristalizada a partir del preparado enzimático Takadiastase, el cual fue elaborado y patentado por Takamine, a causa de ello se la conoce como Takaamilasa lo que la hace estar históricamente ligada a la fermentación en medio sólido de allí el origen de su nombre (Gupta, 2008; Fogarty y Kelly, 1979).

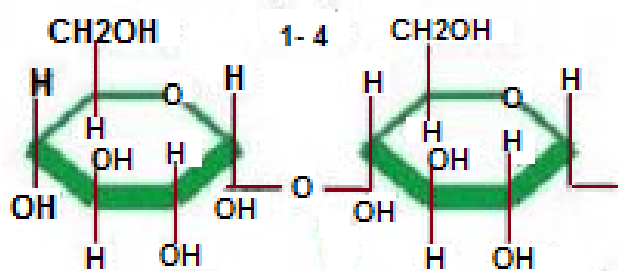
Tal enzima proveniente de *Aspergillus oryzae* es de las más comerciales con propósitos agroindustriales como preparación de pan y elaboración de bebidas alcohólicas (Espitia, 2009).

5.3.5.1. Estructura de α -amilasa.

También llamada α -1,4-glucan 4-glucanohidrolasa. EC 3.2.1.1, endo-amilasa, dextrinogénica, es una proteína monomérica de origen ácido que mantiene unida 10 átomos de Calcio por molécula debido a su carácter de metalo-enzima., además está constituida de una sola cadena poli peptídica de 478 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro intracatenarios (ver Figura 12) y un peso molecular de 42.000-53.000 daltons. (Terebiznik, 1998; Fogarty y Kelly, 1979), la α -amilasa está incluida en el grupo de endoamilasas por su forma de hidrolizar la

molécula de almidón, tal proceso también es conocido como sacarificación (Gómez, 2014), mediante el cual se realizan cortes internos reduciéndola rápidamente a fragmentos de cadenas de menor peso molecular, esta misma también se encuentra en tejidos vegetales, en especial en semillas que se encuentran germinando por ser ricas en almidón (Rondinone y Giovanniello, 2000).

Figura 12. α -amilasa en enlace alfa 1-4

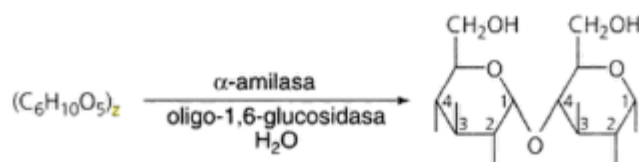


Fuente: (Polo y Quituisaca, 2010)

5.3.5.2. Hidrólisis de almidón por α -amilasa.

Los gránulos de almidón los cuales son insolubles en agua están formados por dos polímeros de glucosa: amilosa, que es lineal, y amilopectina, que es ramificada, para un almidón determinado, la velocidad de hidrólisis es dependiente del tipo de enzima, de las condiciones de hidrólisis y de las modificaciones físicas y químicas previas a la hidrólisis (Espitia, 2009). La degradación del almidón hacia la glucosa se cataliza por tres enzimas, β -amilasa, la almidón fosforilasa y α -amilasa esta última es la única en atacar un granulo de almidón intacto (Cruger y Cruger, 1993) descomponiendo y constituyéndose en moléculas glicosídicas (ver Figura 13) (Rondinone y Giovanniello, 2000).

Figura 13. Descomposición de α -amilasa

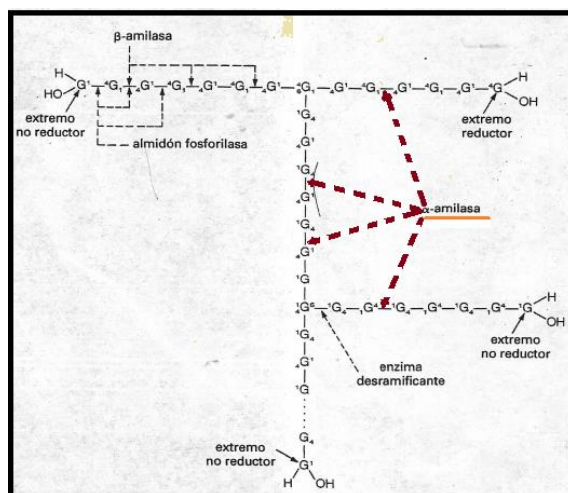


Fuente: (Rondinone y Giovanniello, 2000)

El calentamiento del almidón en suspensión acuosa ($60-75^\circ C$) mejora tanto la hidrólisis ácida como la susceptibilidad a la acción de las enzimas amilolíticas, ya que cambia la estructura granular a una gelatinización a causa del hinchamiento de la amilosa (Osorio et al, 1998) estos sucesos ocurren debido a los enlaces de hidrógeno de las moléculas que componen el almidón, las cuales son responsables de la absorción del agua (Pardo y Rivera, 2001) , debido a ello la α -amilasa requiere agua para realizar su función como biocatalizador así ataca enlaces alfa 1,4 , y como endoenzima que rompe cadenas al azar del almidón produciendo al final glucosa y maltosa (Espitia, 2009; Terebiznik, 1998).

La molécula amilopectina la cual es aún más compleja que la amilosa y presente en mayor proporción en el almidón (Pardo y Rivera, 2001), además de alta viscosidad tiene un extremo reductor y dos no reductores donde está presente la glucosa (G), también aparecen los α -1,4 entre glucosas y un enlace α - 1,6, donde α -amilasa hidroliza al azar enlaces α -1,4 glucosídicos exceptuando los extremos (ver Figura 14) (Cruger y Cruger, 1993; Schlegel, 1993).

Figura 14. Puntos de ataque degradativo sobre la amilopectina por α -amilasa, β -amilasa, almidón fosforilasa y una enzima desramificante.



Fuente: (Schlegel, 1993)

5.3.5.3. Condiciones para la producción enzimática.

La baja humedad en la fermentación en estado sólido permite que los microorganismos sean más capaces de producir varias enzimas y metabolitos que normalmente no se producirían en una fermentación por inmersión (Chancharoonpong *et al*, 2012). La temperatura de máxima producción de α -amilasa es 30-32°C, la actividad enzimática es óptima en un pH cercano a 6 (Pardo y Rivera, 2001), El tiempo de máxima producción de la misma llega a 48 horas (Chancharoonpong *et al*, 2012), el calcio es necesario para la actividad catalítica de la enzima; además en presencia de tal catión la α -amilasa es más resistente a máximas condiciones de pH y temperatura, existe un tiempo máximo de incubación para luego generar subproductos que inhiben el desarrollo fúngico (Gupta *et al*, 2008; Terebiznik, 1998).

Las características del sustrato y las condiciones de cultivo son determinantes en la actividad enzimática, en presencia de concentraciones de sustrato elevado ha sido comprobado

que la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* cataliza reacciones de transglicosilación paralelo a esto la relación biocatalizador y sustrato aumenta el nivel de constitución enzimática. (Chancharoonpong *et al*, 2012; Graber y Combes. 1989), al igual que la cantidad de almidón y la maltosa son inductores para la actividad de α -amilasa (Gómez, 2014)

Esta enzima lidera diversos procesos industriales que incluyen generación de bebidas alcohólicas, llevando a la producción de glucosa y a la subsecuente fermentación de las bebidas, teniendo en cuenta condiciones de hidrólisis o temperatura (Espitia, 2009), además la producción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* está directamente relacionada con las características del sustrato, lo cual infiere que el crecimiento de micelio del microorganismo es directamente proporcional a la generación enzimática (Chancharoonpong *et al*, 2012).

En el caso del sake se podría contemplar que entre más enzima produzca el hongo mayor cantidad de almidón degrada para su posterior producción de azúcares benéficas en la elaboración de tal bebida (Shinbashi y Ku, 2011).

La actividad de la enzima se determina mediante el análisis de la disminución de la solución de yodo o lugol a formar el color azul por la concentración del almidón (Espitia, 2009), y para el análisis espectrofotométrico la longitud de onda que ha determinado para la actividad enzimática como catalizador del almidón y por su coloración en presencia de lugol es de 620nm (Smith y Roe, 1948). El incremento de la actividad enzimática de α -amilasa conlleva a un descenso de la acidez del medio y a una disminución de la cantidad de almidón en el mismo (Osorio *et al*, 1998).

5.4. Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido o de sustrato sólido se ha mencionado desde hace cientos de años, pues es considerada como la técnica que descubrió el hombre para manejar muchos microorganismos benéficos de uso agroindustrial y farmacéutico. Este bioproceso fue restringido en la biotecnología moderna y retomada por el suceso de la penicilina y abandonado levemente debido a la sumergida. Este método es la perfecta imitación con el medio en el que se desarrolla el microorganismo de forma silvestre, en la mayoría de los casos la FES involucra hongos además en algunos casos levaduras y bacterias (Mitchell et al, 2006).

La FES ocurre como un bioproceso donde el microorganismo que se desarrolla en este medio sólido con la ausencia de agua libre, así el sustrato o lecho proporciona todos los nutrientes esenciales para su crecimiento (Terebiznik, 1998) es decir una fase de gas continua y una disminución del agua a simple vista (Mitchel et al, 2006) y el soporte necesario para el anclaje de todas las estructuras que componen el hongo. El sustrato de origen orgánico participa en la fermentación pasando por una serie de cambios químicos como consecuencia del metabolismo del microorganismo en presencia de oxígeno, lo cual al finalizar genera varios productos como metabolitos (enzimas, etanol etc.) y biomasa (células microbiológicas) (Hernández *et al*, 2003).

Un ejemplo importante de la relevancia de este proceso es el proceso del koji para la producción de salsa soya y el sake, con la invasión de *Aspergillus oryzae* en granos de soya y arroz respectivamente en un tiempo de 2-3 días máximo, para obtener después la salsa y la fermentación necesaria (Mitchell et al, 2006).

5.4.1. Proceso fermentativo

Inicialmente se hace una preparación y alistamiento del inóculo a multiplicar o procesar luego se llega a la reparación del sustrato adecuado es decir lo concerniente a lavado, remojado o cocción, posteriormente se hace la elección y preparación del biorreactor o fermentador para seguir con la inoculación y carga disponiendo de las condiciones adecuadas según el propósito para proceder a la operación y descarga del mismo, finalmente si es necesario el procesamiento de aguas y eliminación de desechos (Mitchell *et al*, 2006).

5.4.2. Principales características y diferencias de la fermentación en estado sólido y líquido

Se han evaluado fines a los cuales disponer la fermentación en estado sólido además de compararla con la fermentación en estado líquido, ambas tienen ventajas y desventajas (ver Tabla 3).

Los factores de importancia para FES, son el sustrato, oxígeno, humedad y temperatura.

Debido a que la fermentación en estado sólido es un proceso aerobio allí los microorganismos producen más energía con respecto a la líquida, si hay mayor concentración de oxígeno habrá mayor producción de biomasa, pero si es menor se generará etanol (Hernández *et al*, 2003).

Tabla 3. Principales diferencias entre la fermentación en estado sólido y líquido.

Fermentación en estado sólido	Fermentación en medio líquido
El medio de cultivo no fluye	El medio de cultivo fluye.
Usualmente La profundidad del medio es pequeña.	La profundidad del medio de fermentación es alta.
Se utiliza un único sustrato, por lo general insoluble.	Se utilizan diferentes sustancias solubles.
El medio sólido absorbe agua y se humedece para permitir el acceso a los nutrientes.	Los nutrientes están homogéneamente distribuidos en el medio y están siempre disponibles.
La cantidad de agua es la suficiente para permitir un crecimiento y metabolismo óptimo del microorganismo.	El agua es el componente mayoritario del medio de fermentación.
El sistema involucra tres fases: Sólida, líquida y gaseosa.	Involucra principalmente dos fases: líquida y gaseosa.
La fermentación no se realiza en condiciones asépticas	Todo el sistema está en condiciones asépticas
Solo requiere control de Temperatura, la oxigenación y la humedad.	Es generalmente esencial el control de todas las variables de fermentación.

Alta relación inóculo-medio	Baja relación inóculo- medio.
La aireación provee el oxígeno y remueve el calor metabólico y los productos gaseosos.	La aireación provee el oxígeno en la fase acuosa y remueve los productos gaseosos.
Usualmente no requiere de agitación.	La agitación es esencial.
El crecimiento fúngico involucra la penetración de las hifas en las partículas del sustrato sólido.	El crecimiento fúngico ocurre bajo la forma de micelio o de pellets de micelio uniformemente distribuidos.
Las bacterias y levaduras crecen adheridos a las partículas del sustrato sólido.	Las bacterias y levaduras crecen uniformemente distribuidos en el líquido agitado.
Productos de la fermentación muy concentrados.	El medio es líquido y los productos de la fermentación terminan mal diluidos.

Fuente: (Mitchell y Lonsane, 1992)

La fermentación en estado sólido produce 10 veces más enzimas que en la líquida e igualmente más económica que la misma debido a la nula aireación forzada, poca asepsia y pocas variables por controlar. El mayor problema de la fermentación en estado líquido es el alto consumo de energía y fácil contaminación del medio donde se desarrolla, conservando el recurso hídrico (Chen, 2013).

5.4.3. Variables de importancia

El bioproceso de FES puede tener varios propósitos y debido a ello se manejan las variables según el mismo (Terebiznik, 1998), aquí se especificaran lo concerniente a la producción de biomasa que es el fin del presente trabajo.

5.4.3.1. Oxígeno.

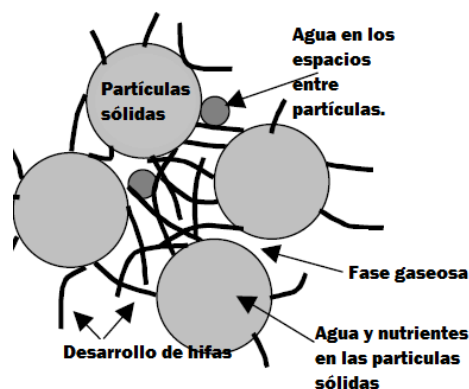
Si es controlado por medio de un biorreactor no puede haber dificultad, pero si se manejan fermentadores más convencionales o artesanales como en bandeja, se controla la altura del lecho para que haya recirculación del oxígeno debido a la porosidad (Reinoso, 2015).

5.4.3.2. Sustrato.

Generalmente son productos o subproductos de la agricultura, pero se dividen en dos grupos: De soporte nutricional (Frijol, arroz, salvado de trigo etc.) o de soporte inerte (Paja, aserrín o algún bagazo) (Chen, 2013), la calidad y el contenido del agua del mismo es importante, pues es la que tendrá disponible el microorganismo a lo largo del proceso, por ello el agua disponible es únicamente la que se encuentra en el interior del sustrato (Moo- Young et al, 1983). Pero existe una fase gaseosa precedida de una líquida la cual está participando en el interior y exterior de las partículas del sustrato (ver Figura 15).

Si el sustrato se encuentra en un biorreactor de bandeja la altura del mismo definirá la porosidad y por ende la remoción de calor, el oxígeno en el medio de la fermentación (Reinoso, 2015).

Figura 15. Relación entre partícula sólida con el estado líquido y gaseoso



Fuente: (Mitchell et al, 2006 y Chen, 2013).

5.4.3.3. Temperatura.

Es uno de los factores más limitantes y depende mucho del biorreactor utilizado, la temperatura limita el crecimiento del microorganismo así mismo la producción de la enzimas (Terebiznik, 1998).

5.4.3.4. Humedad.

La humedad del sustrato es de gran importancia pues un exceso altera el crecimiento del microorganismo pero al presentarse gran disminución se anulara el crecimiento enzimático a causa de la poca solubilidad de los nutrientes (Reinoso, 2015). De la combinación de temperatura y humedad óptima se produce una significativa reducción del tiempo en el cual se obtiene el máximo de producción enzimática, el mismo pasó de 72 a 48 h (Terebiznik, 1998).

5.4.4. Tipos de biorreactores

En el desarrollo de la fermentación en estado sólido se aclaran tres aspectos: el producto obtenido, la cepa productora y el ambiente o metodología de producción (Chen, 2013). El tipo

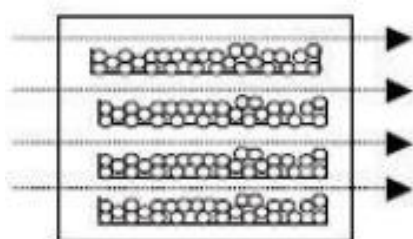
de fermentador define la metodología y el manejo de la misma, siempre dando las condiciones idóneas para la reproducción del microorganismo, Existen cuatro grupos de biorreactores: I (De bandeja), II (Tambores agitado y rotatorio), III (lecho empacado) y IV (lecho fluidizado solido-gas, lecho agitado y tambor oscilante) (Mitchell *et al*, 2006).

5.4.4.1. *Bandeja*

Se caracterizan por su aireación no forzada y sin agitación, posee una cámara con varias bandejas móviles con el propósito de regular la Temperatura con la posibilidad de utilizar aire húmedo para controlar la humedad (Chen, 2013) (ver Figura 16), teniendo en cuenta la altura del lecho de 6 cm máximo para garantizar la remoción de Temperatura y porosidad adecuada para la buena producción de biomasa y la difusión de la parte gaseosa con la masa, es importante debido al gradiente creado entre la parte gaseosa del proceso entre las partículas del sustrato(Mitchell *et al*, 2006).

Cuando se habla de un proceso de fermentación en bandejas a escala no se debe aumentar la altura del sustrato sino aumentar la cantidad de bandejas y el área donde permanecen considerando la misma altura debido a lo mencionado anteriormente.

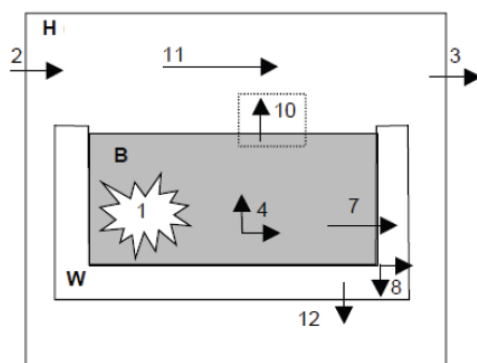
Figura 16. Biorreactor de bandeja.



Fuente: (Reinoso, 2015).

Hay ciertos fenómenos y su movimiento en el interior del fermentador de bandeja (ver Figura 17).

Figura 17: Macro escala de los fenómenos de transferencia de calor y masa dentro y entre los diversos subsistemas en el biorreactor del grupo I.

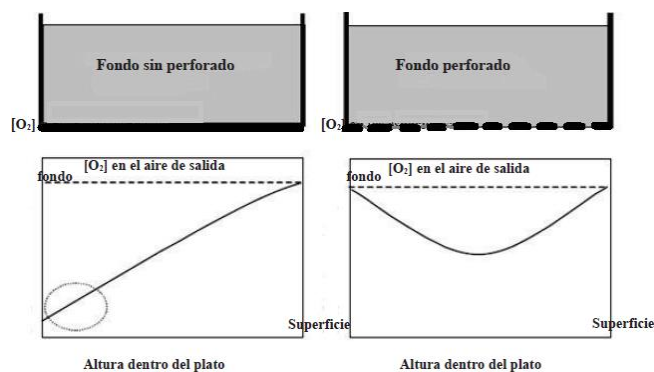


(H) espacio de cabeza; (W) pared; (B) sustrato; (1) Liberación de desperdicio de calor metabólico durante el crecimiento y mantenimiento; (2) Entrada de masa y energía en el aire de entrada; (3) Salida de masa y energía en el aire de salida; (4) Conducción y difusión dentro del sustrato; (5) Flujo de energía convectiva y masa dentro de la cama debido a la aireación; (6) flujo de sólidos debido a la mezcla; (7) transferencia de calor del sustrato a la pared; (8) conducción de calor dentro de la pared del biorreactor; (9) transferencia de calor de la pared a los alrededores; (10) Transferencia de masa y energía de la cama al espacio de cabeza; (11) Flujo de aire dentro del espacio de cabeza; (12) Transferencia de calor de la pared al espacio de cabeza

Fuente: (Mitchell *et al*, 2006).

Para garantizar una mejor remoción de la Temperatura y una mejor recirculación del Oxígeno se podría tomar el biorreactor de bandeja con el fondo perforado (ver Figura 18). Pero también es frecuente hacer la agitación a mano y pueden estar contruidos de madera, bambú o plástico (Mitchell *et al*, 2006).

Figura 18. Distribución del oxígeno entre las bandejas no perforadas y perforadas



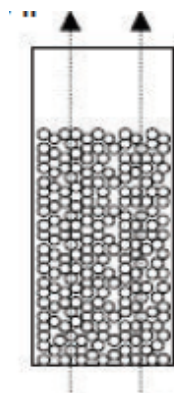
Fuente: (Mitchell *et al*, 2006)

El círculo punteado muestra la limitación en la eliminación de calor desde esta área.

5.4.4.2. *Lecho empacado.*

En este tipo de biorreactor se presenta un mezclado intermitentemente o casi una vez por día siendo muy eventual, provocando una circulación constante de aire pero posee la ventaja de bajar la presión y Temperatura debido a la agitación (ver Figura 19) (Chen y Zhun 2013 y Mitchell *et al*, 2006).

Figura 19: Esquema reactor de lecho empacado



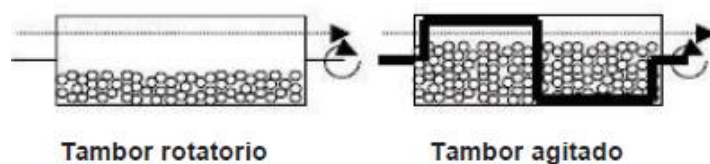
Fuente: (Reinoso, 2015)

Aunque es evidente que presenta un mayor costo del mecanismo comparándolo con el biorreactor de bandeja, presentando una agitación eventual aunque el sustrato permanece estático la mayor parte del tiempo (Mitchell *et al*, 2006).

5.4.4.3. *Tambor rotatorio y tambor agitado*

Se reconocen o trabajan bajo aireación no forzada y con agitación intermitente del sustrato, está compuesto por un tambor que llega a girar en un mismo eje (ver Figura 20), así se llega a una recuperación de la presión, remoción del calor y circulación del oxígeno más eficiente, siendo también una opción la de aplicar agua en medio del proceso (Reinoso, 2015)

Figura 20: Esquema biorreactor de tambor rotatorio y agitado

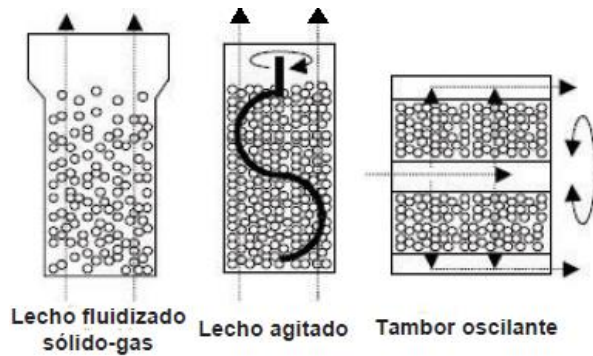


Fuente: (Reinoso, 2015)

5.4.4.4. *Aireación forzada y mezclado intermitente o continuo*

Aunque se subdividan en dos grupos se presentan tres modelos de lecho fluidizado solido-gas, lecho agitado y tambor oscilante (ver Figura 21), donde la operación es similar entre los tres siendo operados por un agitador mecánico o por acción del flujo de aire que puede darse permitiendo una aireación más uniforme no obstante en cada diseño habrán variaciones con respecto al producto final (Mitchell *et al*, 2006 y Reinoso, 2015).

Figura 21. Esquema de biorreactor con aireación forzada y mezclado intermitente o continuo

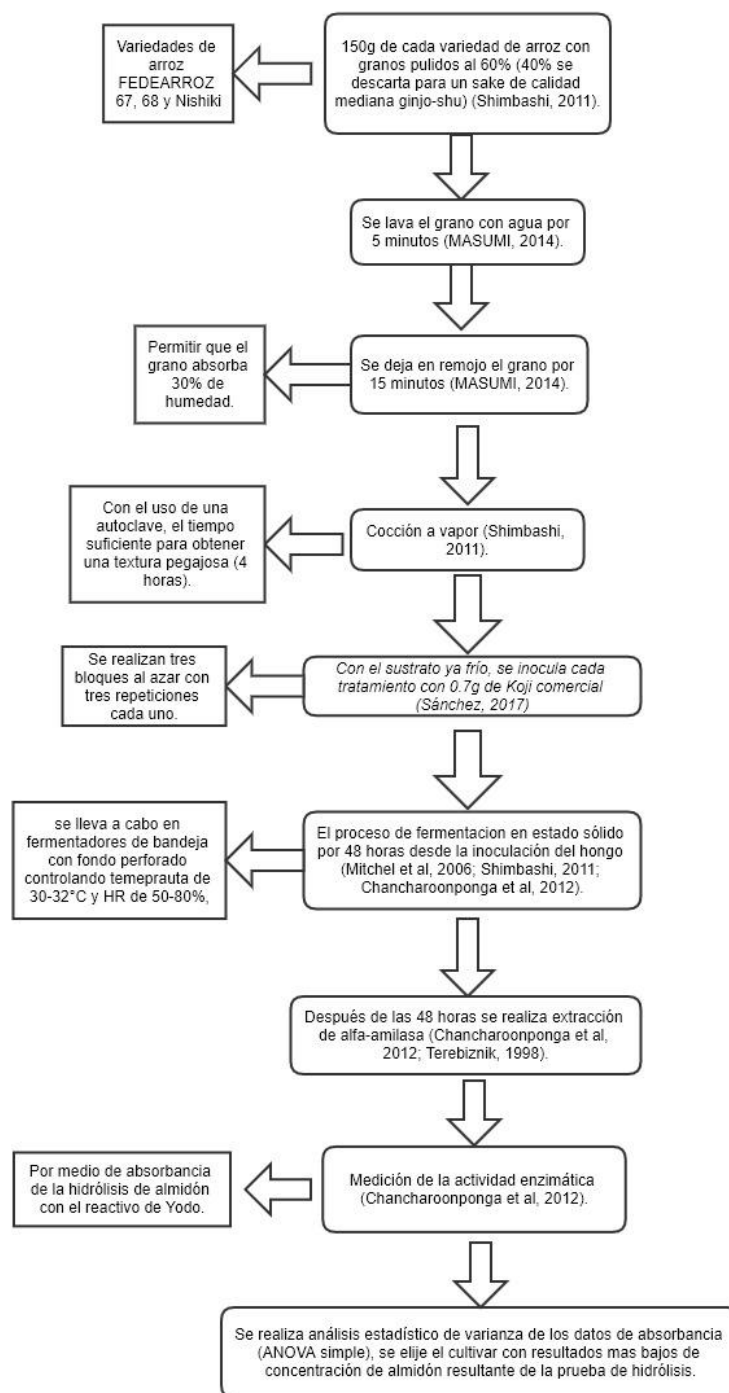


Fuente: (Reinoso, 2015)

Este sistema está restringido a hongos con poca tolerancia al mezclado a diferencia de las bacterias aunque hubo un caso donde al sembrar *Aspergillus oryzae* creció debajo de la capa de la semilla de trigo así tolerando el corte del mezclado pero si no hubiera sido así es posible un límite para su desarrollo en especial por disponibilidad de Oxígeno en medio del proceso (Mitchell *et al*, 2006).

6. Metodología

Figura 22. Metodología planteada para determinación de actividad enzimática de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en tres diferentes cultivares de arroz (*Oryzae sativa*L.)



6.1. Diseño experimental de bloques al azar

Se evalúan tres tratamientos, los cuales son cultivares de arroz Nishiki (T1) Fedearroz 68 (T2) y 67 (T3) (ver Figura 23) y tres repeticiones o bloques cada una.

- Factores: Un cultivar de arroz
- Variantes: Cultivares 68,67, Nishiki
- Variable respuesta: Producción de α -amilasa
- Hipótesis: ¿Existen diferencias de la producción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae*

entre los tres cultivares de arroz?

$$H_0 = V_1 = V_2 = V_3$$

$$H_1 = \exists i, j ; i \neq j / V_1 \neq V_2 \neq V_3$$

Figura 23 Cultivares de arroz: Arriba derecha FEDEARROZ 67. Arriba izquierda Nishiki y abajo FEDEARROZ 68



6.2. Determinación de actividad enzimática

6.2.1. Preparación del arroz

Para llevar el proceso hacia el sake de calidad intermedia o también llamado “Junmai ginjo-Shu”, las dos variedades de Fedearroz se han obtenido pulidas al 60%, es decir se descartó el 40% de la capa externa del grano, en el que se incluye vitaminas, grasas y proteínas indeseables en la fermentación con *Aspergillus oryzae* (Shinbashi, Ku, 2011).y el arroz japonés Nishiki como se encuentra comercialmente en Colombia para elaboración de sushi.

6.2.2. Lavado y remojo del arroz

Se pesa 150 g de cada repetición de los tratamiento en una balanza, posteriormente se hace lavado con agua por 4 minutos o hasta permitir que el agua quede traslucida (ver Figura 24) y para que pueda absorber al menos 30% de humedad se deja en remojo por 20 minutos en baldes convencionales (ver Figura 25) con el fin no pierda suficiente agua en la cocción al vapor (MASUMI, 2014).

Figura 24. Lavado de arroz



Figura 25. Remojo de arroz



6.2.3. Cocción al vapor

En una autoclave de olla se cosen al vapor las tres diferentes cultivares por 4.5 h en 70-75°C en bolsas de tela (ver Figura 26) (Shinbashi, Ku, 2011; MASUMI, 2014). El arroz al vapor es menos húmedo y pegajoso que el arroz hervido y permite la gelatinización del grano, por lo que es ideal para su uso en el crecimiento adecuado de *A. oryzae* (Osorio *et al*, 1998 y Shinbashi y Ku, 2011).

Figura 26. Cocción al vapor en autoclave de olla



La cocción tomó más tiempo del propuesto en la metodología tradicional por que se valoró la gelatinización del grano, la cual se puede observar al aplastar varios granos con las palmas de las manos y se forma una masa compacta (ver Figura 27) (MASUMI, 2014).

Figura 27. Gelatinización del grano de arroz



6.2.4. pH inicial del sustrato

Debido a que el pH es un factor de importancia para la producción enzimática (Chancharoonpong *et al*, 2012), se toma el pH para tener en cuenta en los resultados de producción de α -amilasa. Se toma 1g del arroz ya cocido de cada uno de los tratamientos, se mezcla con 10ml de agua destilada, se maceran los granos con mortero de porcelana, se deja en agitador rotatorio por 20 minutos y se toma el pH del suspendido resultante con pHmetro de electrodo.

6.2.5. Inoculación con *Aspergillus oryzae*

Después de que los tres cultivares de arroz estén fríos y teniendo el inóculo del hongo *Aspergillus oryzae* en forma de koji comercial (ver Figura 28), se agrega 1.2g (Sánchez, 2017)

del mismo en el total del peso de arroz (Shimbashi y Ku, 2011) se dispersa a cada una de las tres repeticiones de 150g de arroz, logrando que las esporas del hongo sean las que inicien el proceso de fermentación (MASUMI, 2014)

Figura 28. Koji comercial de *Aspergillus oryzae*



Se recomienda 10g de Koji-Kin para 6Kg de arroz para producir 22 litros de sake (Sánchez, 2017).

6.2.6. Fermentación en estado sólido en bandejas

Debido a que por medio de este proceso anaerobio se generan los productos derivados de *Aspergillus oryzae* (Cruz, 2007; Pastrana, 2002), se utilizan fermentadores de bandeja de madera con la base perforada (ver Figura 28) a una altura del lecho o sustrato de 1.5cm (figura 29) (Reinoso, 2015). Con lo anterior se toma en cuenta la forma en que tradicionalmente se hace la fermentación en estado sólido del sake en Japón con bandejas de madera (MASUMI, 2014). Se lleva a cabo el proceso en el laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad Nacional de Colombia en cámara de ensayo ambiental versátil SANYO modelo MLR-351H a una temperatura de 31°C (ver Figura 30) controlando humedad relativa en un rango de 50-80%.

Figura 29. Fermentador de bandeja en madera



Figura 30. Altura del sustrato de 1.5cm



Figura 31. Fermentación en cámara de ensayo ambiental versátil SANYO modelo MLR-351H



Debido a que en medio del proceso de FES la temperatura va aumentando debido a la actividad metabólica del microorganismo, la cual nunca será la misma del aire con respecto al sustrato (Reinoso, 2015), por ello en el cuarto o incubadora se mantiene de 30-32°C (Shimbashi y Ku, 2011).

6.2.7. Monitoreo de la fermentación

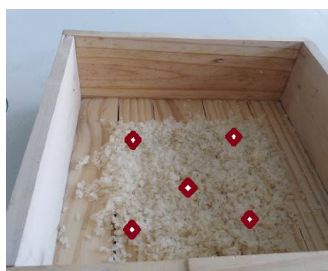
Se verifica temperatura y humedad relativa, se hace un mezclado de sustrato a cada uno de los tratamientos (ver Figura 32), como se realiza el método tradicional para brindarle más aireación y proliferación del hongo en todo el sustrato (MASUMI, 2014).

Figura 32. Agitación de sustrato



Después de 72 horas de fermentación se hace un muestreo sistemático en X para tomar 5 submuestras (ver Figura 33) que posteriormente compongan la muestra a la que se va a realizar la extracción enzimática y la prueba de hidrólisis de almidón

Figura 33. Muestreo sistemático en tratamientos de fermentación en estado sólido.



6.2.8. Extracción enzimáticas

La actividad enzimática se estableció por el consumo de almidón o hidrólisis en el sustrato en presencia de lugol o colorante de Yodo con la metodología combinada de Chancharoonpong *et al*, 2012 y Terebiznik, 1998. Después de 48 horas de fermentación se hace extracción de la α -amilasa y demás enzimas extracelulares producidas por el hongo en el laboratorio de calidad y poscosecha de productos agrícolas en la Universidad Nacional de Colombia. Se agregó 10 mL de solución de NaCl (1%) por cada gramo de sustrato. El sustrato fue disgregado con varilla de vidrio y puesto en plancha de agitación a 28°C durante 20 minutos (ver Figura 34), el extracto acuoso fue separado de los sólidos filtrando a través de una gasa (ver Figura 35) y fue centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos para eliminar los conidios y restos de micelio en centrífuga Jouan MR 23 (ver Figura 36). Si no se hace la determinación de la actividad enzimática en el instante el extracto se almacena a -20°C hasta su uso (Chancharoonpong *et al*, 2012; Terebiznik. 1998)

Figura 34. Sustrato en solución NaCl (1%) a 28°C en plancha de agitación.



Figura 35. Filtración de extracto acuoso



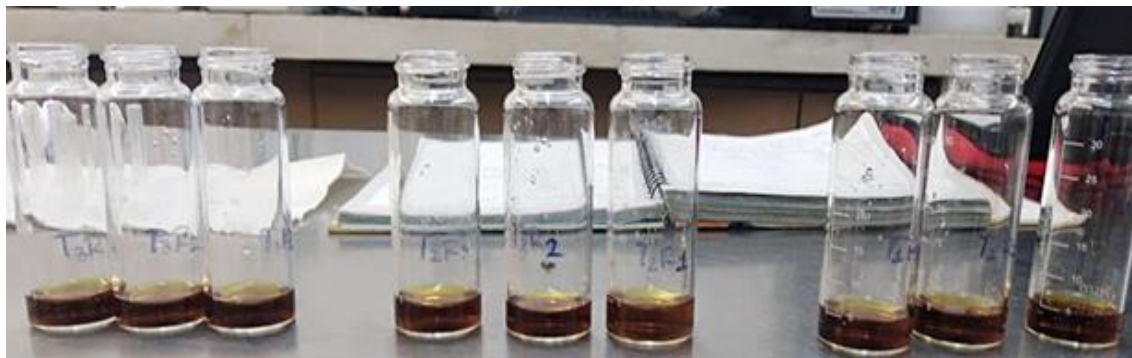
Figura 36. Extracto separado de conidios y restos de micelio después de centrifugar



6.2.9. Determinación de actividad de α -amilasa

Se utilizó una modificación del método de Chancharonpong *et al*, 2012. El procedimiento seguido fue: 10 μ L de extracto enzimática de la fermentación fueron incubados con 500 μ L de una solución 0.05% de almidón soluble ($C_6H_{10}O_5$) en buffer acetato 0.1 M, pH 5 durante 7,5 minutos a 37°C en incubadora industrial agua destilada finalmente se detuvo la reacción con 500 μ L de lugol y se aforó a 5mL con agua destilada (ver Figura 37),

Figura 37. Reacción de extracto enzimático con Buffer de acetato y lugol



La actividad amilasa se analiza espectrofotométricamente a 620 nm en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS, según esta longitud de onda es la máxima de relación almidón-Yodo, entre más actividad del catalizador haya, los valores se van a acercar a longitudes más bajas al presentar ausencia del almidón, presentándose una relación indirectamente proporcional (Torres *et al*, 2013; Sarmiento *et al*, 2003; Osorio *et al*, 1998 y Smith y Roe, 1948).

Tal prueba se realiza bajo el concepto de absorbancia debido a que no solo se va a hallar la luz absorbida por el compuesto sino que es directamente proporcional a la concentración del almidón, lo anterior define que si hay más cantidad de moléculas será mayor la interacción con la luz mediante longitudes de onda (Abril *et al*, 2000).

Después con los datos obtenidos se hace el análisis de varianza (ANOVA) para demostrar aceptación o rechazo de la Hipótesis nula, además se halla la varianza y desviación estándar de cada tratamiento en el programa Excel office.

6.2.10. Curva de calibración de almidón

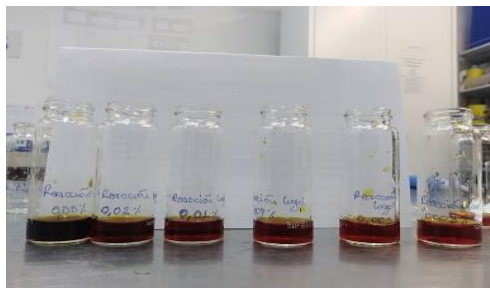
Se realizan diluciones seriadas para 5 mL de volumen final, permitiendo dilución por calor tomando como concentración inicial 0.05% con almidón soluble como solución madre (5mg/mL), en buffer de acetato 0.1M y pH 5, para hacer reaccionar las respectivas soluciones con 500 μ L lugol (Sarmiento *et al*, 2003), debido a de que a partir de 0.05% se realizan la evaluación de actividad enzimática con las muestras y en términos de concentraciones se va tiene en cuenta la concentración del almidón en μ g/mL (ver Anexo 3).

Solución de almidón soluble 0.01% (0.0025gr) con buffer de acetato y 500 μ L de lugol (solución madre) (100 μ g/mL) y blanco: 4.5mL de buffer de acetato con 500 μ l de lugol.

1. 0.0005%, 0.25mL de solución madre (5 μ g/mL)
2. 0.0003%, 0.15mL de solución madre (3 μ g/mL)
3. 0.0001%, 0.05 ml de la solución madre (1 μ g/mL).
4. 0.00008%, 0.04 ml de la solución madre (0.8 μ g/mL).
5. 0.00005%, 0.025mL de la solución madre (0.5 μ g/mL).
6. 0.00003%, 0.015mL de la solución madre (0.3 μ g/mL).
7. 0.00001%, 0.005mL de la solución madre (0.1 μ g/mL) (Figura 38).

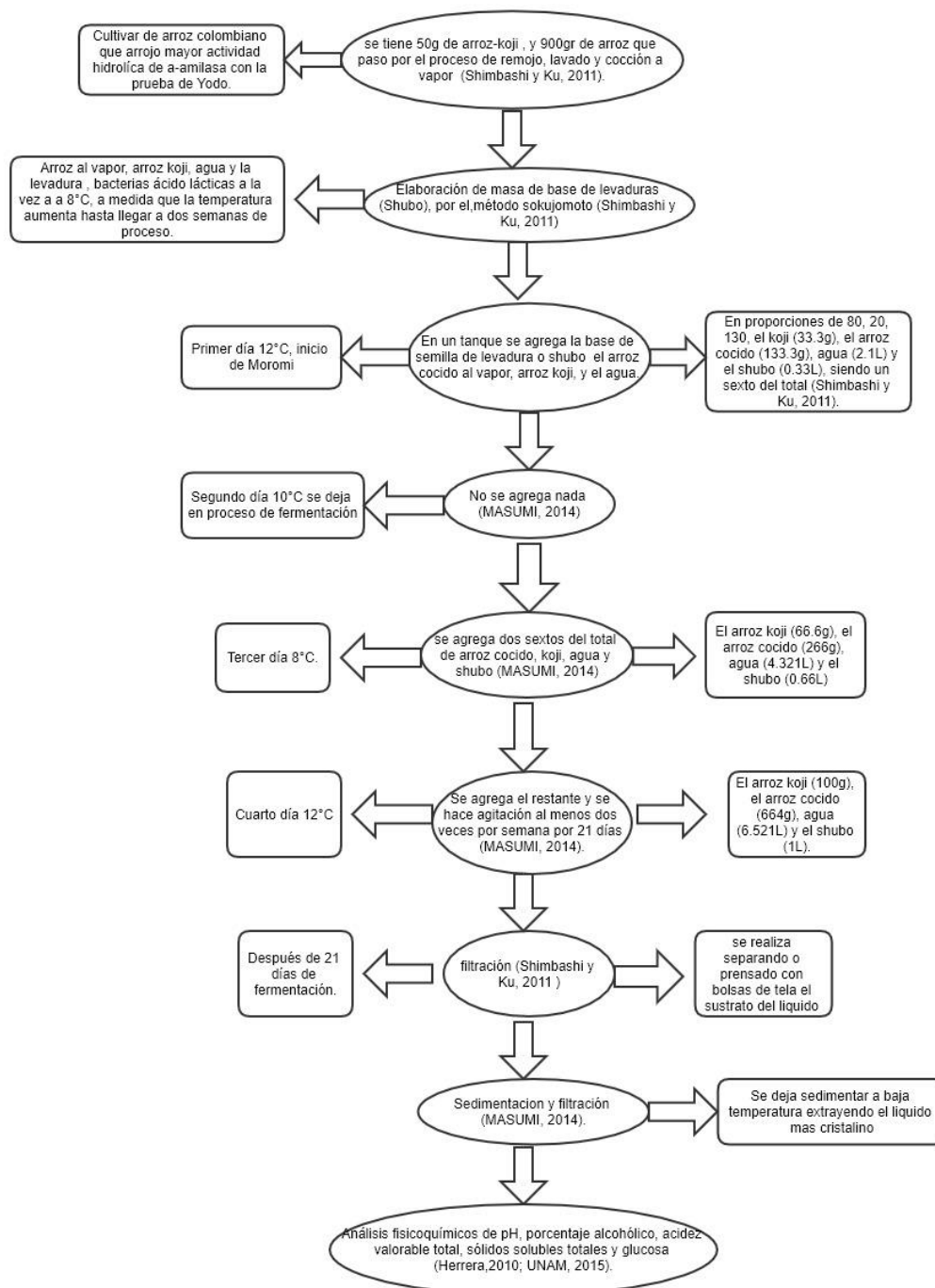
Se realiza lectura en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS a 620nm.

Figura 38. Diluciones de diferentes concentraciones de almidón soluble



6.3. Preparación de bebida tipo sake

Figura 39. Metodología para elaboración de sake con variedad de arroz nacional con mayor actividad de α -amilasa de *Aspergillus oryzae*



Con el cultivar colombiano que arrojó los resultados más altos en la medición de actividad de α -amilasa a causa de presencia de menor concentración de almidón con la prueba de lugol en absorbancia, se continúa el proceso hasta la obtención de sake en el laboratorio de calidad y poscosecha de productos agrícolas en la Universidad Nacional de Colombia.

6.3.1. Shubo.

Se lleva acabo con arroz cocido 1.23 Kg, koji 250g, agua 2L, 5g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y bacterias acido lácticas por 4 días (ver Figura 38).

Figura 40. Shubo con proceso de 3 semanas



6.3.2. Moromi.

Proporción de 80% arroz cocido, 20% de koji, 130% agua; 5 L de agua, 3.Kg de arroz cocido, 600g de arroz koji en un contenedor de 20L

6.3.2.1. Primer día

Se agrega 0.86L de agua cristal, 0.5Kg de arroz cocido, 100.g de koji, 0.33L de shubo, se mantiene a 12°C (ver Figura 41).

Figura 41. Primer día de elaboración de Moromi



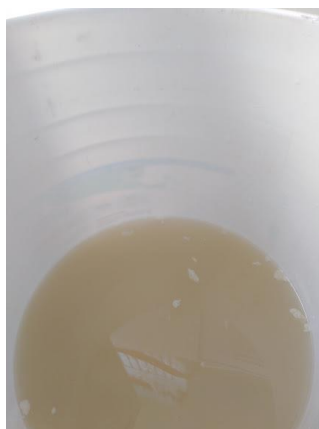
6.3.2.2. Segundo día.

Se mantiene a 10°C

6.3.2.3. Tercer día.

1.72L de agua cristal, 1Kg de arroz cocido, 200g de koji, 0.66L de shubo, se mantiene 8°C (ver Figura 42).

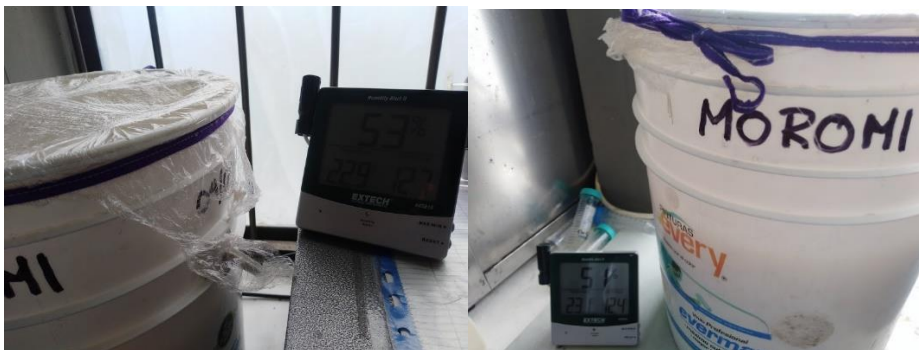
Figura 42. Tercer día de elaboración de Moromi



6.3.2.4. Cuarto día.

2.42L de agua cristal, 1.5Kg de arroz cocido, 300gr de koji, 1L de shubo, se mantiene a 12°C y luego hasta 20-21 días se deja fermentando a 20°aproximadamente (ver figura 43).

Figura 43. Fermentación de Moromi durante 20 días



6.3.2.5. Filtración.

Se realiza la filtración de la bebida con bolsas de tela recolectando el líquido turbio resultante (ver Figura 44).

Figura 44. Filtración de bebida tipo sake



6.3.2.6. *Decantación.*

Se deja decantar el líquido tomando el sobrenadante como líquido final, menos turbio y al que se le realizan los siguientes análisis fisicoquímicos (ver figura 45).

Figura 45. Decantación de la bebida tipo sake en refrigerador y bebida resultante



6.4. **Análisis fisicoquímicos de la bebida tipo sake**

Se llevan a cabo en el laboratorio de calidad y poscosecha de productos agrícolas en la Universidad Nacional de Colombia, así caracterizar la bebida elaborada como tipo sake extrapolando con algunas características químicas de tal licor (ver Tabla 2).

6.4.1. **Porcentaje alcohólico**

Se presenta como la relación entre el volumen de alcohol en estado puro (alcohol etílico), contenido en la bebida a una temperatura de 20°C y el volumen total del mismo (Castro, 2012; UNAM, 2015), En el sake se presenta entre 13-17% (Shimbashi y Ku, 2011). Se introduce la bebida tipo sake en una probeta de 250mL enjuagada muy bien anteriormente con agua luego con un poco del licor y se introduce un densímetro dando vueltas para eliminar burbujas y al

detenerse sin tocar las paredes (ver figura 46) se toma la medida de la densidad inicial y la final, aplicando la siguiente formula;

$$\%alc. = (D.ini - D.fin) * 125 * 1.25$$

Dónde: D.ini es la densidad inicial y D.fin es la final

Figura 46. Lectura de densidad con aerómetro.



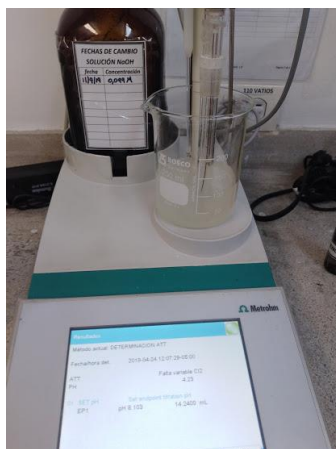
6.4.2. Acidez titulable total (AVT).

En el sake se encuentra entre 0.1-0.2 g/100 mL (Shimbashi y Ku, 2011), desde un titulador analítico Metrohm 916. Se adiciona 2 gotas de indicador de fenolftaleína (pH 8.3-10) a 100 mL de la bebida luego se agrega hidróxido sódico 0.1 o 0.5 N (ver Figura 47), tomando registro del gasto del mismo (Herrera, 2010), se toma la acidez titulable a tres muestras llegando al promedio. Para la determinación se tiene en cuenta Meq de ácido succínico (0.059) el cual está en mayor proporción en tal licor, aplicando la siguiente formula;

$$\%de\ acidez = (TNaOH * NNaOH * Meq\ ácido\ succínico * 100) / Vm$$

Dónde: VTNaOH es el gastado durante el ensayo, NNaOH es la Normalidad, Vm es la cantidad de la muestra utilizada para la prueba (Plaza y Zung, 2011).

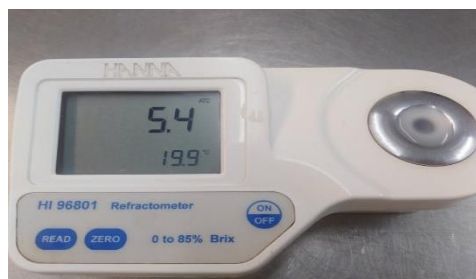
Figura 47. Titulación de bebida tipo sake



6.4.3. Sólidos solubles totales (°Brix).

En el sake como el vino esta entre 7-11°Brix (Salazar y Urrutia, 2013) Corresponde a los azúcares contenidos en la solución, usualmente se da en porcentaje en peso de sacarosa, se realiza adicionando unas gotas de la bebida al refractómetro HI 96801 HANNA de 0-85% (ver Figura 48) tomando tres mediciones para obtener un promedio de la muestra (Herrera, 2010).

Figura 48. Medición de sólidos solubles totales en bebida tipo sake



6.4.4. Potencial de Hidrogeno (pH).

El valor de pH advierten una sulfuración, a través de la cual pueden esconderse defectos de su calidad, importante para la carga y la actividad enzimática (UNAM, 2015), en el sake se encuentra entre 4.2-4.7 (Shimbashi y Ku, 2011). Se realiza con pHmetro HANNA HI 8314 a 15 mL de la bebida estando a 20°C (ver Figura 47).

Figura 49. Lectura de pH de bebida tipo sake a 20°C.



7. Resultados

7.1. PH inicial de los tratamientos.

Se evidenció que el promedio del tratamiento 3 (FEDEARROZ 67) presentó un pH más alto con respecto a los otros dos tratamientos siendo 6.67 y la menor desviación estándar de 0.16, el más bajo fue el tratamiento 1 (Nishiki) llegando a 5.47 con desviación estándar de 0.65 y el tratamiento que más se acercó a 6 fue el 2 con un promedio de 5.81 con desviación estándar de 0.41 (ver Tabla 4) Todos estuvieron cercanos a 6 lo cual es lo ideal para la producción de α -amilasa (Chancharoonpong *et al*, 2012; Pardo y Jaimes, 2001).

Tabla 4. pH inicial de los tres tratamientos, desviación estándar y ANOVA de FEDEARROZ 68, 67 y Nishiki

Muestra	pH Sustrato	Promedio tratamiento	Desviación estándar	F0	F 2,6
T1R1	5,51	5,475	0,65622659	4,2571	9,326
T1R2	6,61				
T1R3	5,44				
T2R1	6,12	5,81	0,41198705		
T2R2	5,34				
T2R3	5,5				
T3R1	6,51	6,67	0,16093477		
T3R2	6,7				
T3R3	6,83				

Según lo anterior se acepta la hipótesis nula pues al efectuar el análisis de varianza de los datos arrojó 4.257 el cual se encuentra en la zona de aceptación de 9.326 encontrado en la tabla de Gauss definiendo que en cuanto a pH todos los tratamientos son iguales (ver Anexo 3).

7.2. Fermentación en estado sólido

Después de 48 h de fermentación en estado sólido se extrajeron las muestras de cada tratamiento donde se puede evidenciar el crecimiento de *Aspergillus oryzae* en los granos de arroz (ver Figura 48).

Figura 50. Muestras con crecimiento *Aspergillus oryzae* en los 3 tratamientos.



7.3. Actividad de α -amilasa

Se obtuvieron los siguientes datos de absorbancia, provenientes de la prueba de hidrólisis de almidón usando el reactivo de Yodo de los tres tratamientos del proceso de fermentación en estado sólido, donde el menor promedio se evidenció en el tratamiento 2 con absorbancia de 0.0263 y desviación estándar de 0.0066 y el mayor en el tratamiento 3 con 0.058 y desviación de 0.005, pero por debajo de este se ubicó el tratamiento 1 con 0.0326 y desviación estándar de 0.012 (ver Tabla 5.) donde las concentraciones de almidón se encontraban entre 5 μ g a 0.26 μ g de almidón/mL (ver Anexo 4).

Tabla 5. Datos de absorbancia, desviación estándar y ANOVA de los 3 tratamientos y 3 repeticiones.

	T1 (Nishiki)	T2 (FEDEARROZ68)	T3 (FEDEARROZ67)
R1	0,018	0,028	0,053
R2	0,041	0,019	0,063
R3	0,039	0,032	0,058
Promedio	0,033	0,026	0,058
Desviación estándar	0,01274101	0,006658328	0,005
F0	10,9		
F2,6	9,326		

Según lo anterior se rechaza la hipótesis nula pues al efectuar el análisis de varianza de los datos arrojó 10.9 el cual se encuentra en la zona de rechazo de 9.326 encontrado en la tabla de Gauss definiendo que en cuanto a absorbancia de almidón los tratamientos son diferentes (ver Anexo 5).

Al demostrar diferencia en los tres tratamientos, la prueba de Tukey con 95% de significancia usando como $q_{\alpha}=4.34$ y una diferencia honestamente significativa (HSD) de 0.012 arrojó diferencias significativa en los tratamientos AC (T1 Y T3) y en BC (T2 Y T3) (ver anexo 6).

Al extrapolar con la curva de calibración de almidón hecha posterior a las pruebas de hidrolisis del mismo con las muestras, se pueden deducir las concentraciones de almidón en $\mu\text{g/mL}$, resultantes de cada tratamiento al ejercer la actividad catalítica de α -amilasa, se evidenció mayor promedio en el tratamiento 3 con 1.753 $\mu\text{g/mL}$ con desviación estándar de 0.155, siguiendo del tratamiento 1 con 0.986 $\mu\text{g/mL}$ y desviación estándar de 0.387 y con menor media el tratamiento 2 con 0.541 y desviación estándar de 0.443 (ver Tabla 6).

En el análisis de varianza se acepta la hipótesis nula pues al efectuar el análisis de varianza de los datos arrojó 9.11 el cual se encuentra en la zona de aceptación de 9.326 encontrado en la tabla de Gauss definiendo que en cuanto a concentración de almidón los tratamientos son iguales pero por una aproximación al rechazo de 0.21 (ver Anexo 7).

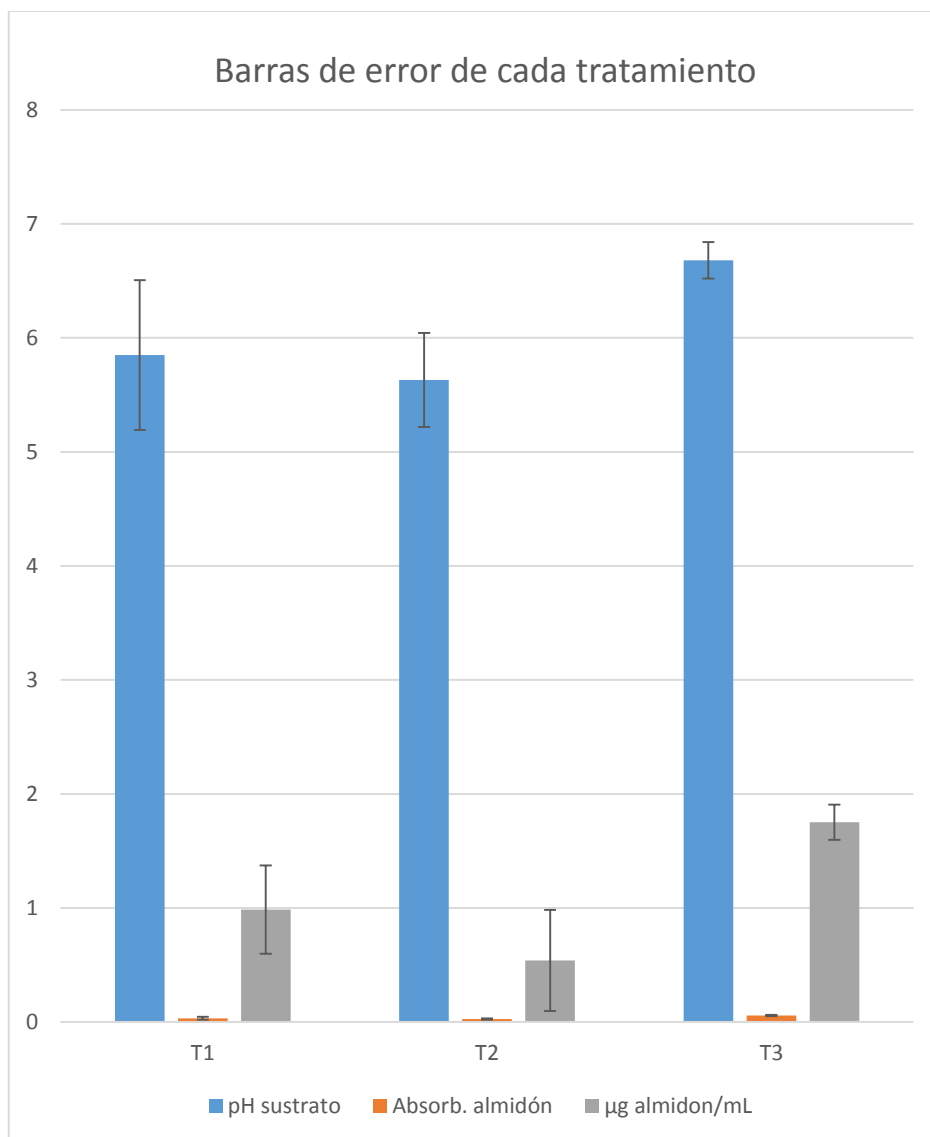
Tabla 6. Concentraciones de almidón en $\mu\text{g/mL}$, desviación estándar y ANOVA correspondiente a las pruebas de cada tratamiento.

	T1 (NISHIKI)	T2 (FEDEARROZ68)	T3 (FEDEARROZ67)
R1	0,54	0,085	1,6
R2	1,24	0,57	1,91
R3	1,18	0,97	1,75
Promedio	0,986666667	0,541666667	1,753333333
Desviación estandar	0,387986254	0,443179798	0,155026879
F0	9,113		
F 2,6	9,326		

7.3.1. Coeficiente de variación de cada tratamiento

En cada tratamiento se evidenció diferentes valores en la varianza en la desviación estándar y en los coeficientes de variación, pero en el tratamiento donde se evidencio menor variación de los datos fue en el tratamiento 3 con 8.62%, seguido del tratamiento 2 con 25.28% y finalmente en tratamiento 1 con 39% mostrando gran heterogeneidad en los datos (ver Anexo 7). Lo anterior indica mayor confiabilidad en los datos de los tratamientos 1 y 2 (ver Figura 49) teniendo en cuenta desviación estándar y promedio de cada tratamiento.

Figura 51. Barras de error con promedio de cada tratamiento



Se tiene en cuenta desviación estándar de cada tratamiento

7.4. Análisis fisicoquímicos de una bebida tipo sake

7.4.1. Porcentaje alcohólico

En la prueba hecha con densímetro en 250mL de la bebida teniendo en cuenta la densidad inicial de 1055 y la final de 1009 g/mL tipo sake se evidenció la cual se presenta grado alcohólico de 7.2; $\%alc. = (1055 - 1009) * 125 * 1.25$

El grado alcohólico no se alcanzó probablemente porque los microorganismos se hayan muerto o no hubo suficiente glucosa en el sustrato fermentado para ser transformada en alcohol (Shimbashi y Ku, 2011), porque el tiempo está en el rango adecuado de 3-4 semanas de fermentación alcohólica, además no hubo un aumento de más de 25°C en la temperatura en el proceso lo cual llegaría a agotar la levadura (Salazar y Urrutia, 2013). Además para revisar el avance del porcentaje alcohólico de la bebida se hizo a lo largo del proceso de producción de alcohol o antes y después así predecir inconvenientes en el mismo (García, 2014).

7.4.2. Acidez titulable total

El resultado se define con la cantidad de NaOH capaz de neutralizar la bebida haciéndola reaccionar con el indicador de fenoftaleina, Se obtuvieron los siguientes datos y se obtuvo el promedio de los mismos (ver Tabla 8)

Tabla 9. Gasto de NaOH en la titulación de la bebida tipo sake

No de prueba	mL de Na OH
1	100
2	99.9
3	100
Promedio	99.96

Según la fórmula propuesta el resultado de % de acidez total titulable fue:

$$\%de\ acidez = \frac{99.96mL * 0.1N * 0.059Meq\ de\ ácido\ succínico * 100}{100mL}$$

=0.58% de acidez titulable

0.058g/100 mL de bebida tipo sake.

Este valor está por encima del que debería presentar el sake entre 0.1-0.2g/mL (Shimbashi y Ku, 2011).

7.4.3. Sólidos solubles totales (°Brix)

La cantidad de azúcares disueltas en las bebidas fue 5.4°Brix siendo el promedio de 3 lecturas a la bebida (ver Tabla 9). Según Salazar y Urrutia, 2013 debería estar entre 6-10°Brix muy similar a los del vino lo cual hace muy cercano en contenido de extracto de azúcares en el de la bebida tipo sake.

Tabla 10. Sólidos solubles totales (°Brix) de la bebida tipo sake

No de prueba	°Brix
1	5.4
2	5.3
3	5.4
Promedio	5.4

7.4.4. Potencial de Hidrógeno (pH)

El valor de pH arrojó como único resultado 3.4 a una temperatura de 20°C,

Según los datos obtenidos en los análisis fisicoquímicos hechos a la bebida tipo sake del cultivar FEDEARROZ 68, se infiere que pH se encuentra por debajo del rango del sake y los resultados de acidez titulable y grado alcohólico no se encuentran en los valores correspondientes al de la bebida (ver Tabla 10), posiblemente por falta de producción de azúcar en el proceso de fermentación en estado sólido o la utilización de las levaduras inadecuadas (Shimbashi y Ku, 2011) o la cantidad inadecuada de las mismas, las cuales pueden consumir

antes de tiempo el azúcar producido en el proceso de fermentación alcohólica (Salazar y Urrutia, 2013)

Tabla 11. Relación de análisis de bebida tipo sake con características de sake convencional

Análisis	Bebida tipo sake	Sake
Sólidos solubles totales (°Brix)	5.4	6-10
Acidez titulable total	0,58g/100mL	0,1-0,2g/100mL
pH	3.4	4,2-4,7
% alcohol	7.2	12-17%

Fuente: (Shimbashi y Ku, 2011; Cubides, 2019)

Según Salazar y Urrutia, 2013 el tiempo adecuado de fermentación es de 18 días aunque en su investigación el mejor tratamiento en su ensayo no pasó de 9% de grado alcohólico y 7°Brix. Además utilizaron la misma levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para el proceso de fermentación aunque en la cantidad de 16g.

8. Conclusiones

En los tres tratamientos se evidenció crecimiento de *Aspergillus oryzae*, a pesar de darle las condiciones de humedad relativa, temperatura y cocción del sustrato (Shimbashi y Ku, 2011) no se evidenció invasión en la mayoría o el total del grano como se debe presentar de 48-56 h, es posible que la viabilidad del koji no sea la mejor o se requieran sólo de esporas para su inoculación como se ha observado en metodologías tradicionales (Shimbashi y Ku, 2011; MASUMI, 2014).

Basados en los resultados de la medición de absorbancia para evaluar la producción de α -amilasa se determinó que el cultivar con mayor potencial fue FEDEARROZ 68, al evidenciar menor promedio siendo 0.0263 en la absorbancia correspondiente a la concentración de almidón de 0,5416 μ g/mL de muestra, la cual estuvo al realizar la prueba de hidrólisis y subsecuentemente pH inicial como sustrato más acercado a 6 estando en 5.81 lo cual es más adecuado, además de presentarse relativa homogeneidad en los datos se eligió como cultivar para llevar a cabo la bebida tipo sake y mostrando potencial como sustrato para la misma.

Según las características del grano en el cultivar FEDEARROZ 68, comparadas con el cultivar FEDEARROZ 67, se acercaron más a las convenientes para el proceso de fermentación en estado sólido previo a la fermentación alcohólica del sake, contando con 3% más en el contenido de amilosa, entre 2-6g más en el peso por cada 1000 semillas y centro blanco de almidón entre 3-8%, lo cual se confirmó al mostrar los mejores resultados en la hidrólisis del almidón con su respectivo extracto enzimático, lo cual deja ver que las características del sustrato si intervienen en el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, lo cual se traduce en mayor

actividad enzimática de α -amilasa la cual al aumentar disminuye la concentración de almidón en pruebas hidrolíticas.

Teniendo en cuenta la mayor actividad catalítica de α -amilasa en el cultivar FEDEARROZ 68, se infiere que también hubo mayor crecimiento de *Aspergillus oryzae* debido a que el crecimiento del mismo es directamente proporcional a la actividad enzimática, siendo un indicador del resultado del proceso de fermentación en estado sólido, y del sustrato donde se lleva a cabo este bioproceso, comparado con el japonés se presentan las mismas condiciones de pH y concentración de almidón resultante de la prueba de hidrólisis, así se tiene en cuenta el potencial de los cultivares nacionales en la elaboración de una bebida tipo sake.

La cocción del arroz tuvo modificaciones de la técnica original, tomando 3 veces más del tiempo siendo 4 horas, ya que con la autoclave fue el tiempo en el que se logró la gelatinización de los granos de arroz para permitir el crecimiento de *Aspergillus oryzae*.

Aunque el tiempo de fermentación tomado fue de 3 semanas y no se obtuvieron las características de porcentaje alcohólico y acidez titulable total correspondiente al sake, aunque se ha registrado que está en el tiempo adecuado de fermentación, además se utilizó la misma levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) pero no la específica para sake de otras investigaciones para el proceso de fermentación alcohólica.

La bebida tipo sake producida con el cultivar FEDEARROZ 68 no posee todas las características fisicoquímicas deseadas, esto parece haber ocurrido por variables como cantidad de levadura, cantidad de glucosa producida en la fermentación en estado sólido y seguimiento en la fermentación alcohólica lo cual indica mejorar el método de fermentación con tal cultivar.

9. Recomendaciones

En el proceso de fermentación alcohólica se recomienda llevar a cabo análisis fisicoquímicos a lo largo del proceso y detectar alguna variable que interfiera en el producto final.

Para dar continuidad a la investigación realizar la comparación de los cultivares de arroz (*Oryzae sativa* L.) colombianos con los que se usan tradicionalmente para la elaboración de sake como es Yamadanishiki, lo cual no se hizo por falta de recursos para importarlo.

Se puede continuar con producción de biomasa de *Aspergillus oryzae* por medio de medición de la glucosamina en cultivares como FEDEARROZ 68 y Yamadanishiki, la cual no se realizó por falta de recursos para adquirir reactivos muy específicos para tal prueba.

Para complementar la presente investigación, se puede hacer una cuantificación más precisa de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* con la producción de azúcares reductores como maltosa después del proceso de fermentación en estado sólido (Chancharoonpong, 2012) en los cultivares utilizados vs Yamadanishiki,

Mejorar y estandarizar el proceso de fermentación en estado sólido y el de fermentación alcohólica de la bebida tipo sake con cultivares colombianos para producir una bebida con características fisicoquímicas de tal licor.

10. Bibliografía

- Abril Nieves; Bárcena Antonio; Fernández Emilio; Galvan Aurora; Jorin Jesús; Peinado José; Meléndez Fermín y Túnez Isaac, Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas, Campus Universitario de Rabanales, España, 2000.
- Angladette Andre, El arroz, colección agricultura tropical, editorial Blume, Primera edición, España, 1969.
- Arima Kei y Uozumi Takeshi, A new method for estimation of the mycelial weight in koji, Agricultural and biological chemistry, Vol 31, pág. 119-123, 2014.
- Arnáiz Carmen; Isac Laura; Lebrato Julián, Determinación de la biomasa en procesos biológicos, Revista tecnología del agua, Pág. 45-52, 2000.
- Arregocés Oscar, Rocero Manuel y González Joaquín, Morfología de la planta de arroz, CIAT, 2005.
- Aspergillus oryzae*, Biblioteca virtual de la salud, Central de noticias, Bolivia, 2017.
- Atsuko Sando, La evolución del nohonshu: ¿por qué el sake se está popularizando en todo el mundo?, Nippon.com, Japón, 2018. Recuperado <https://www.nippon.com/es/views/gu002001/>.
- Barona Edgar, Importancia de la semilla de arroz, Revista Fedearroz noviembre, pág. 15-19, 2010.
- Castilla L. A.; Pineda D., Ospina J.; Echeverry J.; Perafan F.; Garcés G.; Sierra J.; Díaz A., Cambio climático y producción de arroz, Fedearroz noviembre, pág. 4-11, 2010.
- Castro Johaby y Umaña Gerardina, Frecuencia de los hongos asociados al desarrollo de mohos de poscosecha en el pedúnculo de la piña en dos zonas de Costa Rica, Agronomía costarricense, Vol. 42, Cap. 2, pág. 17-25, 2017.
- Chancharoonpong Chuenjit; Hsieh Pao-Chuan; Sheub Shyang-Chwen, Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation, Revista SciVerse Science direct, Taiwan, 2012.
- Chang S.T. y Quimio T.H., Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods, The Chinese University Press, Hong Kong, 1982.
- Chen Hongzhang, Modern solid state fermentation theory and practice, Springer, China, 2013.
- Cortés Jesus; Guadarrama Luis, Ramírez Mayra, Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido, Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, Vol. 16, Número 3, 2014.
- Cruger Wolf y Cruger Anneliese, Biotecnología: Manual de microbiología industrial, editorial acríbia, España, pág. 212-230, 1993

- Cruz M. Lina, estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* mediante fermentación bifásica a escala piloto, Pontificia Universidad Javeriana, 2007.
- Degiovanni Víctor, Martínez Cesar y Motta Francisco, Producción eco-eficiente del cultivo de arroz (*Oryzae sativa* L.) en América latina, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR), Tomo 1, Cap. 4, 2010.
- Degiovanni Víctor, Martínez Cesar y Motta Francisco, Producción eco-eficiente del cultivo de arroz (*Oryzae sativa* L.) en América latina, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR), Tomo 1, Cap. 9, 2010.
- Dinero, el mercado de los licores gana terreno en la economía colombiana, Consumo, 2015 recuperado de <https://www.dinero.com/edicion-impresa/negocios/articulo/las-ventas-bebidas-alcoholicas-aumentan-colombia/211372>
- Dolores María; Mateous- Aparicio Inmaculada; de Pradera José; García Mercedes; Pérez María; Redondo Araceli; Villanueva María José y Zapata María, el vino y sus análisis, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de nutrición y Bromatología, 2014.
- Eckhardt Fred, Sake home brew, 2008
- Espitia Laidy, determinación de la concentración de α y β amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2009.
- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación, Arroz en el mundo, 2004. Recuperado www.fao.org/rice2004/es/p3.htm.
- Fedearroz, Ficha técnica variedad FEDEARROZ 67, Registro nacional de cultivares, 2007.
- Fedearroz, Ficha técnica variedad FEDEARROZ 68, Registro nacional de cultivares, 2014.
- Fedearroz, Importación de arroz a Colombia del año 2000 hasta 2019, Estadísticas arroceras, 2019.
- Fogarty W. and Kelly T. Amylases. amyloglucosidase and related glucanases. Economic Microbiology, Vol.5, A.H.Rose (ed) Academic Press London 1980.
- Frank Mitch, from rise to sake, Wine spectator, pág. 95-97, 2007.
- Gaitán-Hernández, R., Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. Revista Mexicana de Micología 21: 77-84, 2005.
- García Oliver, cerveza casera, como calcular el grado alcohólico, 2014. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=gXR9FUcRrOw>
- Gaviria Alejandro y Lacouture María, Decreto 262, Ministerio de salud y protección social, Colombia, 2017.
- Golden Katherine, *Aspergillus oryzae* (Alhburg) Cohn, 1898. Recuperado de <http://journals.iupui.edu/index.php/ias/article/view/13491/13649>
- Gómez Aracely, licor de sake, Scribd, Ecuador, 2014.

- Graber Marianne y Combes Didier. Efecto de los polioles sobre la termoestabilidad de la alfa-amilasa fúngica. *Enzima Microbial Technology*, Elsevier, Ed 11, cáp 10, pág. 673-677, 1989
- Gupta A. ; Gupta K.; Mody R.; y Yadava P., Production and characterization of α -amilasa from *Aspergillus niger*, *Biotechnology*, edi 7, cáp 3, pág. 551- 556, India, 2008.
- Hernández Ana; Alfaro Lleana y Arrieta Ronald, *Microbiología Industrial*, Editorial universidad estatal a distancia, Cap. 3, Pág. 37, 2003.
- Herrera Anibal, poscosecha de los percederos, prácticas de laboratorio, Universidad Nacional de Colombia, 2010
- Kanauchi Kamoto, *SAKE Alcoholic Beverage Production in Japanese Food Industry*, cap 3, 2013).
- León Jorge, *Botánica de los cultivos tropicales*, Instituto interamericano de cooperación para la agricultura, Costa Rica, Segunda edición, 1987.
- MASUMI, Masumi Sake Majinkg, *Revista Cru*, 2014. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=9dVYS00TwfE>
- Matheus Herberth, Instituto Colombiano Agropecuario- ICA, Registro de cultivar commercial para producción y comercialización de semillas en Colombia, resolución 005224, 2009.
- Mier Teresa; Toriello Conchita y Ulloa Miguel, Hongos microscópicos saprobios y parásitos método de laboratorio, Universidad autónoma metropolitana, México, Pág. 31, 2002.
- Mitchell D. y Lonsane B., *Solid Substrate Cultivation*, Springer Netherlands, Cap. 1, Pág. 1-15, 1992.
- Mitchell David; Krieguer Nadia y Berovic Marin, *Solid state Fermentation bioreactors*, Springer, 2006.
- Monterrosa Heidy; Arroceros y gobierno acuerdan reducir la producción del grano en 2019, La república, 2019.
- Moo-Young M.; Moreira A.y Tengerdy R., *Principles of solid-substrate fermentation*, Vol 4, Pág. 117-150, 1983.
- Murray Patrick; Rosenthal Ken y Pfaller Michael, *Microbiología médica*, Editorial Elsevier, Octava edición, España, pág. 570, 2017.
- Naohisa Murakami, La gastronomía japonesa se expande: 89000 restaurantes en el extranjero, *Revista Nippon*, Datos de Japón, 2016.
- National Center for Biotechnolgy Information (NCBI), *Aspergillus oryzae* 100-8, Navegador de taxonomía, 2018.
- Nelina, A. y Ruíz, F. Efectos beneficiosos de una dieta rica en granos enteros. *Revista Chilena de Nutrición*; 32 (3): 191-199. 2005.

- Osorio Islene; Lasso Jairo y López Olga, Efecto de las α -amilasas sobre la pulpa de mango y cinética de la reacción, NOOS Revista del departamento de ciencias, N 5, Pág. 34-48, 1998.
- Pardo Mariela y Rivera Pedro, Diseño de un biorreactor piloto para hidrolisis enzimática de almidones, Universidad Nacional de Colombia, 2001.
- Pastrana L., Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria, Ciencia y tecnología alimentaria, 2002.
- Pérez Cristo y Saavedra Enrique, Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el caribe colombiano, Revista Colombiana de ciencia animal (RECIA), No 3, Cap. 1, Pág. 111-124, 2011
- Pincirolí María, Proteínas del arroz propiedades funcionales y estructurales, Universidad Nacional de Plata, Argentina, 2010
- Plaza Victoria y Sung Eun, Determinación de alcohol, acidez y azúcares en bebidas alcohólicas mediante espectroscopia infrarroja, Universidad de Azuay, Ecuador, 2011.
- Raper Kenneth B. y Fennell Dorothy, The Genus *Aspergillus*. Museo de Los Ángeles, Science, Vol 150, 1965.
- Reinoso Byron, Diseño de un fermentador de bandeja a escala piloto para la producción de enzimas con actividad ligninolítica y celulolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido con aserrín de eucalipto, Escuela politécnica nacional, 2015.
- Rodríguez Diego, Potencial agroalimentario del almidón de arroz de tres variedades cultivadas en el departamento del Tolima, universidad del Tolima, 2015.
- Rojas Juan; Quicazan Marta y Mojica Andrea, Implementación de un método cromatográfico para la determinación de azúcares, etanol y glicerol en hidromiel, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- Rondinone Silvia y Giovanniello Octavio, pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interés clínico, tercera edición, Colombia, 2000.
- Roussos S. y Perraud-Gaime I., Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido, Fronteras en Biotecnología y bioingeniería, Pág. 341-348, México, 1996.
- SAG (Secretaría de Agricultura y Ganadería) y DICTA (Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria), Manual técnico para el cultivo de arroz (*Oryzae sativa* L.), Honduras, 2003.
- Salazar Paulo y Urrutia Eder, Efecto de la variación del porcentaje de pulido del arroz (*Oryzae sativa* L.) y tiempos de fermentación para la obtención de sake, Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador, 2013.
- Samson Robert A., Taxonomic considerations of harmful and beneficial moulds in food, westerdijk institute, 1985.

- Sánchez Samuel, Protocolo de fermentación para producción de koji, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2017.
- Sari Arni; Andrini Made y Nisa Maslia, Tugan pangan fermentasi Kapang dan *Aspergillus Oryzae* Dalam Produk Fermentasi Tauco, Universitas Brawijaya, Indonesia, Pág. 25-26, 2013.
- Sarmiento V.; Vargas D.; Pedroza A; Matiz A. y Poutou R., PRODUCCIÓN DE α -AMILASA CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS DE *Thermus* sp, Pontificia Universidad Javeriana, MVZ-Córdoba, Ed 8, Cap 2, pág. 310-317, 2003.
- Schlegel Hans, *General microbiology*, Cambridge University, séptima edición, 1993.
- Shinbashi Nishi, Ku Minato, a comprehensive guide to Japanese sake, Japan sake and Shoshu makers association, 2011.
- Shurtleff William y Aoyagi Akiko, *Hystory of soy sauce*, Sonyinfo center, USA, 2012.
- Smith Benjamin y Roe Joseph, A photometric method for the determination of α -amilase in blood and urine, with the use of starch-iodine color, George Washington University, 1948.
- Tascón Eugenio, García Elías y Gonzales José, *Arroz: Investigación y producción*, Centro de Investigación de Agricultura Tropical (CIAT), colección histórica, 1985.
- Terebiznik Mauricio R. Alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*: estudios de producción por fermentación en sustrato sólido, purificación y estabilización, Universidad de Buenos Aires, 1998.
- Torres Alberto; Duran Marlene y Montero Piedad, Evaluación de las propiedades funcionales del almidón obtenido a partir de malanga (*Colocasia esculenta*), *Revista ciencia e ingeniería al día*, pág. 29-38, Colombia, 2013.
- Universidad Autónoma de México, Pruebas de análisis a bebidas fermentadas, 2015. Recuperado de http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94
- Vargas Janos; Frisvad Jens y Samson Robert, Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi, *Studies in Mycology*, Vol 69, Cap 1, pág. 57-80, 2011.

Anexos

Anexo 1. Ficha técnica cultivar FEDEARROZ 67

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES COMERCIALES



FICHA PARA REGISTRO DE CULTIVARES

CULTIVARES DE ARROZ

NOMBRE BOTÁNICO:	Oryza sativa
NOMBRE EXPERIMENTAL:	FLV585-M-5-4-1S-MS
NOMBRE COMERCIAL:	<u>FEDEARROZ 67</u>
GENEALOGIA: ✓	LV1063-7-3-MV-4 / FL03174
PROGENITOR FEMENINO: ✓	LV1063-7-3-MV-4
PROGENITOR MASCULINO: ✓	FL03174
METODOLOGIA UTILIZADA PARA SU OBTENCIÓN:	SELECCIÓN POR PEDIGRÍ
CREADOR:	JUAN JESUS SIERRA DAZA-FEDEARROZ-
ESPECIALISTAS:	JUAN JESUS SIERRA DAZA
RESPONSABLE DEL REGISTRO:	FEDERACION NACIONAL DE ARROCEROS (FEDEARROZ)
DOMICILIO:	CRA 100 No25H-55
ADAPTACION: ✓	Subregión ALTO MAGDALENA
RENDIMIENTO EXPERIMENTAL ✓	Sistema Riego 7300-10800 kg ha ² Promedio 8000 kg ha ¹
CICLO DE VIDA:	
- De siembra a emergencia (días):	7-10
- De emergencia a floración (días):	78-82
- De emergencia a madurez fisiológica (días):	108-120
- De emergencia a cosecha (días): ✓	110-135
CARACTERISTICAS Agronómicas:	
- Altura de planta (cm.):	105-115
- Hábito de crecimiento:	Erecto
- Hojas por planta:	30-30
- Color de la hoja:	Verde semiclaro

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES COMERCIALES



FIGMA PARA REGISTRO DE CULTIVARES

• Pubescencia de hoja:	Velosa
• Color de lema y paja:	Baja
• Senescencia:	Intermedia
• Reacción a desgrane:	Resistente
• Excreción de panícula (cm):	1.0-3.0
• Reacción a volcamiento (%):	0-10
• Longitud hoja bandera (cm):	15-30
• Ancho hoja bandera (cm):	1.5-2.0
• Longitud ligula (mm):	3-7
• Vigor (Escala: 1-9):	1-3
• Vaneamiento (%):	15-27
• Granos llenos por panícula:	80-100
• Longitud panícula (cm):	22-27
CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA:	
• Longitud (mm):	8-10.5
• Ancho (mm):	2.5-3.0
• Espesor (mm):	2.5-3.0
• Aditas en las semillas:	Ocasionalmente
• Peso de 1.000 semillas (g):	24.0-28.0
• Período de dormancia:	40 días
CALIDAD MOLINERA:	
• Rendimiento de pila (g):	70.0-73.5
• Índice de pila (g):	56.0-62.0
• Grano partido (%):	7.0-14.0
APARIENCIA DEL GRANO:	
• Centro blanco:	1.6-7.0
• Longitud del grano blanco (mm):	7-8
CALIDAD CULINARIA:	
• Gelatinización:	Intermedia a Baja
• Contenido de amilosa (%):	24-27
REACCION A INSECTOS Y ENFERMEDADES:	
Piricularia en hoja, <i>Piricularia oryzae</i> Cav (escala 0-9):	1-4
Piricularia en cuello, (escala 0-9):	1-4
Helminthosporiosis en hoja, <i>Helminthosporium oryzae</i> Breda de Haan (escala 0-9):	1-3
Helminthosporiosis en cuello (escala 0-9):	1-3
Escaldado (<i>Rhynchospoerium oryzae</i> Haas. Y Yokogi):	1-3
Manchado de grano (%):	3
Virus Hoja Blanca (%):	3
Sogata (<i>Tagosodes oryzae</i>):	Resistente
Podredumbre de la vaina (<i>Sarocladium oryzae</i> Gams y Hawksworth):	0-4
Mancha Nival (<i>Cercospora oryzae</i> Miyake.):	1
Anubio de la vaina (<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn):	0-4.5

Anexo 2. Ficha técnica cultivar FEDEARROZ 68

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES COMERCIALES FICHA PARA REGISTRO DE



PARA REGISTRO DE CULTIVARES

CULTIVARES DE ARROZ

NOMBRE BOTANICO:	Oryza sativa
NOMBRE EXPERIMENTAL:	FL08488-1P-2-3P-4P-3SR-MC
NOMBRE COMERCIAL:	<u>FL FEDEARROZ 68</u> 17/oct/2014
GENEALOGIA:	FL02066-4P-1-1P-2-M-1P-M-M-M-FL1 / FL05602-12P-2-2P// FEDEARROZ LA VICTORIA I FL02066-4P-1-1P-2-M-1P-M-M-M-FL1 / FL05602-12P-2-2P FEDEARROZ LA VICTORIA I
PROGENITOR FEMENINO:	
PROGENITOR MASCULINO:	
METODOLOGIA UTILIZADA PARA SU OBTENCION:	SELECCION POR PEDIGRI
CREADOR:	FEDEARROZ (Federación Nacional de Arroceros)
ESPECIALISTAS:	Juan Jesús Sierra Daza - Juan Carlos Ramírez
Domicilio:	Carretera 100 No. 25H-55
RESPONSABLE DEL REGISTRO:	FEDERACION NACIONAL DE ARROCIEROS
ADAPTACION:	REGION NATURAL LLANOS
RENDIMIENTO EXPERIMENTAL:	4098.1 kg/ha ¹ , libre de impurezas al 14% de humedad
RENDIMIENTO SEMICOMERCIAL:	4726.7 kg/ha ¹ libre de impurezas al 14% de humedad
CICLO DE VIDA:	
• De siembra a emergencia (días):	7-10
• De emergencia a floración (días):	67-77
• De emergencia a madurez fisiológica (días):	95-100
• De emergencia a cosecha (días):	100-110
CARACTERISTICAS Agronómicas:	
• Altura de planta (cm):	105-110
• Hábito de crecimiento:	Erecto
• Nacidos por planta:	1-30
• Color de la hoja:	Verde Oscuro
• Pubescencia de hoja:	Vellosa
• Color de lema y pajas:	Paja
• Senescencia:	Lenta
• Reacción a desgrane:	Resistente
• Excesión de panícula (cm):	1,0-5,5
• Reacción a volcamiento (%):	Tolerante
• Longitud hoja bandera (cm):	25,0-25,0
• Ancho hoja bandera (cm):	1,5-2,0
• Longitud ligula (mm):	4-7
• Longitud exaración (cm):	1,0-5,5
• Vigor (Escala: 1-9):	1-3
• Reacción a volcamiento (%):	
• Varamiento (%):	12,0-18,0
• Ganos líncos por panícula:	65-120
• Longitud panícula (cm):	18-27

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES COMERCIALES



FICHA PARA REGISTRO DE CULTIVARES

CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA:

• Longitud (mm):	8,0-10,5
• Ancho (mm):	3,0
• Espesor (mm):	2,0-3,0
• Aristas en las semillas:	Ocasionalmente
• Peso de 1.000 semillas (g):	28,0-30,0
• Periodo de dormancia:	40 días

CALIDAD MOLINERA:

• Rendimiento de pilada (%):	71%
• Índice de pilada (%):	55,3%
• Grano partido (%):	22,8%
• Grano Yesso:	3,1%

APARIENCIA DEL GRANO:

• Centro blanco:	10,5 %
• Longitud del grano blanco (mm):	9

CALIDAD CULINARIA:

• Gelatinización:	Intermedia a Baja
• Contenido de amilosa (%):	29,0-30,0

REACCION A INSECTOS Y ENFERMEDADES:

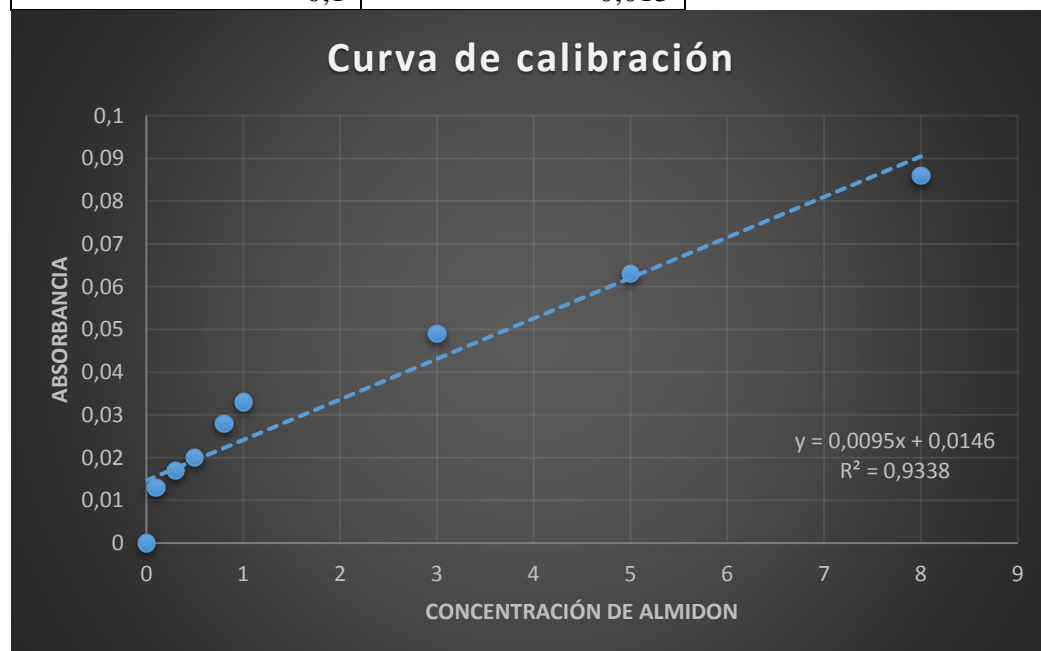
<i>Pyricularia</i> en hoja, <i>Pyricularia oryzae</i> Cav (escala 0-9):	1-5
<i>Pyricularia</i> en cuello, (escala 0-9):	1-5
<i>Helminthosporiosis</i> en hoja, <i>Helminthosporium oryzae</i> Broda de Haen (escala 0-6):	1-3
<i>Helminthosporiosis</i> en cuello (escala 0-9):	1-3
Escaldado (<i>Rhynchosporium oryzae</i> Has. Y Yokogi):	1-5
Manchado de grano (%):	1-3
Virus Hoja Blanca (%):	1-3
Sogata (<i>Tyloscodes orizicolus</i>):	Resistente
Purpura de la vaina (<i>Sarcolobum oryzae</i> Guss y Harknworth):	1-3
Marcha lineal (<i>Cercospora oryzae</i> Miyake):	1-5
Anubio de la vaina (<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn):	1-5

Anexo 3. Análisis de varianza de pH.

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE LOS CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F0	F 2,6
TRATAMIENTO	2	1,777422222	0,888711111	4,25718544	9,326
ERROR	6	1,252533333	0,208755556		
TOTAL	8	3,029955556			

Anexo 4. Curva de calibración de almidón

Concentración μg almidón/mL	Absorbancia
0	0
8	0,086
5	0,063
3	0,049
1	0,033
0,8	0,028
0,5	0,02
0,3	0,017
0,1	0,013



Anexo 5. Análisis de varianza de absorbancia de almidón.

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE LOS CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F0	F 2,6
TRATAMIENTO	2	0,001684667	0,00084233	10,9079137	9,326
ERROR	6	0,000463333	7,7222E-05		
TOTAL	8	0,002148			

Anexo 6. Prueba de Tukey en tratamientos de absorbancia de almidón

	A (T1)	B(T2)	C (T3)
A (T1)		0,006333333	-0,025333333
B (T2)			-0,031666667
C (T3)			

Anexo 7. Análisis de varianza de concentraciones de almidón.

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE LOS CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F0	F 2,6
TRATAMIENTO	2	2,253938889	1,126969444	9,11357459	9,326
ERROR	6	0,74195	0,123658333		
TOTAL	8	2,995888889			

Anexo 7. Varianza, desviación estándar y coeficiente de variación de cada tratamiento

T1 (NISHIKI)			
Varianza	0,000162		
Desviación estándar	0,012741	Cv	39,00309154
T2 (FEDEARROZ68)			
Varianza	4,43E-05		
Desviación estándar	0,006658	Cv	25,28479032
T3 (FEDEARROZ 67)			
Varianza	0,00003		
Desviación estándar	0,005	Cv	8,620689655

Anexo 9. Ficha técnica de almidón soluble



HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD ALMIDÓN SOLUBLE

1. Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa	
<p style="margin-left: 40px;">Identificación de la sustancia o del preparado</p> <p>1.1 Denominación: Almidón Soluble</p> <p>1.2 Uso de la sustancia o preparado: Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.</p> <p>1.3 Identificación de la sociedad o empresa:</p>	<p>CONTROL TÉCNICO Y REPRESENTACIONES, S.A. DE C.V. Av. Lincoln No. 3410 Pta. Col. Miras Nuevas www.ctr.com.mx Tels. (81) 8158 0600, 8158 0628, 8158 0633 e-mail : ctrscientific@telcel.net.mx Apdo. Postal 044-C Monterrey N.L. C.P. 64000, México</p>
2. Identificación de los peligros	
<p style="margin-left: 40px;">2.1 Sustancia no peligrosa.</p>	
3. Composición/Información de los componentes	
<p style="margin-left: 40px;">3.1 Denominación: Almidón Soluble Fórmula: $(C_6H_{10}O_5)_n$ M.=(162,14)n</p>	
4. Primeros auxilios	
<p style="margin-left: 40px;">4.1 Indicaciones generales: -----</p> <p style="margin-left: 40px;">4.2 Inhalación: -----</p> <p style="margin-left: 40px;">4.3 Contacto con la piel: -----</p> <p style="margin-left: 40px;">4.4 Ojos: Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos.</p> <p style="margin-left: 40px;">4.5 Ingestión: -----</p>	
5. Medidas de lucha contra incendio	
<p style="margin-left: 40px;">5.1 Medios de extinción adecuados: Los apropiados al entorno.</p> <p style="margin-left: 40px;">5.2 Medios de extinción que NO deben utilizarse: -----</p> <p style="margin-left: 40px;">5.3 Riesgos especiales: Combustible.</p>	



HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD ALMIDÓN SOLUBLE

5.4	Equipos de protección: -----
6.	Medidas a tomar en caso de vertido accidental
6.1	Precauciones individuales: -----
6.2	Precauciones para la protección del medio ambiente: -----
6.3	Métodos de recogida/limpieza: Recoger en seco y depositar en contenedores de residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.
7.	Manipulación y almacenamiento
7.1	Manipulación: Sin indicaciones particulares.
7.2	Almacenamiento: Recipientes bien cerrados.
8.	Controles de exposición/protección personal
8.1	Medidas técnicas de protección: -----
8.2	Control límite de exposición: VLA-ED: 10 mg/m ³
8.3	Protección respiratoria: -----
8.4	Protección de las manos: -----
8.5	Protección de los ojos: -----
8.6	Medidas de higiene particulares: Lavarse las manos antes de las pausas y al finalizar el trabajo.
8.7	Controles de la exposición del medio ambiente: Cumplir con la legislación local vigente sobre protección del medio ambiente.
	 El proveedor de los medios de protección debe especificar el tipo de protección que debe usarse para la manipulación del producto,



HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD ALMIDÓN SOLUBLE

<p>indicando el tipo de material y, cuando proceda, el tiempo de penetración de dicho material, en relación con la cantidad y la duración de la exposición.</p>
<p>9. Propiedades físicas y químicas:</p> <p style="padding-left: 40px;">Aspecto: Sólido blanco.</p> <p style="padding-left: 40px;">Olor: Inodoro.</p> <p style="padding-left: 40px;">pH 6,0-7,5(2%)</p> <p style="padding-left: 40px;">Solubilidad: Poco soluble en agua fría. Soluble en agua caliente.</p>
<p>10. Estabilidad y reactividad</p> <p style="padding-left: 40px;">10.1 Condiciones que deben evitarse: ----</p> <p style="padding-left: 40px;">10.2 Materias que deben evitarse: ----</p> <p style="padding-left: 40px;">10.3 Productos de descomposición peligrosos: ----</p> <p style="padding-left: 40px;">10.4 Información complementaria: ----</p>
<p>11. Información toxicológica</p> <p style="padding-left: 40px;">11.1 Toxicidad aguda: ----</p> <p style="padding-left: 40px;">11.2 Efectos peligrosos para la salud: Baja toxicidad. No son de esperar características peligrosas. Observar las precauciones habituales en el manejo de productos químicos.</p>
<p>12. Información Ecológica</p> <p style="padding-left: 40px;">12.1 Movilidad : ----</p> <p style="padding-left: 40px;">12.2 Ecotoxicidad :</p> <p style="padding-left: 80px;">12.2.1 - Test EC₅₀ (mg/l) : ----</p> <p style="padding-left: 80px;">12.2.2 - Medio receptor :</p> <p style="padding-left: 80px;">Riesgo para el medio acuático = ----</p> <p style="padding-left: 80px;">Riesgo para el medio terrestre = ----</p>

