

**SUSTITUCIÓN DEL *ASPERGILLUS ORYZAE* POR LAS ENZIMAS  
ALFA AMILASA Y GLUCOAMILASA EN LA ELABORACIÓN DE  
SAKE**

**Investigador Principal  
LUISA FERNANDA MANRIQUE HERNANDEZ  
Estudiante de Ingeniería de Alimentos**



**INGENIERÍA DE ALIMENTOS  
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
PAMPLONA, 2019**

**SUSTITUCIÓN DEL *ASPERGILLUS ORYZAE* POR LAS ENZIMAS ALFA AMILASA Y  
GLUCOAMILASA EN LA ELABORACIÓN DE SAKE**

**Investigador Principal**  
**LUISA FERNANDA MANRIQUE HERNANDEZ**  
Estudiante de Ingeniería de Alimentos

**Director**  
**DANIEL S. DURAN OSORIO**  
Ph.D. Tecnología, Calidad y Marketing en Industrias Agroalimentarias

**Codirector**  
**YANINE Y. TRUJILLO NAVARRO**  
Ph.D. Tecnología, Calidad y Marketing en Industrias Agroalimentarias

**Línea de investigación**  
**Optimización de procesos y vida útil de los productos agroalimentarios**

**Grupo de Investigación Bioingeniería alimentaria**



**INGENIERÍA DE ALIMENTOS**  
**FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA**  
**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES**  
**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA**  
**PAMPLONA, 2019**

## Tabla de contenido

1.	RESUMEN DEL PROYECTO .....	1
2.	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	2
<b>2.1</b>	<b>EI SAKE .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Historia del Sake .....	2
2.1.1.1	Edad media: Establecimiento de la tecnología de elaboración del sake .....	3
2.1.1.2	Periodo moderno temprano: Apogeo del kudarizake .....	3
2.1.1.3	Período moderno.....	4
2.1.2	Características del sake .....	5
2.1.3	Tipos de sake .....	6
2.1.3.1	Sake de designación especial y características de cada tipo .....	6
2.1.3.1.1	Ginjo .....	6
2.1.3.1.2	Daiginjo .....	6
2.1.3.1.3	Junmai.....	7
2.1.3.1.4	Junmai ginjo.....	7
2.1.3.1.5	Junmai daiginjo.....	7
2.1.3.1.6	Honjozo .....	7
2.1.3.2	Futsu-shu (sake ordinario o no de alta calidad) y sus características.....	7
2.1.4	Características y generalidades de las materias primas .....	7
2.1.4.1	El arroz .....	7
2.1.4.2	El agua .....	8
2.1.4.3	El hongo KOJI ( <i>Aspergillus oryzae</i> ).....	8
2.1.5	Características del sake elaborado por otros procesos de fabricación.....	9
2.1.5.1	Nigorizake (sake turbio).....	9
2.1.5.2	Namazake (sake no pasteurizado) y nama-chozo-shu (sake no pasteurizado en almacenaje).....	9
2.1.5.3	Koshu (sake añejo) .....	9
2.1.5.4	Genshu (sake no diluido).....	9
2.1.5.5	Taruzake (sake en barril).....	9
2.1.5.6	Sake espumante.....	10
2.1.6	Factores que influyen en tipos y variedades de sake .....	10

2.1.6.1	Arroz .....	10
2.1.6.2	Agua .....	10
2.1.6.3	Medioambiente .....	10
2.1.6.4	Preferencias gustativas locales.....	10
2.1.6.5	Técnicas de elaboración del sake.....	11
2.1.7	Usos del sake .....	11
2.1.8	Normatividad.....	11
2.1.8.1	Definición de sake .....	11
2.1.8.2	Sustancias especificadas como ingredientes del sake.....	11
2.1.8.3	Normas de etiquetado.....	12
<b>2.2</b>	<b>ALMIDON.....</b>	<b>13</b>
2.2.1	GENERALIDADES.....	13
2.2.1.1	Amilosa.....	14
2.2.1.2	Amilopectina .....	15
2.2.2	Hidrólisis del almidón .....	16
2.2.2.1	Método químico .....	16
2.2.2.2	Método enzimático .....	16
2.2.2.2.1	Alfa amilasa .....	17
2.2.2.2.2	Glucoamilasa.....	17
2.2.3	Alfa amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	18
2.2.3.1	Características.....	18
2.2.3.2	Antecedentes de la amilasa .....	18
<b>2.3</b>	<b>PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL .....</b>	<b>19</b>
2.3.1	SUSTRATO: MOSTO .....	19
2.3.2	Microorganismo ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	19
2.3.2.1	Morfología .....	19
2.3.2.2	Reproducción.....	20
2.3.2.3	Requerimientos nutricionales.....	20
2.3.2.3.1	Fuente de carbono .....	20
2.3.2.3.2	Fuente de nitrógeno.....	20

2.3.2.3.3	Macro y micronutrientes .....	20
2.3.2.3.4	Vitaminas .....	20
2.3.2.4	Requerimientos ambientales.....	21
2.3.2.4.1	Temperatura .....	21
2.3.2.4.2	Oxigeno.....	21
2.3.2.4.3	pH .....	21
2.3.2.5	Metabolismo.....	21
2.3.2.5.1	Azucares .....	21
2.3.2.5.2	Nitrógeno .....	21
2.3.2.5.3	Fosforo .....	22
2.3.3	Fermentación.....	22
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GENERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>PROCESO DE ELABORACIÓN DEL SAKE</b> .....	<b>24</b>
4.1.1	Descripción de las materias primas.....	24
4.1.1.1	Arroz .....	24
4.1.1.2	Agua .....	24
4.1.1.3	Enzimas.....	24
4.1.1.4	Levadura .....	25
4.1.2	Preparación del mosto.....	25
4.1.3	Cinética enzimática sobre la hidrólisis del almidón .....	25
4.1.4	Ajuste del mosto .....	25
4.1.5	Fermentación.....	25
4.1.6	Sedimentación.....	26
4.1.7	Clarificación .....	26
4.1.8	Ajuste de alcohol .....	26
4.1.9	Embotellado.....	26
4.1.10	Almacenamiento.....	26

<b>4.2</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SAKE</b>	<b>26</b>
4.2.1	Color por coordenadas CIEL *a*b*	26
4.2.2	pH	26
4.2.3	Acidez total	26
4.2.4	Porcentaje de alcohol	26
4.2.5	Turbidez	27
4.2.6	Gravedad específica	27
4.2.7	Grados brix	27
4.2.8	Azúcares reductores	27
<b>4.3</b>	<b>ANÁLISIS SENSORIAL</b>	<b>28</b>
4.3.1	Planteamiento para el entrenamiento de jueces	28
4.3.1.1	Requerimientos generales	28
4.3.1.2	Selección y adiestramiento	28
4.3.2	Terminología y métodos a emplear	29
4.3.2.1	Fase visual	29
4.3.2.1.1	Color/tono	29
4.3.2.1.2	Transparencia	29
4.3.2.2	Fase olfativa	29
4.3.2.2.1	Aroma a frutas	29
4.3.2.2.2	Aroma a caramelo	29
4.3.2.3	Fase gustativa	30
4.3.2.3.1	Dulzor	30
4.3.2.3.2	Cuerpo	30
4.3.2.3.3	Acabado/Regusto	30
4.3.2.3.4	Acidez	30
4.3.2.3.5	Amargor	31
4.3.3	Ejecución del análisis sensorial al Sake	31
4.3.4	Análisis de datos	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>PROCESO DE ELABORACIÓN DEL SAKE</b>	<b>32</b>

5.1.1	Características fisicoquímicas del arroz.....	32
5.1.2	Hidrólisis enzimática del almidón de arrocillo. ....	32
5.1.2.1	licuefacción del almidón.....	32
5.1.2.2	Sacarificación del almidón.....	34
5.1.3	Preparación de los mostos.....	37
5.1.4	Hidrólisis enzimática de los mostos.....	37
5.1.4.1	Licuefacción del almidón en los mostos.....	37
5.1.4.2	Sacarificación de las dextrinas en los mostos.....	38
5.1.5	Fermentación de los mostos.....	40
5.1.6	Sedimentación y clarificación.....	42
<b>5.2</b>	<b>CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS INICIALES DEL SAKE ELABORADO ..</b>	<b>43</b>
5.2.1	pH y acidez total.....	43
5.2.2	Color en escala CIEL *a*b* para el Sake.....	43
5.2.3	Densidad y turbidez del Sake elaborado.....	44
5.2.4	Sólidos solubles y azúcares reductores del Sake elaborado.....	45
5.2.5	Ajuste de la bebida obtenida.....	45
<b>5.3</b>	<b>EVALUACIÓN SENSORIAL.....</b>	<b>46</b>
5.3.1	Fase visual.....	47
5.3.2	Fase olfativa.....	47
5.3.3	Fase gustativa.....	48
5.3.4	Calificación global.....	48
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
9.1	Formato de selección de jueces.....	59
9.2	Formato de evaluación sensorial de los Sake elaborados.....	60
9.3	Ficha técnica Alfa amilasa HT 1000 A.....	62
9.4	Ficha técnica Glucoamilasa.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características del Sake .....	5
<b>Tabla 2.</b> Características de calidad de los diferentes tipos de Sake .....	12
<b>Tabla 3.</b> Características fisicoquímicas del arrocillo.....	32
<b>Tabla 4.</b> Cantidades utilizadas en la elaboración de 20 Litros de mosto. ....	37
<b>Tabla 5.</b> Sedimentos obtenidos durante la clarificación de los mostos.....	42
<b>Tabla 6.</b> pH y acidez total del Sake elaborado .....	43
<b>Tabla 7.</b> Color en escala CIEL *a*b* del Sake elaborado .....	44
<b>Tabla 8.</b> Densidad y turbidez del Sake elaborado .....	44
<b>Tabla 9.</b> Sólidos solubles y porcentaje de azúcares reductores del Sake elaborado.....	45
<b>Tabla 10.</b> Características fisicoquímicas finales del Sake elaborado .....	46

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Arroz para Sake y arroz para mesa.....	8
<b>Ilustración 2.</b> Porción de cadena de amilosa.....	14
<b>Ilustración 3.</b> Porción de cadena de amilopectina.....	15
<b>Ilustración 4.</b> Coloración de gram <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curva patrón de almidón.....	33
<b>Figura 2.</b> Hidrólisis del almidón en función del tiempo.....	34
<b>Figura 3.</b> Curva patrón azúcares reductores .....	35
<b>Figura 4.</b> Concentración de azúcares reductores en función del tiempo .....	35
<b>Figura 5.</b> Evolución de los grados brix durante la sacarificación .....	36
<b>Figura 6.</b> Licuefacción del almidón de arroz en los mostos.....	38
<b>Figura 7.</b> Sacararificación de las dextrinas en los mostos.....	38
<b>Figura 8.</b> Solidos solubles en el proceso de sacarificación .....	39
<b>Figura 9.</b> Evolución del % alcohol durante la fermentación.....	40
<b>Figura 10.</b> Evolución de los ° Brix durante la fermentación.....	41
<b>Figura 11.</b> Evolución del pH durante la fermentación. ....	42
<b>Figura 12.</b> Evolución de la acidez durante la fermentación.....	42
<b>Figura 13.</b> Evaluación sensorial de los Sake de 11%, 22% y 33% y del Sake comercial.....	47

## **DEDICATORIA**

*A Dios por no abandonarme en ningún momento, por ser mi fortaleza en tiempos de debilidad, por guiarme por el camino del bien, por ser mi todo.*

*A mi madre por ser mi luz, mi fuente de felicidad, por su apoyo y amor incondicional.*

*A mi padre, que a pesar de no estar presente físicamente siempre me ha acompañado y ha sido mi fortaleza para seguir este largo camino.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Un especial agradecimiento al Ph.D. Daniel Duran Director de la presente investigación por su valiosa y puntual asesoría, por su paciencia, dedicación, tiempo, conocimientos compartidos y por todo el apoyo recibido.

A la UNIVERSIDAD DE PAMPLONA por ser el espacio de formación, porque en sus aulas conocí a excelentes personas que han marcado mi vida en la parte personal y profesional.

Al programa INGENIERÍA DE ALIMENTOS por brindar una educación de calidad y fomentar la preparación tanto personal como profesional, igualmente a cada uno de los docentes que han sido un ejemplo a seguir con su dedicación, compromiso, amor al programa y a su rol como profesionales.

A mis compañeros de carrera gracias por todo el tiempo compartido y por todas las experiencias vividas, en especial doy mis agradecimientos a mi amiga María Solano por brindarme su confianza, su amistad y apoyo incondicional en la realización de esta investigación.

Agradezco a Fabiola Ramón por su amistad brindada, por sus consejos, colaboración y siempre disposición. Ella ha sido un gran ser, que imparte luz y felicidad a todos los que hacemos parte de esta hermosa carrera.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre por todos los sacrificios que ha hecho en estos años para poder verme como profesional, por enseñarme los valores que hoy en día poseo y que son mi mayor tesoro, por brindarme su amor incondicional, por siempre tener una palabra de aliento en momentos de dificultad.

## 1. RESUMEN DEL PROYECTO

El sake es una bebida alcohólica elaborada básicamente a partir de arroz y agua. Su apariencia es la del vino blanco, con una gama de color que va de casi transparente a amarillo pálido. El contenido de alcohol es del 13% al 17%, el cual es ligeramente mayor que el del vino con la diferencia que tiene un sabor sutil con poco amargor, acidez o astringencia. En el proceso de elaboración de esta bebida se incluye la utilización del *Aspergillus Oryzae* para la conversión del almidón a azúcares, que a pesar de que este proceso le confiere unas características especiales a este licor en muchos casos la hidrólisis de almidón no es tan efectiva, pudiéndose perder un potencial en la eficiencia y la producción de esta bebida que se expande por el mundo y que son cada vez más los consumidores. Por lo anterior, se planteó como objetivo sustituir la inoculación del *Aspergillus* por el uso de las enzimas Alfa amilasa y Glucoamilasa con el fin de determinar su efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del Sake. Para ello, se elaboraron tres mostos con diferentes concentraciones de arroz (11%, 22% y 33%) a los cuales se les adiciono la enzima alfa amilasa bacteriana en concentración 0,3% con respecto al almidón y la glucoamilasa en relación 1mg de enzima/g almidón. Seguidamente al mosto se le inoculo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* activa en proporción 5g/ litro. El Sake obtenido fue comparado con una muestra comercial en los análisis fisicoquímicos (color, porcentaje de alcohol, pH, acidez, gravedad específica, turbidez, azúcares reductores y grados brix). Asimismo, se realizó una prueba sensorial por medio de un grupo de jueces semientrenados en atributos visuales, olfativos y gustativos. Como resultados se obtuvo que en la etapa de licuefacción y sacarificación hay una mayor producción de azúcares reductores fermentables a medida que se aumenta la concentración de sustrato, siendo así la concentración de 33% de arroz la de mayor cantidad de azúcares finales (3,79%) y mayor cantidad de solidos solubles (12°Brix). Igualmente se encontró que con una concentración de arroz del 33% se obtienen mejores características fisicoquímicas y sensoriales en comparación con las concentraciones de 11% y 22% de arroz. Concluyendo que el Sake obtenido de la concentración del 33% de arroz presenta características similares a las del Sake comercial.

**PALABRAS CLAVES:** Arrocillo, características fisicoquímicas, licuefacción, sacarificación, Sake.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1 EI SAKE

#### 2.1.1 Historia del Sake

El vocablo “sake” se utiliza en Japón comúnmente para referirse a las bebidas alcohólicas en general, incluyendo el vino, la cerveza y el whisky. El sake propiamente dicho se denomina también “Nihon-shu” o “sei-shu”. El sufijo “shu” de estos vocablos se escribe con el mismo carácter chino o kanji que significa “sake” (酒). Este kanji se lee “sake”, “zake” o “shu”. “Nihon” significa Japón; por lo tanto, “Nihon-shu” se refiere a la bebida alcohólica tradicional de Japón. El prefijo “sei” en “sei-shu” significa limpio, transparente o refinado (Gauntner, 2002).

El arroz, cuyo grano se utiliza para elaborar el sake, ha venido cultivándose en la China durante más de 7.000 años y su uso en Asia para producir bebidas alcohólicas tiene un largo historial. Uno de los rasgos de las técnicas de fermentación asiática es el uso de mohos en lugar de malta para transformar el almidón en azúcar (sacarificación). China también es el lugar de origen de esta tecnología. Se cree que el arroz y la tecnología de la fermentación utilizados para elaborar el sake tienen su origen en la China. Sin embargo, en la actualidad Japón es el único país asiático que produce una bebida alcohólica transparente con un sabor refinado como el del sake. La historia del sake japonés se remonta a más de 2.000 años, durante los cuales los japoneses han venido mejorando continuamente su técnica de fermentación (Gauntner, 2002).

Históricamente, el sake también ha tenido una estrecha relación con la agricultura y los rituales sintoístas. En la antigüedad, la gente elaboraba el sake para ofrendarlo a los dioses junto con sus productos agrícolas y comida elaborada, y posteriormente los compartían, bebiendo y comiendo juntos. En la actualidad, todavía se hacen ofrendas de sake en los santuarios sintoístas y el sake constituye un regalo esencial en festivales y bodas. Al dar la bienvenida al Año Nuevo, las familias se reúnen y beben sake deseándose mutuamente longevidad.

Japón tiene cuatro estaciones bien marcadas, y existen muchas costumbres asociadas a las mismas en que se disfruta del sake. En la primavera, la gente disfruta del sake mientras contemplan los cerezos en flor. En el otoño, ellos colocan pétalos de crisantemo en los pocillos de sake y lo beben mientras admiran la luna. El invierno es la estación para apreciar paisajes de nieve mientras disfrutan del sake. Asimismo, los ingredientes de las comidas también varían con las estaciones y el *sakana* (tentempiés o tapas para acompañar el sake) se sirve de acuerdo con la estación.

El sake también se puede tomar caliente, práctica que se originó en el siglo IX, en que los aristócratas calentaban el sake para agasajar a sus invitados. Pero ya para el siglo XVIII, la gente solía tomar sake caliente durante todo el año. Fue más o menos en esta época que el médico Kaibara Ekiken escribió un libro indicando que el beber sake caliente mejora la circulación de *chi* (flujo de energía). Remontándonos 1.300 años, se tienen informes de que el emperador y los aristócratas bebían sake frío en el verano agregándole hielo que se había almacenado durante el invierno. Una manera muy

extravagante de disfrutarlo. A partir de los años 1980, empezó a aparecer una gran variedad de sake con sabor ligero y fresco, que invita a servirlo frío (Gauntner, 2002).

#### **2.1.1.1 Edad media: Establecimiento de la tecnología de elaboración del sake**

En los siglos del XII al XV, el sake se elaboraba en los santuarios sintoístas y templos budistas, y las técnicas de elaboración del sake que se emplea hoy en día fueron en su mayor parte desarrolladas durante dicho período.

Esta fue la época en que los elaboradores de sake empezaron a utilizar la fermentación con ácido láctico, elaborando el *shubo* (masa de semillas) para cultivar levadura, dependiendo del ácido láctico para inhibir la contaminación bacteriana, y luego agregando al *shubo* el *koji*, agua y arroz cocido al vapor en etapas de amasado. Hasta ese momento, los elaboradores habían usado el arroz pulido solamente para producir el *koji*, y arroz no pulido para elaborar el sake. Sin embargo, durante este período, se empezó a producir el sake *morohaku*, o sake elaborado empleando arroz pulido tanto para el arroz con *koji* como el arroz cocido a vapor para agregar a la masa. Los diarios de los monjes budistas de los siglos XV y XVI documentan el uso de *hi-ire* (pasteurización) con sake *morohaku*.

Simultáneamente con estos avances en la tecnología de elaboración del sake, las innovaciones en la tecnología de la carpintería permitieron la construcción de grandes cubas de 1.500 litros, que facilitó la producción en masa del sake. Esto condujo, en el siglo XVI (conocido como el período Muromachi), a la producción hecha y derecha del sake, por especialistas no afiliados ni con templos ni santuarios (Guía integral del Sake Japones parte 10, 2019).

#### **2.1.1.2 Período moderno temprano: Apogeo del *kudarizake***

En el siglo XVII, durante el Período Edo temprano, el *morohaku* producido cerca de Osaka en Itami (hoy en día ciudad de Itami en la prefectura de Hyogo) e Ikeda (hoy en día ciudad de Ikeda en la prefectura de Osaka), se abrió paso hacia las tres ciudades principales: Kioto, Osaka y Edo (hoy Tokio). Se popularizó especialmente en Edo, en donde se denominada *kudarizake*. La producción de *kudarizake* llegó a los 38.000 kilolitros al principio del siglo XVIII. Esto es equivalente a un consumo anual per capita de 54 litros entre los habitantes de Edo, incluyendo la clase samurai. Grandes cantidades de sake se embalsaban en barriles y se transportaban mediante barcos de vela. Al principio del siglo XIX, los barcos que transportaban sake solían competir en carreras para ver cuál de ellos arribaba al puerto de Edo primero. Se dice que hacían la travesía desde Kobe hasta Tokio en sólo tres o cuatro días, en comparación con los 10 a 30 días que generalmente tomaba en esos días.

La producción de sake en el siglo XVIII requería el uso de casi la misma cantidad de arroz pulido (1,3-2,3 toneladas) por lote como ahora, y el proceso de amasado consistía prácticamente en el mismo proceso de amasado de tres etapas actualmente en uso. Sin embargo, la proporción del agua agregada con respecto al arroz pulido era solamente alrededor de la mitad. Esto sugiere que la gente de esa época prefería un sake denso y dulce con alta viscosidad. Los expedientes de esa época indican también que se agregaba ceniza de madera al *moromi* para reducir la acidez antes de su filtrado, y también se refieren a la adición de licores elaborados por destilación del *sakekasu*, que

corresponde a la práctica actual de adicionar alcohol. La cantidad de licor que se agregaba era equivalente a aprox. el 10% del peso del arroz, resultando en un sake con alto contenido de alcohol que era resistente a la descomposición.

El inicio del siglo XIX fue testigo del cambio del centro de producción de sake de Itami, Ikeda y zonas adyacentes a Nadagogo. (Nadagogo se refiere a las cinco áreas cubiertas por las actuales ciudades de Nishinomiya y Kobe en la prefectura de Hyogo.) Las técnicas empleadas para elaborar el sake de Nada se caracterizaban por el uso del denominado *miyamizu* (agua obtenida en Nishinomiya, prefectura de Hyogo), que fue descubierta alrededor de 1850, la molienda con rueda hidráulica, y concentración de la elaboración del sake en los meses más fríos del año. El *miyamizu* contiene grandes cantidades de fosfatos y potasio, que fomentan la proliferación de hongos *koji* y levadura, y fortalecen la fermentación del *moromi*. El cambio de los pedales operado a pie a ruedas hidráulicas para la molienda del arroz aumentó no solamente la productividad, sino que también mejoró la calidad al incrementarse el nivel de la molienda (es decir, reduciendo el *seimai-buai*). Al mismo tiempo, la concentración de la producción de sake en el invierno, en que hay menor riesgo de contaminación bacteriana, facilitó la producción estable de sakes de alta calidad. Las recetas de amasado se asemejaban a los que se usan en la elaboración del sake moderno, y Nada floreció como el centro de la elaboración del sake japonés, estatus que retiene hasta la fecha (Guía integral del Sake Japones parte 10, 2019).

### 2.1.1.3 Período moderno

Desde alrededor de mediados del siglo XIX, la llegada a Japón de eruditos europeos marcó también el inicio de la investigación científica sobre el sake. El alemán Oskar Korschelt, que llegó a Japón en 1868, y el británico Robert William Atkinson, escribieron informes expresando su asombro por el hecho de que los elaboradores de sake en Japón habían venido practicando la pasteurización desde tiempos inmemoriales empleando técnicas similares a la pasteurización a baja temperatura de Pasteur. En 1904, se estableció el instituto nacional (hoy en día el Instituto Nacional de Investigación de Bebidas Alcohólicas), que tuvo una importante contribución al desarrollo de la elaboración del sake en años subsiguientes. Debe destacarse la invención en 1909 de *yamahaimoto*, una versión mejorada del estilo *kimoto*, y *sokujomoto*, que emplea el ácido láctico, que contribuyó a la estabilización y racionalización de la producción del sake, cuyo resultado es que en la actualidad el *sokujomoto* es el método más ampliamente utilizado en la producción de *shubo*. En 1911 se iniciaron programas de evaluación de calidad con el fin de elevar la tecnología de elaboración, y se llevó a cabo el primer concurso nacional (actualmente *Zenkoku Shinshu Kanpyo-kai*, o Premio Nacional del Nuevo Sake), institución que continúa hasta la fecha.

Los desarrollos posteriores que influyeron en la tecnología de la elaboración del sake incluyeron los grandes progresos en el entendimiento de la ciencia de la fermentación, el uso científico de microorganismos, el advenimiento de máquinas de molienda de arroz motorizadas, el cambio de cubas de madera a tanques de esmalte, y el embotellado del sake para su despacho. El período durante la II Guerra Mundial y el inmediato período de pos-guerra fueron testigo de cambios dramáticos en los métodos de producción, tal como la práctica de agregar alcohol al sake. Una ola de modernización en los procesos de

producción en la década de 1960 y la introducción de maquinarias resultaron en mayor racionalización.

Las tendencias más recientes que influyen en el sake incluyen la idea de “producción local para consumo local”, por lo que las zonas regionales están dando otro vistazo a las destrezas y recursos que poseen y pueden ofrecer, cuyo resultado es el desarrollo de nuevas variedades de arroz para sake y tipos sui generis de levaduras de sake que se emplean en la fermentación (Castillo y España, 2011).

### 2.1.2 Características del sake

El sake es una bebida alcohólica elaborada básicamente a partir de arroz y agua. Su apariencia es la del vino blanco, con una gama que va de casi transparente a un color amarillo pálido. El contenido de alcohol de 13% a 17% de muchas variedades de sake es ligeramente mayor que el del vino, pero el sake también tiene un sabor sutil con poco amargor, acidez o astringencia. En cuanto a su composición química, el extracto del sake (consistente en su mayor parte de azúcares residuales) contiene un porcentaje comparativamente alto de glucosa y niveles significativos de componentes nitrogenados y aminoácidos, pero poco ácido orgánico (Castillo y España, 2011).

**Tabla 1.** Características del Sake

Propiedad	Sake	Cerveza	Vino blanco
Alcohol (%)	13 - 17	4 - 6	10 - 13
Extracto (g/100ml)	3 - 6	3 - 4	2 - 8
Glucosa (g/100ml)	0,5 - 4,2	0,03 - 0,1	0,1 - 3
Nitrógeno (mg/l)	700 - 1900	250 - 1000	100 - 900
Ácido glutámico (mg/l)	100 - 250	10 - 15	10 - 90
Acidez titulable (g/100ml)	0,1 - 0,2	0,15 - 0,2	0,5 - 0,9
pH	4,2 - 4,7	4,1 - 4,4	3,0 - 4,1
Ácido succínico (mg/l)	200 - 500	40 - 100	500 - 1500
Ácido málico (mg/l)	100 - 400	50 - 120	250 - 5000
Ácido tartárico (mg/l)	0	0	1500 - 4000
SO <sub>2</sub> (total) (mg/l)	0	-20	-250

**Fuente:** Guía integral del Sake Japones parte 1.

La degustación minuciosa del sake revela un sabor agradable, que no puede caracterizarse como dulce, ácido, amargo ni astringente. Esto es el *umami*. Este vocablo *umami* algunas veces se describe como “sabroso”. En comparación con el vino y la cerveza, el sake es más rico en aminoácidos y péptidos, los cuales producen el *umami*. El tipo de sake conocido como *ginjo* tiene un aroma deliciosamente afrutado.

El sake, elaborado a partir del grano de arroz japonés y agua limpia, es la cristalización de la tecnología exquisita de la fermentación diseñada para producir el *umami* y el aroma afrutado a partir del grano de arroz.

La creciente popularidad del sushi y de otros platos típicos de la cocina japonesa en el extranjero ha contribuido a popularizar el sake en el resto del mundo. El sabor sutil del sake armoniza bien con los platos de la cocina francesa, italiana y china, y está ganando adeptos por ser una nueva bebida alcohólica, que se distingue del vino y la cerveza (Castillo y España, 2011).

### 2.1.3 Tipos de sake

La Ley del Impuesto a las Bebidas Alcohólicas de Japón define los ingredientes y el proceso de fabricación que se deben usar en la producción de sake. Esta Ley establece que el sake debe elaborarse de arroz, *koji* y arroz, o a partir de estos ingredientes más alcohol neutro (alcohol etílico de origen agrícola, denominado *jozo*-alcohol) o azúcares y algunos otros ingredientes. Asimismo, confiere designaciones especiales (denominadas *tokutei-meisho*) para el sake de sabor y apariencia superiores y que se produce de acuerdo con determinados criterios relacionados con sus ingredientes y pulido. Estas designaciones especiales incluyen a *ginjo*, *daiginjo*, *junmai ginjo*, *junmai daiginjo*, *junmai*, y *honjozo*. Estos actualmente constituyen alrededor del 30% de la producción total de sake y pueden ser considerados como sake de alta calidad.

Las etiquetas de sake de alta calidad incluyen su designación especial junto con otras descripciones, dependiendo del proceso de fabricación.

Ejemplos de etiquetado:

*Junmai*

*Junmai nama genshu Ginjo koshu*

A continuación, se explican las definiciones y características del sabor de los productos de sake de designación especial y el sake elaborado utilizando otros procesos de fabricación. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las descripciones de sabor que se presentan aquí son de índole general, dado que cada marca posee sus propias características sutiles (Philip y Haruo, 2006)

#### 2.1.3.1 Sake de designación especial y características de cada tipo

El arroz utilizado en la elaboración del sake de designación especial debe someterse a inspección para garantizar que cumple con las normas exigidas. Para cada designación, existen también normas relacionadas con el porcentaje de pulido y cantidad de alcohol neutro utilizado. Además, la cantidad del *koji-mai* utilizado en la producción del arroz con *koji* debe ser igual a cuando menos el 15% del peso total del arroz pulido utilizado (Philip y Haruo, 2006).

##### 2.1.3.1.1 Ginjo

El *ginjo-shu* se elabora a partir de granos de arroz de los que se ha quitado más del 40% de su capa externa por molienda. Su fermentación se efectúa a temperaturas más bajas y toma más tiempo. Se puede agregar *jozo*-alcohol equivalente al 10% del peso del arroz pulido.

Tiene una fragancia afrutada denominada *ginjo-ka*, con sabor ligero no ácido. El término "ligero" no significa simplemente "suave" o "diluido". El sake también debe tener una textura suave (al paladar) y dejar un buen regusto.

Las características específicas del *ginjo-shu* varían según el fabricante, con las variedades más fragantes concebidas para realzar el *ginjo-ka*, y otras concebidas para dar mayor énfasis a su sabor que al *ginjo-ka* (Philip y Haruo, 2006).

##### 2.1.3.1.2 Daiginjo

El *daiginjo-shu* es una variación del *ginjo-shu* elaborado con granos de arroz aun más altamente pulido que este último, de los que se ha quitado por lo menos el 50% de su

capa externa. Tiene un sabor mucho más refinado y *ginjo-ka* más fuerte que los del *ginjo-shu* (Philip y Haruo, 2006).

#### 2.1.3.1.3 Junmai

El *junmai-shu* se elabora solamente de arroz, *koji* y agua, realzando el sabor del arroz y *koji* más que otras variedades. No hay exigencias en cuanto a su porcentaje de pulido. El *junmai-shu* típicamente se caracteriza por su alta acidez y *umami*, con relativamente poco dulzor (Philip y Haruo, 2006).

#### 2.1.3.1.4 Junmai ginjo

Como en la elaboración del *junmai ginjo-shu* se utilizan las técnicas de elaboración del *ginjo*, la acidez y el *umami* se encuentran atenuadas y su *ginjo-ka* es palpable (Philip y Haruo, 2006).

#### 2.1.3.1.5 Junmai daiginjo

El *junmai daiginjo-shu* está considerado como el sake de la más alta calidad. Los mejores productos de esta clase ofrecen una buena combinación que armoniza el sabor refinado con la acidez y el *umami* (Philip y Haruo, 2006).

#### 2.1.3.1.6 Honjozo

En el *honjozo-shu*, el énfasis es su sabor y tiene poco *ginjo-ka* o aroma producido por el añejamiento. Tiene un nivel razonable de acidez y *umami*; y en vez de acentuar el aroma y sabor del sake en sí, contribuye a realzar el sabor de la comida (Philip y Haruo, 2006).

### 2.1.3.2 Futsu-shu (sake ordinario o no de alta calidad) y sus características

La mayor parte del sake elaborado en Japón se clasifica como *futsu-shu*. El arroz utilizado en la elaboración del *futsu-shu* se pule, en promedio, a aprox. el 70%, y la cantidad de *jozo*-alcohol utilizado equivale a aprox. 20% del peso del arroz pulido.

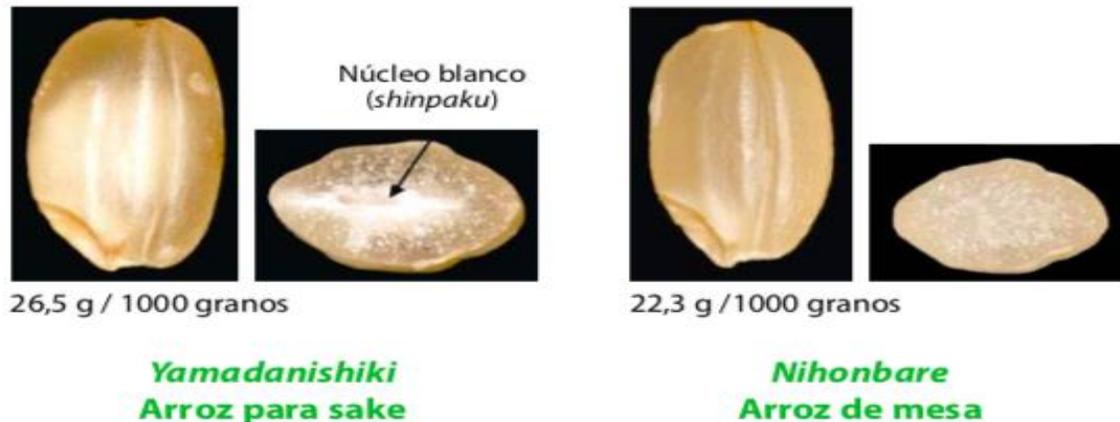
El aroma del *futsu-shu* no es tan marcado como el del sake de designación especial. A lo más, puede decirse que tiene un leve aroma a caramelo, como resultado de su añejamiento. Los perfiles gustativos del *futsu-shu* también reflejan que goza de mayor preferencia gustativa regional que el sake de alta calidad (Philip y Haruo, 2006).

## 2.1.4 Características y generalidades de las materias primas

### 2.1.4.1 El arroz

Los granos del arroz para sake son largos y tienen un núcleo blanco (*shinpaku*, estrato blanco y opaco en el centro del grano compuesto de una matriz de gránulos de almidón salpicados de vacíos) así como también un bajo contenido de proteínas. El término “grano largo” se refiere a cualquier arroz que pesa 26 g o más por cada 1.000 granos de arroz (Ilustración 1). Para que el arroz sea adecuado para su uso en la elaboración de sake, debe ser hidrófilo, resistente al cocinarse al vapor y, debido a su gran *shinpaku* en el núcleo, fácil de que se convierta en *koji*. Asimismo, debe ser fácilmente soluble en *moromi* (masa principal) y contener poca proteína, dado que su excesiva cantidad puede resultar en *zatsumi* (sabor no refinado). El arroz para sake reúne todas estas características (O'Toole, 2016).

### Ilustración 1. Arroz para Sake y arroz para mesa



Fuente: O'Toole, 2016

#### 2.1.4.2 El agua

La mayor parte del agua en Japón es agua blanda; su dureza total, expresada en carbonato de calcio equivalente, es menos de 60 mg/litro; pero en algunas zonas, el agua es de mayor dureza. Por ejemplo, en el distrito de Nada cerca de Kobe, existe una zona de agua dura con carbonato de calcio equivalente de 150 mg/litro. El calcio estimula la producción y extracción de enzimas. Otros minerales en el agua dura, tales como potasio, magnesio y fosfatos, contribuyen al proceso de fermentación estimulando la proliferación de hongos *koji* y levadura. Por esta razón, el sake producido en zonas de agua dura tiende a tener mucho cuerpo y un sabor seco, con buen acabado (O'Toole, 2016).

#### 2.1.4.3 El hongo KOJI (*Aspergillus oryzae*)

En términos generales, los estilos de *koji* pueden clasificarse en *sohaze* y *tsukihaze*. En el *sohaze*, los hongos *koji* cubren todo el grano de arroz haciendo que muchas hifas, o filamentos, penetren y crezcan en el grano. En este estilo, el *koji* tiene una fuerte actividad enzimática y el *koji* es rico en vitaminas producidas por los hongos *koji*. El *koji* elaborado de acuerdo con el estilo *sohaze* disuelve bien el arroz y estimula una fuerte fermentación, lo que resulta en un sake con mucho cuerpo. Se utiliza para producir un sake robusto y el *futsu-shu* (sake común) al que se agrega alcohol.

En el estilo *tsukihaze*, los hongos *koji* crecen de forma moteada sobre el grano de arroz. Un corte transversal del grano mostrará lugares en que han crecido hifas bien desarrolladas en el grano y otros en que no existen hifas. Aunque esto aún asegura una apropiada actividad enzimática, su contenido de vitaminas y grasas es bajo. El sake elaborado con este tipo de *koji* tiene un sabor más ligero que el sake de estilo *sohaze*. El Ginjo-shu, en particular, debe producirse usando el estilo *tsukihaze*. El *toji* controla cuidadosamente la cantidad de esporas de hongos *koji* a usar, la cantidad de agua, y la temperatura para producir el *koji* que tiene estas características diferentes. (Hiroichi y Takashi, 2010).

## **2.1.5 Características del sake elaborado por otros procesos de fabricación**

### **2.1.5.1 Nigorizake (sake turbio)**

El nigorizake tiene una apariencia turbia causada por la levadura y las partículas finas del arroz cocido al vapor. Tiene un marcado sabor del arroz.

Normalmente, cuando se filtra el moromi (masa principal), éste se coloca en una bolsa de tela, de modo que el sake filtrado es bastante transparente y contiene sólo trazas de sedimento. Sin embargo, para el nigorizake, se utiliza una tela de tejido burdo o malla y, por consiguiente, queda como sedimento en el sake filtrado, algo de la levadura y de las partículas finas del arroz cocido a vapor (Furukawa, 2012).

### **2.1.5.2 Namazake (sake no pasteurizado) y nama-chozo-shu (sake no pasteurizado en almacenaje)**

El namazake y el nama-chozo-shu son variedades de sake con sabor a sake recién elaborado.

Normalmente, el sake se pasteuriza dos veces antes de su embotellado. El propósito de la primera pasteurización es no solamente esterilizarlo sino también estabilizar su calidad frenando la acción de las enzimas. El sake se pasteuriza por segunda vez en la etapa de embotellado para su esterilización. Pero el namazake no se pasteuriza en absoluto. El nama-chozo-shu es el sake que se almacena (chozo) a baja temperatura en la fábrica en estado no pasteurizado y se pasteuriza solamente en la etapa de embotellado (Furukawa, 2012).

### **2.1.5.3 Kosu (sake añejo)**

El color del kosu varía de amarillo a ámbar. Contiene poco ginjo-ka, pero tiene aroma a caramelo (con toques de miel, frutas secas, molasas y salsa de soya), similar al jerez y madeira, así como también un aroma con dejo a nueces y especias. Tiene un sabor ligeramente amargo y un retrogusto largo. Normalmente, el amargor no se considera como un rasgo deseable en el sake, pero es una de las características del sake añejado por tiempo prolongado.

Por lo general, el sake se hace añejar en almacenaje durante aprox. seis meses a un año antes de su despacho. En el caso del kosu, el proceso de añejamiento dura por lo menos tres años, período en el que su color y sabor cambian debido a la reacción de Maillard entre los azúcares y aminoácidos presentes en el sake (Furukawa, 2012).

### **2.1.5.4 Genshu (sake no diluido)**

Como no se le agrega agua tras su producción, el genshu tiene un alto contenido de alcohol, en la gama de 17%-20%. Su sabor es normalmente fuerte (Furukawa, 2012).

### **2.1.5.5 Taruzake (sake en barril)**

El taruzake se almacena por cierto tiempo en barriles hechos del cedro japonés, lo cual le confiere un aroma a cedro.

Hasta principios del siglo XX, el sake normalmente se transportaba en barriles. Luego, el distribuidor del sake lo transfería del barril a un recipiente de barro cocido para su venta. Hoy en día, casi todos los productos de sake se venden embotellados. Sin embargo, algunos bares típicamente japoneses o restaurantes de fideos de soba todavía sirven taruzake. El taruzake también se utiliza en ceremonias de inauguración y celebraciones,

en un ritual que se denomina kagami-biraki, en que la tapa redonda del barril (que se asemeja a un espejo tradicional o kagami) se abre con un mazo de madera, y el sake se sirve a todos los invitados (Furukawa, 2012).

#### **2.1.5.6 Sake espumante**

Hay variedades espumantes en las que el sake se carbonata reteniendo el dióxido de carbono producido de la segunda fermentación con levadura, o inyectando dióxido de carbono. Estos espumantes varían ampliamente desde productos dulces con contenido de alcohol de 6% a 8% a aquellos con alto contenido de alcohol y sabor seco. También varían en apariencia, de infusiones claras a nigorizake turbio (Furukawa, 2012).

### **2.1.6 Factores que influyen en tipos y variedades de sake**

Los factores que determinan las características de los sakes son: diferencias en arroz, agua, medioambiente, preferencias gustativas locales, y técnicas de elaboración de sakes.

#### **2.1.6.1 Arroz**

No se cultiva sólo una variedad de arroz. Las distintas regiones se prestan para la producción de variedades diferentes de arroz.

Para que el arroz sea adecuado para su uso en la elaboración de sake, debe ser hidrófilo, resistente al cocinarse al vapor y, debido a su gran shinpaku en el núcleo, fácil de que se convierta en koji. Asimismo, debe ser fácilmente soluble en moromi (masa principal) y contener poca proteína, dado que su excesiva cantidad puede resultar en zatsumi (sabor no refinado). El arroz para sake reúne todas estas características. Los niveles de solubilidad y otras características del arroz para sake difieren según la variedad, y estas diferencias se reflejan en las características del sabor del sake (Guía integral del Sake Japonés parte 8, 2019)

#### **2.1.6.2 Agua**

La mayor parte del agua es agua blanda, pero existen algunas zonas en que el agua es dura. En estas zonas, se produce el sake seco, evocador del agua dura.

#### **2.1.6.3 Medioambiente**

En las zonas frente al Mar de Japón, tales como las prefecturas de Niigata, Yamagata y Akita, hay abundancia de nieve en el invierno y gozan de temperaturas bajas estables y un medioambiente limpio, condiciones que son ideales para producir un sake con sabor limpio y delicado.

#### **2.1.6.4 Preferencias gustativas locales**

Los habitantes de la región de Kyushu prefieren alimentos con un sabor ligeramente dulce, y aparentemente esta región produce muchos productos de sake de sabor más dulce. En el interior y otras regiones en que nieva bastante, históricamente sus habitantes tenían que utilizar la sal para conservar sus alimentos. Esto también ha resultado en la preferencia por variedades de sake de sabor más dulce en estas regiones.

### 2.1.6.5 Técnicas de elaboración del sake

Las técnicas modernas de elaboración del sake se derivan de las técnicas desarrolladas en las zonas de Nada e Itami durante el siglo XIX. A medida que estas técnicas se propagaron a otras zonas, surgieron variaciones locales adecuadas al arroz, agua, medioambiente y preferencias gustativas locales de cada región. Estas técnicas han sido transmitidas por los gremios de elaboración regionales, originándose así las características regionales que observamos hoy en día (Guía integral del Sake Japonés parte 8, 2019).

### 2.1.7 Usos del sake

- En general, se toma frío o a temperatura ambiente, aunque algunos de los sakes más fuertes pueden calentarse a unos 40 °C y tomarse templados.
- Los japoneses lo toman en pequeños vasos de vidrio o cerámica, decorados con motivos de arte tradicional.
- El buen sake resulta el mejor acompañamiento de platos ligeros, como pescados, pollos o pasta, aunque acostumbra a tomarse solo.
- El sake generalmente bebido como parte de rituales de purificación sintoístas. Durante la Segunda Guerra Mundial, los pilotos kamikaze bebían sake antes de llevar a cabo sus misiones.
- Hoy en día se abren barriles de sake durante festivales y ceremonias sintoístas o luego de victorias deportivas: este sake (llamado iwai-zake, literalmente "sake de celebración") es servido libremente a todos para repartir la buena fortuna. El sake es también servido junto a las comidas livianas que acompañan algunas ceremonias del té (Guía integral del Sake Japonés parte 8, 2019).

### 2.1.8 Normatividad

#### 2.1.8.1 Definición de sake

Artículo 3 de la Ley del Impuesto sobre bebidas Alcohólicas: El vocablo "sake" se refiere a cualquiera de las siguientes bebidas alcohólicas cuyo contenido de alcohol es menos del 22%.

- a. El producto filtrado de la fermentación de arroz, arroz con *koji* y agua.
- b. El producto filtrado de la fermentación de arroz, arroz con *koji*, agua, *sakekasu* y otros elementos especificados en la normativa (el peso total de tales otros elementos especificados en la normativa no debe exceder del 50% del peso total del arroz, incluyendo el arroz para elaborar el arroz con *koji*).
- c. El producto filtrado de la adición del *sakekasu* al sake (Organización mundial del comercio)

#### 2.1.8.2 Sustancias especificadas como ingredientes del sake

Artículo 2 de la Orden de Ejecución de la Ley del Impuesto sobre Bebidas Alcohólicas: Las sustancias especificadas en la normativa como ingredientes del sake son: alcohol, *shochu*, azúcares, ácidos orgánicos, sales de aminoácidos y sake (Organización mundial del comercio).

### 2.1.8.3 Normas de etiquetado

Aviso de la Agencia Nacional de Impuestos “Normas de etiquetado de calidad de elaboración del sake”:

- Cuando un producto de sake cumple con las condiciones de calidad de elaboración indicadas en la columna de la derecha de la siguiente tabla, la etiqueta del recipiente o embalaje de dicho sake puede indicarlo con la correspondiente designación especial que se muestra en la columna de la izquierda (Agencia Nacional de Impuestos).

**Tabla 2.** Características de calidad de los diferentes tipos de Sake

Designación especial	Requerimientos de calidad de elaboración
<i>Ginjo-shu</i>	Sake cuyo sabor, color y brillo son intrínsecamente buenos y se ha elaborado cuidadosamente con arroz pulido con contenido de <i>seimai-buai</i> no mayor del 60%, arroz con <i>koji</i> y agua, o con estos ingredientes junto con <i>jozo</i> -alcohol.
<i>Junmai-shu</i>	Sake cuyo sabor, color y brillo son buenos y se ha elaborado con arroz pulido, arroz con <i>koji</i> y agua.
<i>Honjozo-shu</i>	Sake cuyo sabor, color y brillo son buenos y se ha elaborado con arroz pulido con contenido de <i>seimai-buai</i> no mayor del 70%, arroz con <i>koji</i> , <i>jozo</i> -alcohol y agua.

**Fuente:** Agencia Nacional de Impuestos

- La etiqueta del sake de designación especial, según lo descrito en el párrafo anterior, debe usar solamente la designación especial correspondiente y no incluir palabras similares o palabras con la intención de dar la impresión de calidad superior, tal como *gokujo* (calidad extra), *yuryo* (grado fino) o *kokyu* (calidad premium). Sin embargo, se permite el uso de los vocablos que se mencionan a continuación, de ser relevantes:
  - Para productos de *ginjo-shu* elaborados solamente con arroz, arroz con *koji* y agua, se permite usar la clasificación “junmai” junto con “ginjo-shu”.
  - Para el *ginjo-shu* cuyo sabor, color y brillo intrínsecos son especialmente buenos y es elaborado con arroz pulido con un *seimai-buai* del 50% o menos, se permite usar la clasificación “daiginjo-shu”.
  - Para el *junmai-shu* o *honjozo-shu* cuyo sabor, color y brillo son excepcionalmente buenos, se permite usar las clasificaciones “tokubetsu junmai-shu” o “tokubetsu honjozo-shu”, respectivamente, en aquellos casos en que los criterios objetivos, tales como los ingredientes empleados o el proceso de fabricación, se encuentran explicados en el recipiente o embalaje de dicho sake (si el *seimai-buai* es la base de dicha explicación, el sake debe tener un *seimai-buai* de 60% o menos)
- El recipiente o embalaje del sake debe llevar una etiqueta que indique cada uno de los siguientes ítems, de ser relevante:
  - Ingredientes
  - Fecha de fabricación
  - Precauciones relacionadas con el almacenaje o consumo
  - País de origen
  - Ítems opcionales: variedad de arroz empleado, localidad de producción, edad, declaraciones relacionadas con permisos.

- Prohibiciones: Los vocablos indicados a continuación no pueden indicarse en el recipiente o embalaje del sake. Sin embargo, el tipo de vocablos mencionados en (3) es permisible, siempre y cuando se incluya una explicación a continuación de dichos vocablos en caracteres por lo menos de los tamaños especificados en el párrafo 4 declarando que el sake en cuestión no es un sake de designación especial.
  - i. Vocablos, tales como “saiko” (el mejor), “dai-ichi” (el número uno), o “daihyo” (puntero), insinuando que el método de producción del sake o su calidad es lo óptimo de la industria.
  - ii. “Proveedores oficiales de tal y tal dependencia pública” o vocablos similares.Vocablos similares a “sake de designación especial” en el caso de un sake que no ha sido calificado como un sake de designación especial (Agencia Nacional de Impuestos).

## 2.2 ALMIDON

### 2.2.1 GENERALIDADES

El almidón es un hidrato de carbono complejo  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , en forma de grano o polvo, principal molécula de reserva en la mayoría de las plantas; se acumula en los cloroplastos de las hojas y en los amiloplastos, en los cuales se forma después de la translocación de sacarosa u otro carbohidrato provenientes de las hojas; la cantidad de almidón varía en los diversos vegetales y depende de muchos factores genéticos y ambientales (Robinson, 1991) esta cantidad de almidón varía, pero generalmente oscila entre el 60 y 75% del peso del grano, en el caso del arroz los gránulos de almidón constituyen aproximadamente el 90% del peso seco en arroz blanco. El almidón presente en los granos es el más importante de los carbohidratos para fines industriales resultando preciso degradarlo enzimáticamente con una gelatinización previa por acción de calor o sometiendo a un intenso trabajo mecánico (Navarro y Sossa, 2003).

Por otra parte, al aplicar procesos tecnológicos, durante la producción, elaboración, transformación y almacenamiento del arroz, se logran obtener cambios físicos y químicos, como modificaciones del olor, color, sabor, textura, volumen y peso. A su vez se logra desnaturalizar y gelatinizar las proteínas, aumentando su capacidad de absorción de agua. Este tipo de cereal al ser preparado con agua retiene gran volumen hasta alcanzar el punto máximo de hinchamiento, el cual está ligado a la gelatinización y a la capacidad de rehidratación, mientras que los cambios químicos afectan la composición molecular en el reordenamiento de grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales; alterando su estructura (Toro *et al.*, 2011). Cuando este tipo de alimento se somete al calor también aporta un beneficio al cumplir con la función de inhibir o destruir la proliferación microbiana (Torres *et al.*, 2015).

La hidrólisis industrial del almidón comprende 3 etapas sucesivas:

- **Gelatinización:** Cuando el almidón es calentado en agua en exceso, este cae en una fase de transición; esta fase está asociada con una difusión de agua dentro del gránulo y posterior región amorfa, hidratación e hinchazón radial, pérdida de birrefringencia, pérdida del orden de región cristalina y lixiviación de la amilosa y amilopectina.

- **La licuefacción o dextrinización:** es el proceso mediante el cual a partir de un almidón gelatinizado se obtiene una rápida disminución de la viscosidad en virtud de una hidrólisis parcial. En esta etapa se producen polisacáridos de longitud intermedia (maltodextrinas con 5 a 10 unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de polisacáridos de alto peso molecular, como también algunos de bajo peso molecular (glucosa, maltosa entre otros).

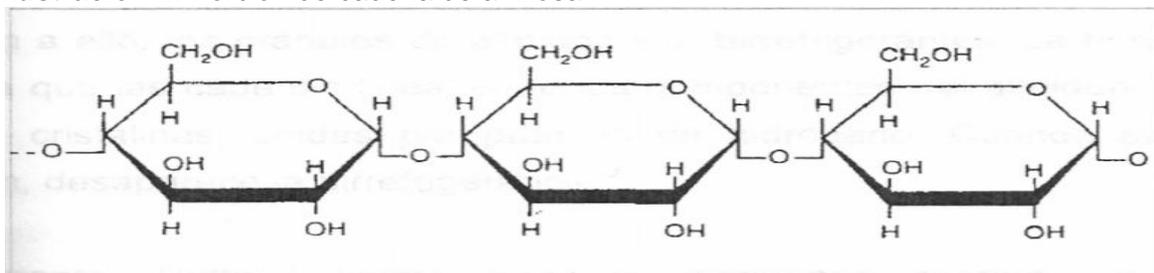
- **Sacarificación:** a partir de las maltodextrinas de la etapa anterior se completa la hidrólisis total del almidón a glucosa. En la digestibilidad de almidones como materia prima, muchos factores como el tamaño de particular, relación de amilosa: amilopectina, extensión de la asociación molecular entre los componentes del almidón, grado de cristalinidad, longitud de la cadena de amilosa y presencia de complejos lípidos-amilosa, juegan un papel importante en la degradación hidrolítica (Cummings *et al.*, 1995).

El almidón es poliglucosa, y los dos tipos de glucosa que constituyen sus polímeros de almidón son la amilosa (20 % (p/p)) que es soluble en agua y amilopectina (80% (p/p)) que es insoluble en agua con un alto peso molecular (Navarro y Sossa, 2003). Durante la última década se han adelantado trabajos tecnológicos que permiten una comprensión más profunda de que la estructura del almidón puede llegar a ser manipulada y orientada para la elaboración de determinados productos, así como buscar aplicaciones para ayudar en la identificación de nuevos posibles usos (Beltrán, 2010).

### 2.2.1.1 Amilosa

La inmensa mayor parte de la amilosa es una cadena lineal de unidades de  $\alpha$ -D glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4), aunque existen también moléculas que poseen unas pocas ramificaciones en posición (1-6), alrededor de una cada 180-320 unidades, o lo que es lo mismo, el 0,3-0,5% de los enlaces. Las ramificaciones de la amilosa ramificada pueden ser muy largas o muy cortas, pero los puntos de ramificación están separados por largas distancias, de manera que las propiedades físicas de las moléculas de amilosa son esencialmente las de las 10 moléculas lineales (Beltrán, 2010). La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa (Ilustración 2).

**Ilustración 2.** Porción de cadena de amilosa



Fuente: Beltrán, 2010

Es un polímero de glucosa que contiene de 1.000 a 4.000 unidades de este monómero, tiene por tanto un peso molecular de 200.000-800.000 daltons, valor que varía no sólo según la especie de planta, sino también dentro de la misma especie y depende del

estado de maduración. Cada unidad de glucosa está unida a la próxima por un enlace glucosídico  $\alpha$ -1,4. Este enlace determina que el grupo reductor de la glucosa, situado en la posición uno, pierda la funcionalidad, una molécula de amilosa no tiene más poder reductor que el correspondiente a una sola molécula de glucosa, porque sólo tiene un grupo reductor funcional, situado en un extremo (Hoseney, 1991).

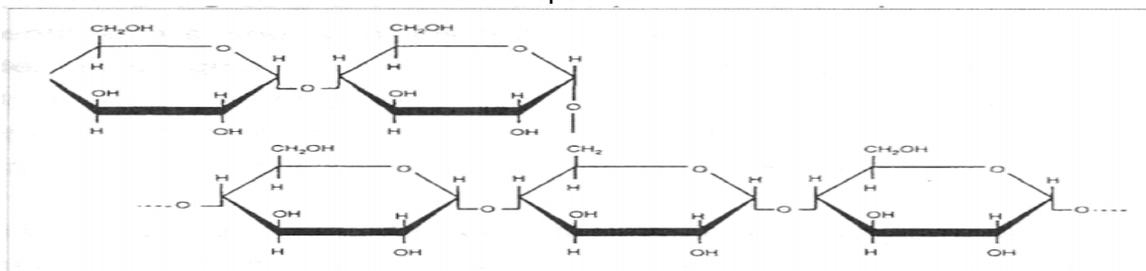
Generalmente, es un polímero lineal, aunque se cree que solamente para una parte de la amilosa, siendo ligeramente ramificado el resto. Cuando se lixivia el almidón para separar la amilosa calentando ligeramente por encima de la temperatura de gelificación del almidón, la amilosa solubilizada es esencialmente lineal. La naturaleza lineal y de gran longitud, confiere a la amilosa algunas propiedades únicas, por ejemplo: su capacidad para formar complejos con yodos, alcoholes o ácidos orgánicos. Estos complejos se llaman clatratos o compuestos de inclusión helicoidal (Hoseney, 1991).

**Clasificación del arroz de acuerdo al contenido de amilosa:** waxy con el 0-5%, muy bajo (5,1-12,0%), bajo (12,1-20%), intermedio (20,1-25%) y alto (> 25%). Las variedades con muy bajo contenido de amilosa son glutinosas o “waxy”, que dan granos húmedos y pegajosos cuando están cocidos; los de altos contenidos de amilosa son duros y sueltos al estar cocidos (Loaiza, 2016). El porcentaje de amilosa permite predecir la calidad culinaria de arroz, es una medida indirecta de su palatabilidad y comportamiento en cocción (Martínez y Cuevas, 1989).

### 2.2.1.2 Amilopectina

Es un polisacárido cuyas cadenas principales son restos de glucosa unidos en enlace  $\alpha$ -1,4, como en la amilosa, y que presentan esporádicamente ramificaciones  $\alpha$ -1,6, localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltons. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes (Bailey y Bailey, 1998). La consecuencia de los enlaces  $\alpha$ -1,6 es la formación de una molécula ramificada que al igual que la amilosa, tiene un sólo grupo funcional. Se caracteriza por ser insoluble. Gracias a la formación de puentes de hidrogeno su estructura es estable (Chen *et al.*, 2007).

**Ilustración 3.** Porción de cadena de amilopectina



Fuente: Chen *et al.*, 2007

## 2.2.2 Hidrólisis del almidón

El principal inconveniente para la producción de etanol a partir de almidón, radica en que la levadura no produce enzimas amilasas y no es capaz de fermentar el almidón, por consiguiente, es necesario realizar una sacarificación previa. La sacarificación se puede realizar por dos métodos: uno químico y uno de conversión enzimática (Chica, 1996).

La sacarificación es la operación que permite la transformación del almidón a azúcares fermentables, por lo general son: sacarosa, glucosa, maltosa y lebulosa. Se puede realizar por medios químicos y enzimáticos, o acción microbiana (Reyna *et al.*, 2004).

### 2.2.2.1 Método químico

El almidón es tratado con un ácido que permite el rompimiento de las cadenas cortas de dextrina. La concentración del ácido, el pH, la temperatura y el tiempo de hidrólisis son los parámetros de los cuales depende el grado de degradación. Por consiguiente, las reducciones del peso molecular y de la viscosidad son inversamente proporcionales al poder de reducción que aumenta por acción del ácido. Siendo el ácido nítrico y el ácido clorhídrico, los más utilizados en este tipo de hidrólisis, la clase de ácido es un factor determinante en el tiempo de sacarificación, al igual que la concentración, la temperatura, la presión y la relación másica con respecto al almidón. Generalmente, mientras se lleva a cabo la hidrólisis debe mantenerse un pH de 1.5, para lo cual deben agregarse las cantidades adecuadas de ácido que permitan mantenerlo en este valor (Herrera, 2013).

### 2.2.2.2 Método enzimático

La hidrólisis enzimática ha desplazado a la hidrólisis ácida en los últimos 30 años, debido a que se dispone de nuevas enzimas. Hoy en día la mayor parte de la hidrólisis de almidón se realiza usando enzimas, ya que esta técnica presenta ventajas como: control de la formación de productos no deseables y mayor flexibilidad del producto (Chica, 1996).

Este proceso consiste en la utilización de enzimas como catalizadores para romper las moléculas de almidón, obteniéndose productos semejantes a los de la hidrólisis ácida. El tipo de enzima más utilizada en este proceso son las amilasas, siendo las más conocidas la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa, Al utilizar amilasas, es preciso mantener un proceso de cocción que favorezca la dispersión y la aceleración del rompimiento de las cadenas de almidón. Las amilasas actúan sobre el almidón dependiendo del origen de este, puesto que la composición del mismo cambia según su origen (Agronet, 2006).

Existen dos fases dentro del proceso de Hidrólisis enzimática. Primero, la licuefacción y segundo, la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo en presencia de alfa-amilasa o beta-amilasa, mientras que la sacarificación, que es la conversión de almidón a glucosa, en presencia de glucoamilasa o pullulanasa (Agronet, 2006).

Mediante las diastasas de la malta o por las diastasas de los hongos se lleva a cabo la conversión del almidón a azúcares susceptibles de fermentación. Esta transformación se da a través de productos intermedios no fermentables. La cantidad de maltosa producida depende de la concentración en el mosto, la duración de la acción de las diastasas y de la temperatura (Agronet, 2006).

### 2.2.2.2.1 Alfa amilasa

La alfa-amilasa (Alfa 1,4-D- Glucan Glucano-hidrolasa) hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa en unión alfa-1,4. El ataque se hace en forma no selectiva (tipo endoenzima) sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5-7 unidades de glucosa, o un número múltiplo. La amiloglucosidasa (Alfa-1,4- D-Glucan glucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y alfa-1,6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (Ruiz, 2001).

Esta enzima tiene un peso molecular de 50.000 Daltons, es estable a pH de 5.5-8.0 con una actividad óptima de 5.9. Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas dependientes de calcio, aunque el catión no esté integrado en el centro activo de la enzima, se encuentra fuertemente unido a la enzima y sólo pueden ser removidos a pH bajos por el uso de agentes quelantes. La completa remoción del calcio conlleva a una pérdida total de actividad (Pedroza, 1999). Se cree que el  $\text{Ca}^{+2}$  estabiliza la conformación global de la enzima, encontrándose hasta 10 iones por molécula de enzimas. La importancia radica en que mantiene la molécula de la enzima en la configuración óptima para generar una máxima actividad y estabilidad. A menudo se nombra la  $\alpha$  amilasa como enzima licuante, debida a su rápida acción para disminuir la viscosidad de las soluciones de almidón (Espitia, 2009).

La actividad de la enzima se determina cualitativamente mediante la disminución de la capacidad de la solución de almidón para formar el color azul característicos con el yodo o midiendo la disminución de la viscosidad de la suspensión de almidón.

Las principales aplicaciones de las enzimas extracelulares que degradan el almidón consisten en la conversión del almidón de jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos, en la producción de azúcares fermentables en cervecería y en la obtención de bebidas alcohólicas y en la modificación de la harina de panadería. Entre las enzimas comercialmente utilizadas se destacan la alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae* (Owen, 1989). Entre los microorganismos que producen  $\alpha$  amilasa, se encuentran tanto bacterias como hongos tales como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas*, *Proteus*, y *Serratia*; algunos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, y *Mucor* (Crueger y Crueger, 1993).

### 2.2.2.2.2 Glucoamilasa

Las glucoamilasas o  $\alpha$ -1,4-glucan-glucohidrolasas son enzimas carbohidrolasas no específicas, de acción externa, rompen enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, generando glucosa a partir de los enlaces terminales no reductores de la cadena de almidón, por tanto son enzimas sacarificantes. Sin embargo, la glucoamilasa es incapaz de hidrolizar el almidón por completo a glucosa, ya que la ruptura requiere la participación de una enzima de acción interna. La glucoamilasa puede ser separada en dos fracciones glucoamilasa I y glucoamilasa II. La glucoamilasa I posee alta actividad desramificante la cual se acelera en presencia de  $\alpha$ -amilasas, por otro lado la glucoamilasa II posee una baja actividad desramificante (Chica, 1996).

Las glucoamilasas frecuentemente denominadas amiloglucosidasas, son producidas por hongos como *Aspergillus niger*, además siempre contienen cierta actividad transglucosidasa, la cual cataliza la reacción reversa, que conduce a la polimerización de la glucosa a maltosa (Byong, 2000).

## 2.2.3 Alfa amilasa de *Aspergillus oryzae*

### 2.2.3.1 Características

La  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* es una proteína monomérica que consiste de una sola cadena polipeptídica de 478 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro intracatenarios y un peso molecular de 51.000-53.000 daltons. El contenido de residuos aminoácidos alcalinos es bajo y por lo tanto determina la naturaleza ácida de esta proteína. Debido a su carácter de metalo-enzima, la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* mantiene unidos 10 átomos de calcio por molécula; sin embargo, solo un átomo de calcio se encuentra fuertemente unido y es esencial para la actividad catalítica. La molécula está compuesta por un dominio mayor que contiene el sitio activo y un dominio C-terminal de menor tamaño, ambos dominios se encuentran unidos por una sola cadena polipeptídica (Terebiznik, 1989).

En el genoma de *Aspergillus oryzae* se han encontrado tres copias idénticas del gen que codifica para  $\alpha$ -amilasa. Dado que *Aspergillus oryzae* no produce isoenzimas de  $\alpha$ -amilasa, la existencia de genes múltiples es asociada con la posibilidad de incrementar la cantidad de enzima sintetizada (Terebiznik, 1989).

La  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* hidroliza completamente la amilosa a maltosa y glucosa. Los sustratos que presentan enlaces  $\alpha$ -1,6 son hidrolizados menos exhaustivamente rindiendo maltosa, glucosa y dextrinas límite que contienen al punto de ramificación y aproximadamente cuatro residuos de glucosa  $\alpha$ -1,4. El accionar de la enzima sobre maltooligosacáridos es a través de ataques repetitivos cuya efectividad es función del tamaño del sustrato. Esta enzima actúa sobre ciclodextrinas linealizándolas con un corte y luego degradándolas a oligosacáridos más pequeños. En presencia de concentraciones de sustrato elevado ha sido comprobado que la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* cataliza reacciones de transglicosilación (Terebiznik, 1989).

### 2.2.3.2 Antecedentes de la amilasa

Las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa han sido utilizadas en otros procesos y en otras matrices alimentarias, a continuación, se mencionan algunos ejemplos del empleo de estas. Se emplea  $\alpha$ -amilasa en la elaboración de una bebida vegetal a base de harina de arroz hidrolizada (Beltrán, 2010), se determinó la concentración de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa para la producción de etanol a partir de almidón de cebada (Espitia, 2009), ha sido utilizada en procesos de hidrólisis de almidón de yuca (Peña *et al.*, 2009), en almidón de banano para la obtención de jarabe de glucosa (Rodríguez, 2001), en la fermentación ácido láctica de Camote (Proaño, 2013), en la elaboración de pan con sustitución parcial de harina de papa (Pulloquina, 2011), para la elaboración de edulcorantes a partir de almidones (Nolivos, 2011), en pan tipo muffin elaborado con diferentes tipos de harina de trigo (Ronquillo, 2012), en harina integral de Arracacha para la elaboración de una bebida natural energética y vitamínica (Egúsquiza, 2015)

## 2.3 PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL

### 2.3.1 SUSTRATO: MOSTO

Es la solución en agua potable de carbohidratos, proteínas, sales minerales y demás compuestos resultantes de la degradación enzimática del arroz, con o sin adjuntos, como sorgo, trigo, etc., realizada mediante procesos tecnológicos adecuados.

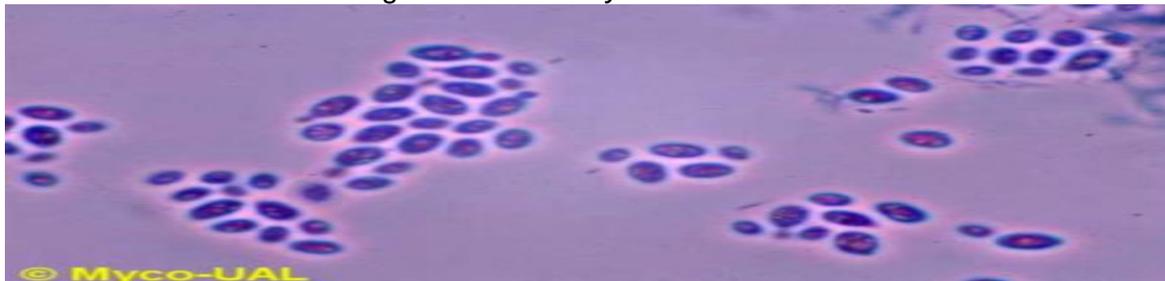
### 2.3.2 Microorganismo (*Saccharomyces cerevisiae*)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse (Folch y Covarrubias, 2004). Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticosa (Folch y Covarrubias, 2004).

#### 2.3.2.1 Morfología

*S. cerevisiae* tiene forma esférica, elipsoide u ovoide. Su tamaño varía con la edad de la célula, pero generalmente oscila entre 4 y 14 micras. Puede vivir aislada o formando colonias (Aguilar y Franyios, 2003).

#### Ilustración 4. Coloración de gram *Saccharomyces cerevisiae*



Fuente: Aguilar y Franyios, 2003

La célula está constituida aproximadamente por:

- P-glucanos (polisacárido) 40%
- Mananos (polisacárido) 40%
- Proteínas 8%

- Lípidos (grasas) 7%
- Sustancias inorgánicas 3%
- Hexosamina y quitina 2%

### 2.3.2.2 Reproducción

Su reproducción puede ser asexual por gemación. Cuando las condiciones son adversas la mayor parte de las levaduras pueden reproducirse sexualmente generando ascosporas (Mesas y Alegre, 1999). Durante la gemación, la célula hija inicia crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células (White, 1995).

### 2.3.2.3 Requerimientos nutricionales

#### 2.3.2.3.1 Fuente de carbono

Los compuestos carbonados son utilizados a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono por *Saccharomyces cerevisiae* ya que necesita D-azúcares como hexosas, glucosa, fructosa, manosa, etc., porque los L-azúcares pueden ser considerados no fermentables por esta levadura (Buitrago, 2007).

#### 2.3.2.3.2 Fuente de nitrógeno

Este elemento es un constituyente importante en los medios de cultivo para promover el crecimiento; ya que representa alrededor del 10% de peso seco de las levaduras, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar el nitrógeno en forma de ión amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el cloruro de amonio, el nitrato de amonio, fosfato de amonio y sobretodo el sulfato de amonio que provee además una fuente de azufre asimilable ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Otra fuente de nitrógeno son los aminoácidos, los dipéptidos, tripéptidos, y la urea en asociación con biotina y las bases púricas y pirimídicas (Buitrago, 2007).

#### 2.3.2.3.3 Macro y micronutrientes

Entre otros macronutrientes necesarios para la célula se encuentra el Fósforo (P), azufre (S), potasio (K), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), sodio (Na) y el Hierro (Fe). Por su parte los micronutrientes o elementos traza (Co, Mn, Zn), aunque se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes como los macronutrientes para el funcionamiento celular (Galvis, 2009).

#### 2.3.2.3.4 Vitaminas

En cuanto a las vitaminas, suelen emplearse mezclas que incluyen biotina, tiamina, inositol y ácido pantoténico, esenciales para el desarrollo metabólico de la célula. Se ha encontrado que cuando se tienen bajos niveles de tiamina, y elevadas concentraciones de nitrógeno se genera un detenimiento de la fermentación. Del mismo modo la ausencia de procesos de la vía metabólica de la tiamina se asocian al incremento de sulfuro de hidrogeno dentro de la fermentación (Acosta, 2012).

### 2.3.2.4 Requerimientos ambientales

El crecimiento y actividades de los microorganismos se ven muy afectadas por las condiciones físicas y químicas del medio en el que se desarrollan. Entre los factores de mayor relevancia se encuentran la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y de oxígeno, entre otros.

#### 2.3.2.4.1 Temperatura

Las altas temperaturas ocasionan una disminución de la biomasa, producto de un descenso en el contenido de proteínas, RNA; DNA y aminoácidos libres e induce a la rigidez de la membrana celular. Temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo (Tomasso, 2004).

#### 2.3.2.4.2 Oxígeno

Los requerimientos de oxígeno para la reproducción y para la fermentación son diferentes, mientras para la reproducción se necesitan grandes cantidades de oxígeno para la producción de células hijas y para la síntesis de ácidos grasos que serán los responsables de la resistencia a grandes concentraciones de etanol; la fermentación se realiza en condiciones anaerobias pues la producción de etanol necesita de ausencia de oxígeno (Ward, 1991).

#### 2.3.2.4.3 pH

El pH óptimo en el cual se desarrollan mejor los microorganismos, está entre 4 y 5. Las levaduras tienen la ventaja de que soportan, medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato (Beltrán *et al.*, 2002).

### 2.3.2.5 Metabolismo

#### 2.3.2.5.1 Azúcares

Las levaduras son consideradas microorganismos anaerobios facultativos, ellos son capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, cuando el oxígeno es suficiente y el sustrato está lo suficientemente diluido, ellas consumen los azúcares para el crecimiento de las células y para su reproducción; en cambio cuando el oxígeno es reducido y los niveles de glucosa exceden 0.1% p/v, ocurre el proceso de fermentación. *S. cerevisiae* usa la vía glicolítica o Embden- Meyerof-Parnas para metabolizar las moléculas de azúcar y obtener la energía necesaria para su supervivencia. Cuando la levadura encuentra las condiciones necesarias para la producción de etanol, el piruvato es descarboxilado y convertido en Acetaldehído, el cual tras la adición de hidrógeno se transforma en etanol (Santander, 2006).

#### 2.3.2.5.2 Nitrógeno

Este elemento es un constituyente importante en los medios de cultivos para promover el crecimiento, ya que está representado en un 10% del peso de las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar este elemento en forma de ión amonio. Estos iones pueden ser aportados por el cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de

amonio y el sulfato de amonio. Otra fuente de amonio son los aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos y la urea (Restrepo, 2012).

### 2.3.2.5.3 Fosforo

Es esencial para el crecimiento, regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos y mantiene la integridad de la pared celular. El fósforo es asimilado por la célula en forma de ion fosfato. La fuente de fósforo en el medio de cultivo está constituida por el dihidrogenofosfato de potasio o por el dihidrogenofosfato de sodio (Restrepo, 2012).

### 2.3.3 Fermentación

Una fermentación es una reacción de oxidación-reducción interna equilibrada en la que algunos átomos se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel de sustrato. Una ruta bioquímica muy usada para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también denominada vía de Embden- Meyerhof. La fermentación anaeróbica constituye el tipo más sencillo y primitivo de mecanismo biológico que permite la obtención de energía de las moléculas nutritivas, mediante reacciones de oxidación y reducción. En este proceso, el etanol es una molécula relativamente reducida que se produce junto con el CO<sub>2</sub> que es una molécula relativamente oxidada (Kłosowski *et al.*, 2006).

Los microorganismos utilizan como sustrato los hidratos de carbono (principalmente azúcares como la glucosa) presentes en el medio para transformarlos en etanol, dióxido de carbono y energía en forma de ATP. La producción de etanol se lleva a cabo a través de la vía glucolítica, que en su forma más simple, se puede expresar de la siguiente forma:



Las levaduras también pueden crecer al mismo tiempo que producir otros metabolitos, como por ejemplo ácido láctico, glicerol y ácido succínico, aunque en cantidades relativamente pequeñas. Durante el metabolismo de las levaduras se producen principalmente aldehídos, ésteres y alcoholes secundarios o superiores, de gran importancia en las propiedades organolépticas de la cerveza. Estos compuestos derivan de los oxo-ácidos, los cuales son producidos o bien por el metabolismo de los carbohidratos (ácido pirúvico o ácido oxoglutarico) o por aminoácidos por transaminación con un oxo-acido ya existente (Suárez, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Sustituir el *Aspergillus oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa en la elaboración de Sake como alternativa en la producción de etanol.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar sake sustituyendo el *Aspergillus oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa durante la inoculación.
- Evaluar las características fisicoquímicas y sensoriales del sake obtenido con uno comercial.

## 4. MATERIALES Y METODOS

A continuación, se hace la descripción de la metodología seguida para darle cumplimiento a los objetivos planteados, esta está dividida en tres partes, primeramente se encuentra el proceso de elaboración del Sake donde se sustituye el *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa, seguidamente se encuentran las pruebas correspondientes al análisis fisicoquímico del Sake obtenido y de la muestra control a utilizar y finalmente el análisis sensorial donde se compara el Sake elaborado con una muestra control.

### 4.1 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL SAKE

En esta etapa se describen todas las actividades realizadas para la elaboración del Sake, desde la recepción de la materia prima hasta el embotellado y almacenamiento del producto terminado.

#### 4.1.1 Descripción de las materias primas

Se recepcióno el arroz, agua, enzima alfa amilasa, enzima glucoamilasa y levadura *S. cerevisiae*.

##### 4.1.1.1 Arroz

Se utilizó arroz comercial marca Arroz Gelves Cristal, el cual es un arroz que contiene del 75% a 85% de grano partidos y es pulido. El pulido es importante al momento de elaborar este licor debido a que las capas externas del arroz contienen grandes cantidades de grasas, minerales y proteínas que son perjudiciales para el sabor del Sake.

##### 4.1.1.2 Agua

El agua utilizada para la elaboración del Sake es agua potable del acueducto de la ciudad de Pamplona Norte de Santander la cual se le realizó un hervido con el fin de eliminar microorganismos presentes y sustancias que puedan alterar las características finales del licor.

##### 4.1.1.3 Enzimas

HT 1000A y GLUCOAMILASA TECNICA son enzimas comerciales de Proenzimas S.A y Food Chem Andina respectivamente, las cuales fueron utilizadas para el mejoramiento del proceso hidrolítico del almidón de arroz. HT 1000A es una alfa-amilasa bacterial termoestable la cual hidroliza rápidamente las uniones alfa D -1,4 de los enlaces glucosídicos del almidón para producir dextrinas solubles y reducir la viscosidad del almidón gelatinizado. Las condiciones recomendadas de licuefacción son temperatura de 50 - 90 °C con un optimo de 70°C y un pH entre 5.0 - 8.5 con un optimo de 6.5.

La Glucoamilasa hidroliza tanto las ramificaciones alfa D-1,6 como los enlaces poliméricos alfa-D-1,4 del almidón obteniéndose como producto final sólo glucosa. Exhibe excelente estabilidad a un pH 4.5 y a una temperatura de 60°C. Estas enzimas cumplen con los estándares de calidad de la FAO / OMS y el Codex para alimentos y productos químicos.

#### 4.1.1.4 Levadura

La levadura utilizada para la fermentación alcohólica fue la *Saccharomyces cerevisiae* de la casa comercial Levapan en una presentación de levadura fresca, siendo adicionado 5g de levadura por litro de mosto.

#### 4.1.2 Preparación del mosto

Para la elaboración del mosto se partió del arroz el cual previamente se lavo con agua potable para eliminar residuos o pequeñas suciedades, los granos ya limpios fueron cocidos en proporción arroz agua 1:2 y posteriormente licuados. Se prepararon tres mostos de 20 Litros cada uno con diferentes concentraciones de arroz 11%, 22% y 33% y el restante agua.

#### 4.1.3 Cinética enzimática sobre la hidrólisis del almidón

Inicialmente se determino cuanto almidón contenía cada uno de los mostos por el método de colorimetría según lo descrito por (Ortiz *et al.*, 2015).

La cantidad de enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa adicionada al mosto fue de acuerdo a lo indicado en la ficha técnica, el proceso de hidrólisis del almidón se realizo en dos etapas, en la primera o licuefacción se añadió la alfa amilasa termoestable durante 2 horas a 70°C y pH de 6.5, y para la sacarificación se añadió la Glucoamilasa a 60°C, pH de 4.5 durante 40 horas.

Durante la etapa de licuefacción se determino cada 30 minutos el porcentaje de almidón presente en cada mosto por el método de espectrofotometría según lo descrito por (Ortiz *et al.*, 2015). Durante la sacarificación se determino cada 12 horas el porcentaje de glucosa por el método Miller según lo descrito por (Ávila *et al.*, 2012) y grados Brix siguiendo el procedimiento descrito en la GTC 4.

#### 4.1.4 Ajuste del mosto

Al mosto elaborado se le proporcionaron las condiciones adecuadas realizando una acidificación con ácido láctico hasta alcanzar un pH de 4.2 – 4.7 según lo especificado en la Guía integral del Sake Japonés parte 2.

#### 4.1.5 Fermentación

Se adiciona 5g de levadura por cada litro de mosto. Para realizar la activación de la levadura, se peso la debida cantidad de esta y se mezcló con agua a 35°C y se llevó a incubación. Una vez activada la levadura se agregó al mosto y este se dejo fermentar en un rango de temperatura de 22°C -26°C por un tiempo de tres a cuatro semanas o hasta producir el contenido de alcohol deseado, 15%.

Durante la fermentación se realizo seguimiento del contenido de alcohol, grados Brix, pH, y acidez expresada en porcentaje de ácido láctico siguiendo la metodología descrita en la GTC 4. La toma de muestras se realizó cada tres días hasta obtener el contenido de alcohol deseado (15%) o hasta el punto en que no se presento variación en este.

#### 4.1.6 Sedimentación

En la primera filtración, quedo cierta turbidez, por lo tanto, el líquido se dejo reposar a baja temperatura para que la turbidez se precipitara como sedimento y la parte transparente obtenida se transfirió a otro tanque.

#### 4.1.7 Clarificación

Con el fin de eliminar la mayor cantidad de partículas suspendidas que causan enturbiamiento en el Sake se realizó una clarificación con bentonita donde se adicionaron 2 gr por cada litro de mosto.

#### 4.1.8 Ajuste de alcohol

El contenido de alcohol del Sake elaborado fue ajustado a 15% v/v realizando destilación de una fracción del licor con el fin de darle características similares al las del Sake comercial.

#### 4.1.9 Embotellado

El sake obtenido se empaco en botellas de vidrio color ámbar previamente lavadas y esterilizadas hasta su uso en las pruebas fisicoquímicas y sensoriales.

#### 4.1.10 Almacenamiento

El almacenamiento se realizó a temperatura ambiente(18-22°C) según lo especificado en la Guía integral del Sake Japonés parte 2.

### 4.2 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SAKE

Se determinaron las características fisicoquímicas por triplicado al Sake elaborado con la sustitución por la enzimas y a una muestra control de Sake adquirido comercialmente con el fin de hacer finalmente una comparación entre estos dos.

#### 4.2.1 Color por coordenadas CIEL\*a\*b\*

Se tomó el color con el colorímetro X-rite colocando 15 mL de licor en una caja Petri y haciendo la lectura directa de las coordenadas L\*, a\* y b\* Según (López *et al.*, 2010)

#### 4.2.2 pH

El pH se midió mediante el uso de un medidor de pH (Mettler TOLEDO) en un volumen de 100 ml de muestra siguiendo el procedimiento descrito en la NTC 5114.

#### 4.2.3 Acidez total

Se determinó mediante titulación utilizando una muestra de 10cm<sup>3</sup> de licor y empleando el sistema de electrodos vidrio-calomel, se titulo directamente con NaOH 0,1 N hasta pH 8,2 según lo descrito en la NTC 5114.

#### 4.2.4 Porcentaje de alcohol

Consistió en destilar 100 cm<sup>3</sup> de Sake, mezclado con 50 cm<sup>3</sup> de agua. Se recoge el destilado en una probeta de 100 cm<sup>3</sup>, se introduce el alcoholímetro y se lee directamente el porcentaje de alcohol a 20°C, según lo descrito en la guía técnica Colombiana GTC 4.

#### 4.2.5 Turbidez

Consiste en comparar con patrones de turbidez de formazina, una muestra de licor a temperatura determinada y expresar su turbidez en unidades FTU (unidades de turbidez de formazina). Se adiciono la muestra de licor a 20°C en una cubeta del turbidímetro y se determino la turbidez, también se midió un patrón de 100 FTU como referencia, esto según lo descrito en la guía técnica Colombiana GTC 4.

$$\text{Turbidez en FTU} = \frac{R \cdot S}{100}$$

Donde:

R = Lectura del nefelómetro (escala 0 a 100)

S = Unidades de turbidez del patrón para graduar el 100 de aparato

#### 4.2.6 Gravedad específica

Empleando un picnómetro, se comparo el peso de un volumen determinado de licor, con el peso del mismo volumen de agua a la temperatura de 20/20°C, según la guía técnica Colombiana GTC 4.

$$\text{Gravedad específica a } 20/20^{\circ}\text{C} = \frac{pe - po}{pa - po}$$

Donde:

Po = peso del picnómetro vacío.

Pe = peso del picnómetro con la muestra de licor

Pa = peso del picnómetro con agua.

#### 4.2.7 Grados brix

La determinación de grados °Brix se midió con un refractómetro digital REICHERT AR 200, calibrado a  $20 \pm 2$  °C, registrándose la lectura en escala de °Brix (Ríos *et al.*, 2016).

#### 4.2.8 Azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizo por el método de Miller utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 200-1000 mg/L, utilizando glucosa como estándar. A estas soluciones se les aplico el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro a una longitud de onda 540 nm. Una vez construida la curva patrón se aplico el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezcló 0,5 mL de cada una con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo.

Se reconstruyeron las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determino su absorbancia a 540 nm. El mismo tratamiento se realizo para el blanco con agua destilada. Leyendo la absorbancia de cada una de las muestras en la curva patrón se determino la concentración de azúcares reductores según lo descrito por (Avila *et al.*, 2012).

### 4.3 ANÁLISIS SENSORIAL

Para esta evaluación se contó con la participación de un panel de catadores entrenados, para ello, inicialmente fueron convocados los candidatos a jueces y se les aplicó una encuesta (Ver anexo 9.1) con el fin de obtener información preliminar sobre sus hábitos de consumo de bebidas alcohólicas, interés y motivación, conocimiento en la terminología de análisis sensorial y disponibilidad de tiempo para realizar el entrenamiento, de lo anterior se seleccionaron 26 candidatos los cuales realizaron el entrenamiento en cada uno de los atributos evaluados: fase visual, olfativa y gustativa.

La selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores se realizó siguiendo lo establecido por la norma técnica Colombiana NTC 4129, en donde se seleccionaron los candidatos que presentaron un grado de acierto mayor o igual al 70% en sus resultados. Finalmente, se estableció un grupo de 12 catadores entrenados, conformados por estudiantes del programa ingeniería de alimentos de la Universidad de Pamplona para realizar la evaluación del perfil sensorial tanto en el sake elaborado sustituyendo el *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa como a una muestra control de Sake adquirida comercialmente donde se tuvieron en cuenta la fase visual, olfativa y gustativa de las muestras.

A continuación, se describe el entrenamiento a emplear para evaluar sensorialmente la sustitución del *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa.

#### 4.3.1 Planteamiento para el entrenamiento de jueces

Para obtener un panel de jueces capaz de determinar diferencias en los atributos a evaluar en el Sake se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

##### 4.3.1.1 Requerimientos generales

- Área de debate para llevar a cabo el entrenamiento y ejecución del análisis sensorial del Sake.
- Área de preparación de muestras, con el fin de evitar el error de expectación en los jueces.
- Utensilios como: Refrigerador, copas para vino estilo Bordeaux, carro para transportar las muestras.

##### 4.3.1.2 Selección y adiestramiento.

Se llevo a cabo por medio de los siguientes pasos:

- Preselección del panel por medio del formato de selección (Anexo 9.1)
- Presentación de la terminología y de los métodos a emplear.
- Introducción al método de evaluación (ejecución del entrenamiento mediante la aplicación de pruebas descriptivas con escala estructurada de acuerdo a cada propiedad evaluada).
- Selección del panel a evaluar la sustitución del *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa (solo se tuvieron en cuenta aquellos jueces que obtuvieron un porcentaje de acierto en las pruebas de adiestramiento igual o superior al 70% por cada uno de los atributos evaluados).

### **4.3.2 Terminología y métodos a emplear**

Todas las pruebas a realizar se llevaron a cabo por medio de una prueba descriptiva de escala estructurada de cinco puntos con el fin de que los jueces se entrenaran en diferenciar las intensidades de cada uno de los atributos a evaluar y de esta manera poder seleccionarlos según la destreza presentada en las valoraciones.

#### **4.3.2.1 Fase visual**

##### **4.3.2.1.1 Color/tono**

El color es la sensación inducida por la estimulación de la retina por rayos luminosos de diferentes longitudes de onda, en el caso del Sake la variación de colores va desde incoloro hasta dorado y ámbar oscuro, es por ello que para el análisis se les presento a los jueces tres muestras de vino con coloraciones diferentes codificadas aleatoriamente y se les pidió que evaluaran según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 incoloro y 5 coloraciones amarillas (Anexo 9.2).

##### **4.3.2.1.2 Transparencia**

La transparencia, se puede definir como la propiedad que presentan algunos cuerpos de poder dejar ver las imágenes a su través. La mayoría de las variedades de sake son transparentes. Con excepción del denominado sake no filtrado, que se caracteriza por su apariencia turbia, la turbidez en un sake embotellado es un indicio de que no ha sido filtrado debidamente.

Se presento a los jueces 3 muestras de vino codificadas aleatoriamente las cuales presentan diferentes grados de transparencia, se les pidió a los jueces que evaluaran según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 transparente y 5 apagado (Anexo 9.2).

#### **4.3.2.2 Fase olfativa**

##### **4.3.2.2.1 Aroma a frutas**

El Sake es rico en aromas que evocan las frutas de arboles frutales, tales como la manzana y la pera, o frutas tropicales, tales como el plátano y el melón. El aroma proviene de los ésteres producidos por la levadura durante el proceso de fermentación y es análogo al aroma secundario del vino.

Se presento a los jueces tres muestras de esencia de manzana con diferente intensidad en el aroma codificadas aleatoriamente y se les pidió a los jueces que evaluaran su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 indetectable y 5 fuerte (Anexo 9.2).

##### **4.3.2.2.2 Aroma a caramelo**

Como el sake contiene grandes cantidades de aminoácidos y azúcares, el mismo adquiere el color y aroma a dulce quemado debido a la reacción de Maillard durante su elaboración. Esto varía desde un aroma a miel a un aroma que se asemeja al de la salsa de soya, azúcar morena o fruta seca.

Se presento a los jueces tres muestras de esencia de caramelo con diferente intensidad en el aroma codificadas aleatoriamente y se les pidió a los jueces que evaluaran su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 indetectable y 5 fuerte (Anexo 9.2).

#### 4.3.2.3 Fase gustativa

##### 4.3.2.3.1 Dulzor

El equilibrio de los azúcares y ácidos determina si el sabor del sake es dulce o seco. Si se aumenta su acidez, esto reducirá el sabor dulce del sake aun cuando la cantidad de azúcar siga siendo la misma

Se le presento a los jueces tres muestras de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones codificadas aleatoriamente y se les pidió que evaluaran este atributo según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 seco y 5 dulce (Anexo 9.2).

##### 4.3.2.3.2 Cuerpo

El cuerpo es definido como el volumen que presenta el licor y se debe a su graduación alcohólica. Es el grado de intensidad de las sensaciones en boca, hace referencia a la "consistencia", a la "densidad" del licor.

El nivel de azúcares y acidez afecta el cuerpo del sake. El sake con alto contenido de azúcares y ácidos se considera como rico o denso. Los aminoácidos y péptidos también contribuyen a ello, y su alto nivel resulta en un sake robusto.

Se le presento a los jueces tres muestras de vino con cuerpo diferentes, las muestras fueron codificadas aleatoriamente y se les pidió que evaluaran este atributo según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 aguado y 5 denso (Anexo 9.2).

##### 4.3.2.3.3 Acabado/Regusto

En un sake de alta calidad, independientemente de si es dulce o seco, denso o ligero, se espera que su sabor desaparezca rápidamente después que deja la boca. Esto se denomina *kire*. A diferencia del vino, un acabado o regusto largo no se considera como una característica deseable del sake.

Se le presento a los jueces tres muestras de vino con acabado persistente, regular y fino, las muestras fueron codificadas aleatoriamente y se les pidió que evalúen este atributo según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 persistente y 5 fino (Anexo 9.2).

##### 4.3.2.3.4 Acidez

La acidez en el sake esta marcada por la producción de acido láctico antes del proceso de fermentación, esta es de gran utilidad para acabar con la microflora salvaje que crece durante la elaboración del mosto y para la generación de metabolitos secundarios que contribuyen al sabor del saké.

Se le presento a los jueces tres muestras de soluciones de acido láctico a diferentes concentraciones, las muestras fueron codificadas aleatoriamente y se les pidió que

evalúen este atributo según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 indetectable y 5 fuerte (Anexo 9.2).

#### **4.3.2.3.5 Amargor**

El amargor no es uno de los rasgos deseable en muchas variedades de sake, pero es una de las características que imparte su complejidad al sake cuando ha sido añejado.

Se le presento a los jueces tres muestras de vino con diferentes grados de amargor, las muestras fueron codificadas aleatoriamente y se les pidió que evalúen este atributo según su grado de percepción en la escala estructurada de cinco puntos, siendo 1 indetectable y 5 fuerte (Anexo 9.2).

### **4.3.3 Ejecución del análisis sensorial al Sake**

Una vez finalizado el entrenamiento de jueces se procedió a realizar el análisis sensorial al Sake elaborado sustituyendo el *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa como a la muestra control obtenida comercialmente (Anexo 9.2).

### **4.3.4 Análisis de datos**

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente con el fin de determinar si la sustitución del *Aspergillus Oryzae* por las enzimas alfa y glucoamilasa influye significativamente sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del Sake. Para ello se realizó un análisis de comparación ANOVA multifactorial con nivel de significancia del 95% y se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 21.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del proceso de elaboración del Sake, análisis de las características fisicoquímicas y análisis sensorial del licor obtenido.

### 5.1 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL SAKE

Para la elaboración de los mostos se partió del arroz como materia principal, el arroz utilizado fue arroz cristal comúnmente conocido como arrocillo. La cantidad de arroz empleado para las concentraciones de 11%, 22% y 33% fue de 2200g, 4400g y 6600g respectivamente para soluciones de 20 L de mosto.

#### 5.1.1 Características fisicoquímicas del arroz

La tabla 3 muestra la composición química del arrocillo (Arroz Cristal) utilizado como materia prima principal en el presente trabajo de investigación. El contenido de humedad obtenido fue del 10,6% y el contenido de almidón 83,67% los cuales están dentro de los rangos reportados por (León.,1997) que son de 10 a 13% de humedad y de 74,01 a 85,70% para el contenido de almidón; mientras que el contenido de cenizas obtenido 0,92% es superior a lo reportado que es de 0,58 a 0,67%.

**Tabla 3.** Características fisicoquímicas del arrocillo

Parámetro	Resultado
Almidón (%)	83,67 ± 2,47
Humedad (%)	10,6 ± 0,3
Cenizas (%)	0,92 ± 0,1

**Fuente:** Autor

De las características analizadas anteriormente, la mas importante es el contenido de almidón debido a que la concentración de sustrato es un factor critico en la liberación de azúcares reductores. A mayor concentración de sustrato la disponibilidad de azúcares reductores para la levadura se incrementa. De lo anterior, se considera al arrocillo como sustrato manejable para la levadura y su fermentación y por lo tanto para la producción de etanol.

#### 5.1.2 Hidrólisis enzimática del almidón de arrocillo.

Previamente a la preparación de los mostos se realizaron ensayos con el fin de determinar el tiempo optimo de acción de las enzimas. Para determinar la concentración de almidón presente en cada una de las soluciones de arroz y su licuefacción se realizó la curva patrón del almidón (figura 1), mientras que para la sacarificación con la glucoamilasa se realizo curva patrón de azucars reductores presentada en la figura 3.

##### 5.1.2.1 licuefacción del almidón

En figura 1 se muestra la curva patrón de almidón elaborada a partir de concentraciones de sustrato de 0 a 500 ppm, obteniéndose una ecuación lineal (Ec 1) para determinar posteriormente el porcentaje de almidón hidrolizado, en donde se puede observar una representación de los datos experimentales de un 99,88%.

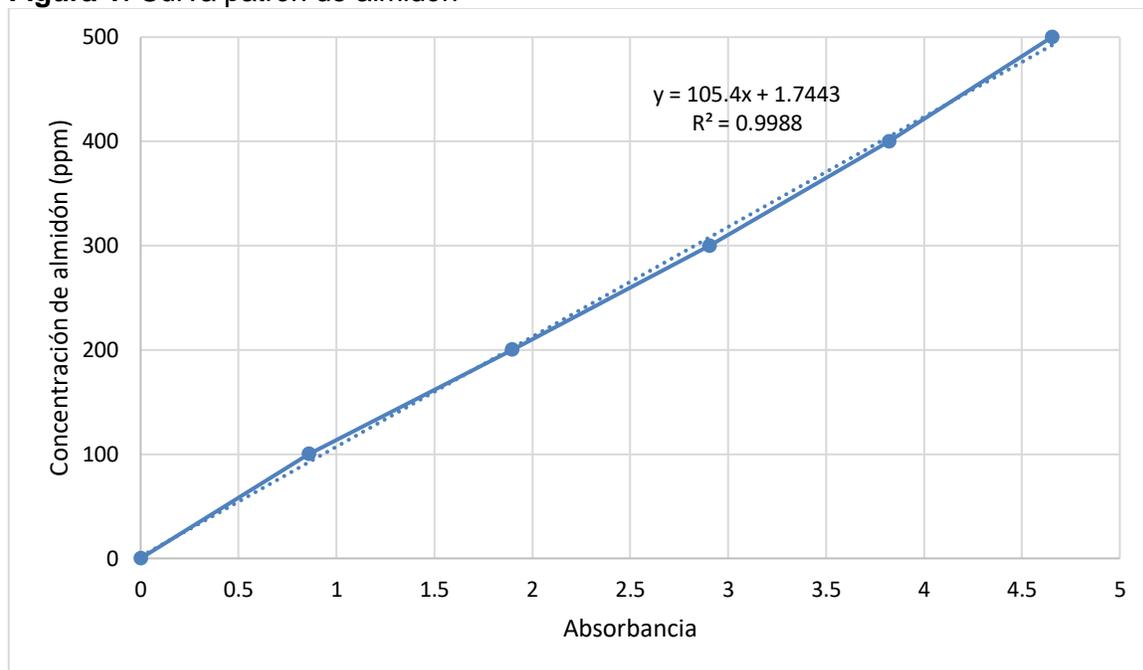
$$Y = 105,4 X + 1,7443 \text{ (Ec 1)}$$

Donde

X = Absorbancia

Y = Concentración de almidón en ppm

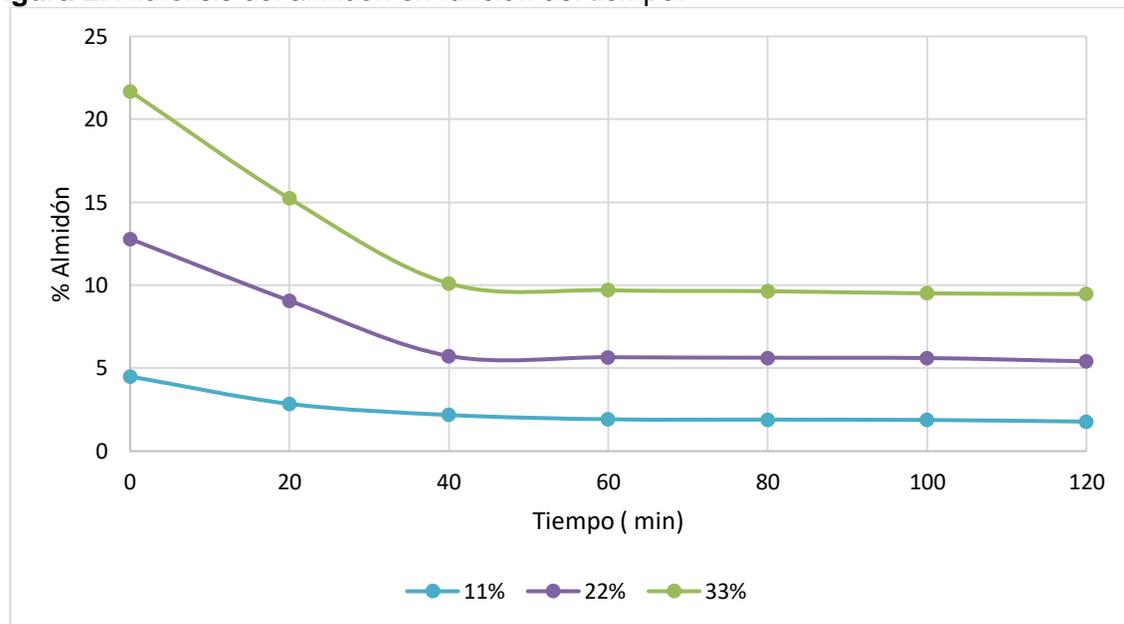
**Figura 1.** Curva patrón de almidón



**Fuente:** Autor

Para la etapa de licuefacción se utilizó la alfa amilasa comercial HT 1000A en concentración de 0,3% con base al porcentaje de almidón presente en cada una de las soluciones de 11%, 22% y 33% de arroz. Inicialmente las muestras presentaron un pH de  $6,5 \pm 0,2$  por lo tanto no fue necesario hacer ajuste con ácido láctico ya que estaban dentro del rango óptimo de acción estipulado en la ficha técnica (anexo 9.3) para la enzima (6,0 – 8,0).

En la figura 2 se presenta el comportamiento de la enzima durante la licuefacción del almidón analizado cada 20 minutos en un rango de tiempo de 120 minutos. Se observa que el tiempo óptimo de acción de la enzima es de 40 minutos, a partir de allí la hidrólisis del almidón no presenta mayores variaciones y tiende a ser constante en el tiempo concordando con lo reportado por Rega en el 2015, quien afirma que la mayor influencia de la enzima ocurre en la primera hora de su acción y va disminuyendo su velocidad en la segunda hora. Al parecer porque se han convertido la mayoría de los enlaces  $\alpha$ -1,4.

**Figura 2.** Hidrólisis del almidón en función del tiempo.

Fuente: Autor

Inicialmente la muestra de 11% de arroz partió de 4,5% de almidón y finalizó en 1,78% es decir se hidrolizó 2,72% de almidón. Mientras que para la muestra de 22% de arroz el porcentaje de hidrólisis fue de 7,39% y para la del 33% de arroz fue de 12,23%. A mayor concentración de arroz mayor disponibilidad de almidón y por lo tanto se presenta un mayor porcentaje de hidrólisis.

En este sentido la enzima alfa amilasa con respecto a la concentración de almidón presenta un actividad de desdoblamiento de un  $41,82\% \pm 2,1$  para las tres concentraciones de almidón en los sustratos.

### 5.1.2.2 Sacarificación del almidón

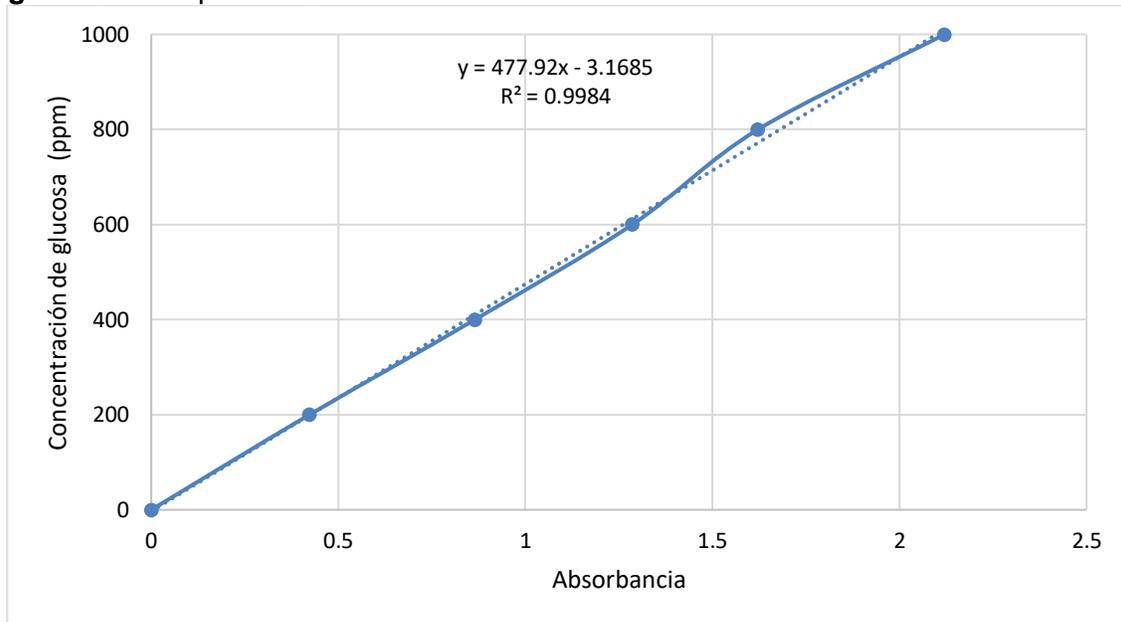
La curva patrón de azúcares reductores presentada en la figura 3 y elaborada a partir de concentraciones de glucosa de 0 a 1000 ppm se obtuvo la ecuación lineal (Ec 2) para determinar posteriormente el porcentaje de azúcares reductores en la etapa de sacarificación. Esta ecuación representa el 99,84% de los datos experimentales lo cual indica que puede predecir satisfactoriamente la concentración de azúcares reductores.

$$Y = 477,92 X - 3,1685 \text{ (Ec 2)}$$

Donde

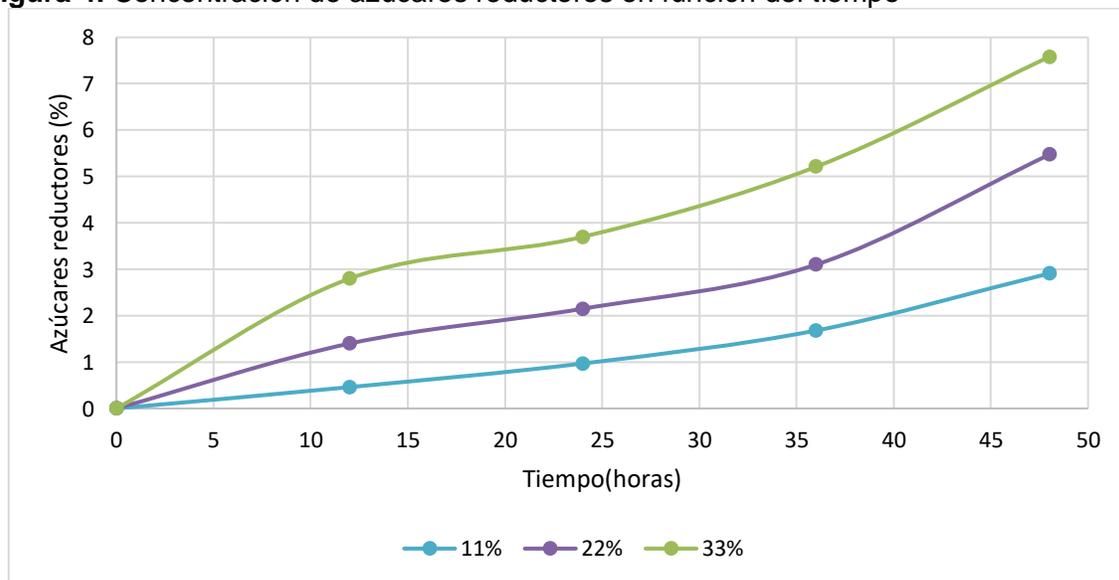
X = Absorbancia

Y = Concentración de glucosa en ppm

**Figura 3.** Curva patrón azúcares reductores

Fuente: Autor

En la sacarificación de los almidones se utilizó un 1 mg/g (enzima/almidón) y se requirió realizar el ajuste del pH con ácido láctico a 4,5 y temperatura de 60°C según la ficha técnica (anexo 9.4) para el óptimo funcionamiento de la enzima. La sacarificación del almidón presente en cada una de las muestras de 11%, 22% y 33% de arroz se presenta en la figura 4.

**Figura 4.** Concentración de azúcares reductores en función del tiempo

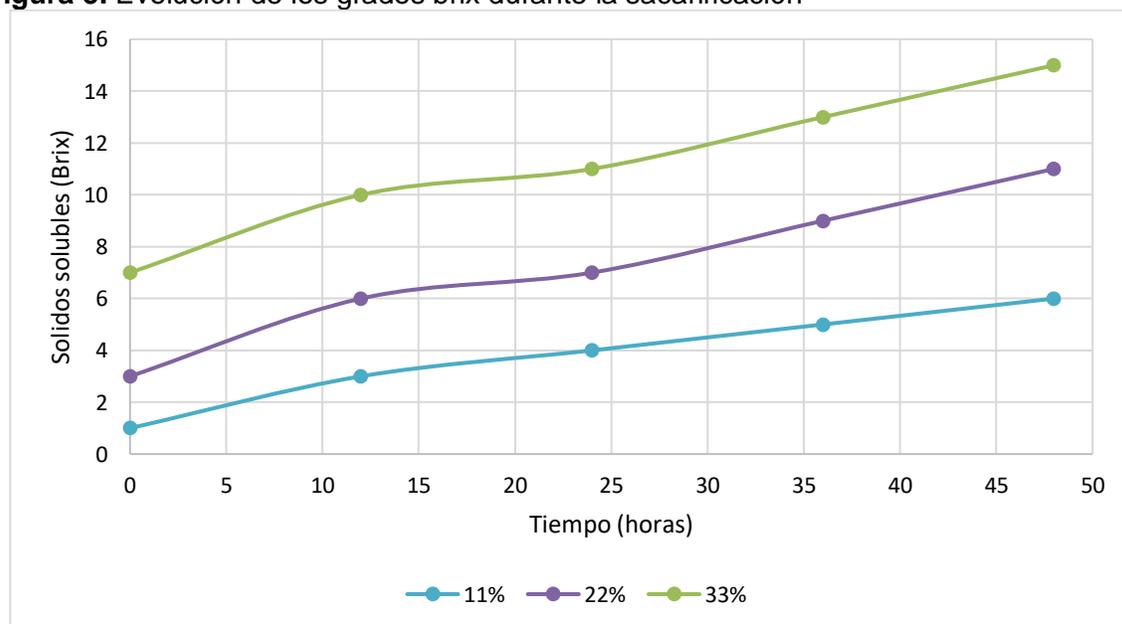
Fuente: Autor

En el proceso de sacarificación se observa que la hidrólisis se efectúa de manera proporcional a lo largo de las 48 horas de análisis. Como es de esperarse a mayor concentración de sustrato mayor concentración de azúcares reductores. En este tiempo para la muestra de 11% de arroz se obtiene 2,91% de azúcares reductores, mientras que, para la de 22% de arroz se obtiene 5,47% y para la del 33% de arroz un 7,58% de azúcares. En el proceso de sacarificación de arrozillo utilizando un 20% de sustrato y una relación enzima / sustrato de 1,87 mg/g (León., 1997) obtuvo un aumento de azúcares reductores de 8,2% lo cual es similar a lo obtenido en la muestra de 33% de arroz que fue de 7,58% de azúcares teniendo en cuenta que la relación enzima/sustrato utilizada fue inferior y que las marcas de enzimas empleadas son diferentes.

En términos generales en cuanto al proceso de licuefacción y sacarificación se puede indicar que la conversión de almidón a azúcares reductores fue de un 64,7% para el sustrato del 11% de arroz y del 42,7% y 34,9% para los sustratos de 22% y 33% de almidón respectivamente.

En cuanto a la evolución de los grados Brix como parámetro comúnmente representativo en la fermentación obtenido en la etapa de sacarificación (figura 5), se observa que la muestra de 11% de arroz incrementa 5 grados en el transcurso de las 48 horas, mientras que las muestras de 22% y 33% incrementan 8 grados Brix. Según estos resultados a mayor concentración de arroz hay más concentración de almidón y por lo tanto en esta etapa de sacarificación se ve evidenciado en el incremento de los azúcares reductores y por ende de los grados brix.

**Figura 5.** Evolución de los grados brix durante la sacarificación



Fuente: Autor

### 5.1.3 Preparación de los mostos

Para la elaboración de los mostos el arroz previamente hidratado fue llevado a ebullición con el fin de gelificar el almidón siendo la relación de arroz agua de 1:2. Este proceso es requerido para que la enzima alfa amilasa tuviese mayor disponibilidad del sustrato y reaccionara de manera efectiva. El arroz gelificado se licuo con agua potable y cada mosto fue ajustado a un volumen total de 20 litros. En la tabla 4 se presenta las cantidades utilizadas para la elaboración de cada uno de los mostos.

**Tabla 4.** Cantidades utilizadas en la elaboración de 20 Litros de mosto.

Concentración de arroz	Arroz (Kg)	Agua para la cocción (Litros)	Agua adicionada para ajustar el mosto (Litros)
11%	2,2	4,6	13,5
22%	4,4	9,4	7,6
33%	6,6	14,1	3,4

Fuente: Autor

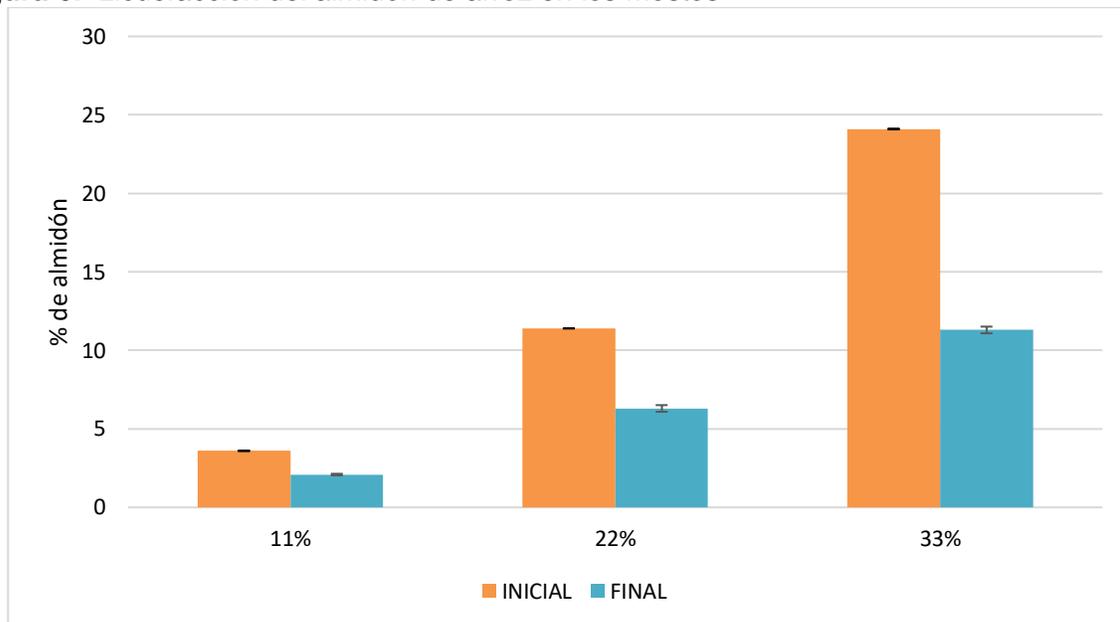
### 5.1.4 Hidrólisis enzimática de los mostos

Una vez realizado los ensayos pertinentes a la hidrólisis enzimática del arroz con el fin de obtener azúcares fermentables se continuo con la elaboración de los mostos para la obtención del Sake.

#### 5.1.4.1 Licuefacción del almidón en los mostos

La función de la alfa amilasa es actuar como licuante del almidón, es decir rompe los enlaces glucosídicos transformándolos en moléculas más pequeñas como son los oligosacáridos, a su vez de que debido a su rápida acción disminuye visiblemente la viscosidad de las soluciones de almidón (Espitia., 2009).

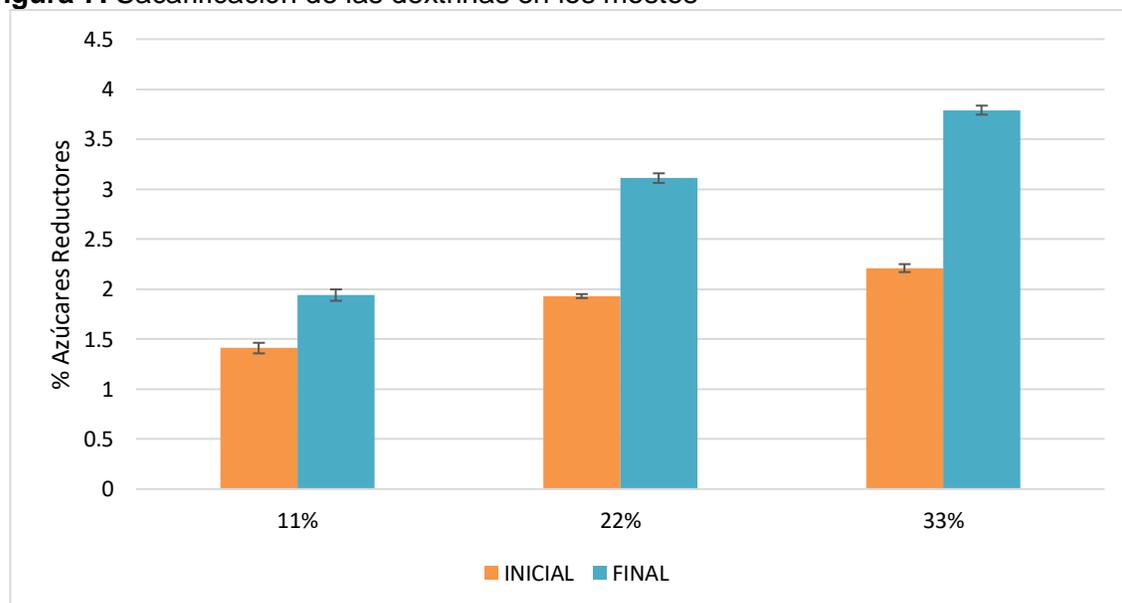
La licuefacción con los mostos estandarizados en pH y porcentaje de arroz fue realizada durante un tiempo de 60 minutos obteniéndose los resultados que se presentan en la figura 6, en donde se puede observar que a mayor concentración de arroz hay una mayor hidrólisis del mismo. En el mosto de 11% de arroz se hidrolizo un 1,51% de arroz, mientras que para el mosto de 22% se hidrolizo un 5,1% y para el mosto de 33% un 12,8% de almidón. Estos resultados son similares a los obtenidos en el apartado 5.1.2, indicando así que la alfa amilasa utilizada actúa similar cuando se hace un escalamiento. El porcentaje remanente de almidón no hidrolizado puede ser debido a los diferentes componentes del arroz como las proteínas y minerales que actúan como inhibidores enzimáticos no permitiendo la degradación total del almidón.

**Figura 6.** Licuefacción del almidón de arroz en los mostos

Fuente: Autor

#### 5.1.4.2 Sacarificación de las dextrinas en los mostos

Para la etapa de sacarificación se adiciona la glucoamilasa en concentración 1 mg / g de almidón presente en cada uno de los mostos a una temperatura de 60°C, pH de 4,5 por un tiempo de 48 horas obteniéndose los resultados que se presentan en la figura 7.

**Figura 7.** Sacarificación de las dextrinas en los mostos

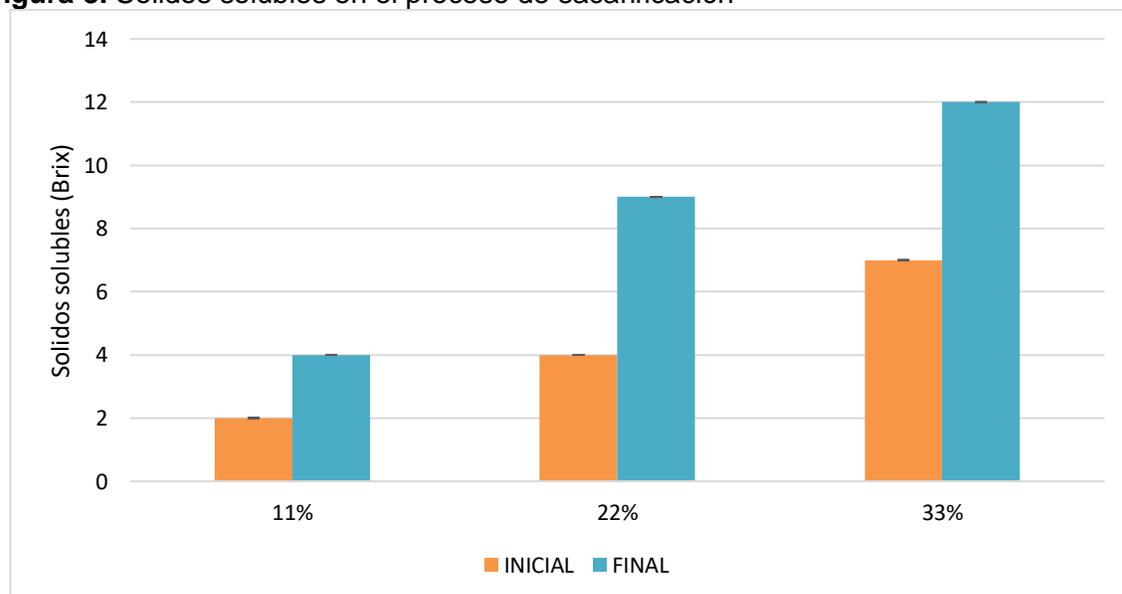
Fuente: Autor

En la figura 7 se observa que a medida que aumenta la concentración de arroz se incrementa el porcentaje de azúcares reductores. Para el mosto de 11% de arroz aumento un 0,53% los azúcares, mientras que para el de 22% de arroz aumento 1,18% y para el de 33% de arroz aumento 1,58%. Según Sarikaya *et al.*, (2000) la acción hidrolítica de las amilasas sobre el almidón de granos se lleva a cabo porque estas enzimas erosionan la superficie del grano o digieren canales en puntos seleccionados en la superficie hacia el centro del grano, permitiendo la difusión de la enzima hacia el sustrato, la adsorción de la enzima sobre el sustrato y el evento catalizador. En este sentido se puede indicar que la alfa amilasa utilizada también actúa en el proceso de sacarificación dejando poco porcentaje de dextrinas para que la glucoamilasa termine de realizar la sacarificación.

Teniendo en cuenta, que generalmente la acción de la  $\alpha$  y glucoamilasa sobre el almidón natural de los granos no es muy efectiva por que estos presentan una resistencia a la digestión amilolítica (Sarikaya *et al.*, 2000), se logro obtener un incremento en las concentraciones de azúcares reductores. El poco incremento en el porcentaje de azúcares reductores para el mosto de 11% de arroz es debida a que hay una menor cantidad de sustrato, por lo tanto, la tasa de reacción disminuye porque hay menos lugares de reacción disponibles para hidrolizar el almidón (Espitia., 2009) generándose un limitante por escasas de sustrato.

En cuanto a los solidos solubles representado en los grados brix (figura 8) se puede visualizar que el porcentaje de arroz es proporcional a los grados brix obtenidos al final del proceso de sacarificación, por cuanto el mosto de 33% de arroz será potencialmente más fermentable que los otros mostos ya que las levaduras tendrán mayor disponibilidad de azúcares para la fermentación alcohólica.

**Figura 8.** Solidos solubles en el proceso de sacarificación



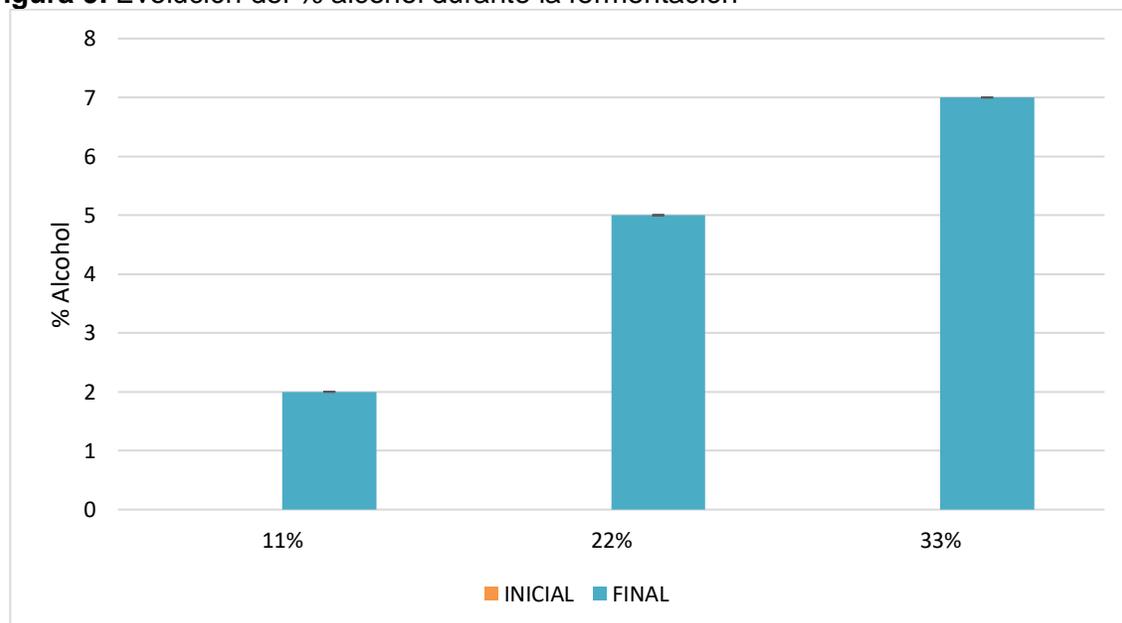
Fuente: Autor

El incremento de los grados brix durante la sacarificación es debido a la conversión del almidón a azúcares reductores que no son mas que monosacáridos como glucosa, fructosa, galactosa, etc. y disacáridos como lactosa y maltosa (Oates., 1997). El incremento de los grados brix es de manera proporcional con el incremento de los azúcares reductores, evidenciándose que a medida que aumenta la concentración de arroz en el mosto se obtiene mayor cantidad de grados brix tanto iniciales como finales. Es importante indicar que si bien hay un incremento de los azúcares reductores no necesariamente debe compaginar con los solidos solubles ya que en los mostos a parte de los azúcares reductores existen otros tipos de azúcares que se evidencia en la medición de los solidos solubles.

### 5.1.5 Fermentación de los mostos

En el proceso de fermentación se adiciono 5g de levadura fresca previamente activada por cada litro de mosto. El seguimiento se realizo cada tres días obteniéndose que la máxima producción de alcohol se dio en tres días, ya para el día sexto no había variaciones en la producción de alcohol, poniéndose en manifiesto que la levadura actúa de forma rápida en la conversión de los azúcares a alcohol. En este sentido en el presente trabajo no es representativo realizar una evolución del proceso de fermentación ya que como se dijo anteriormente para el día 6 de análisis el alcohol no se había incrementado, por ello, en la figura 9 se muestran los resultados finales de la evolución del alcohol al día 3 durante la fermentación.

**Figura 9.** Evolución del % alcohol durante la fermentación

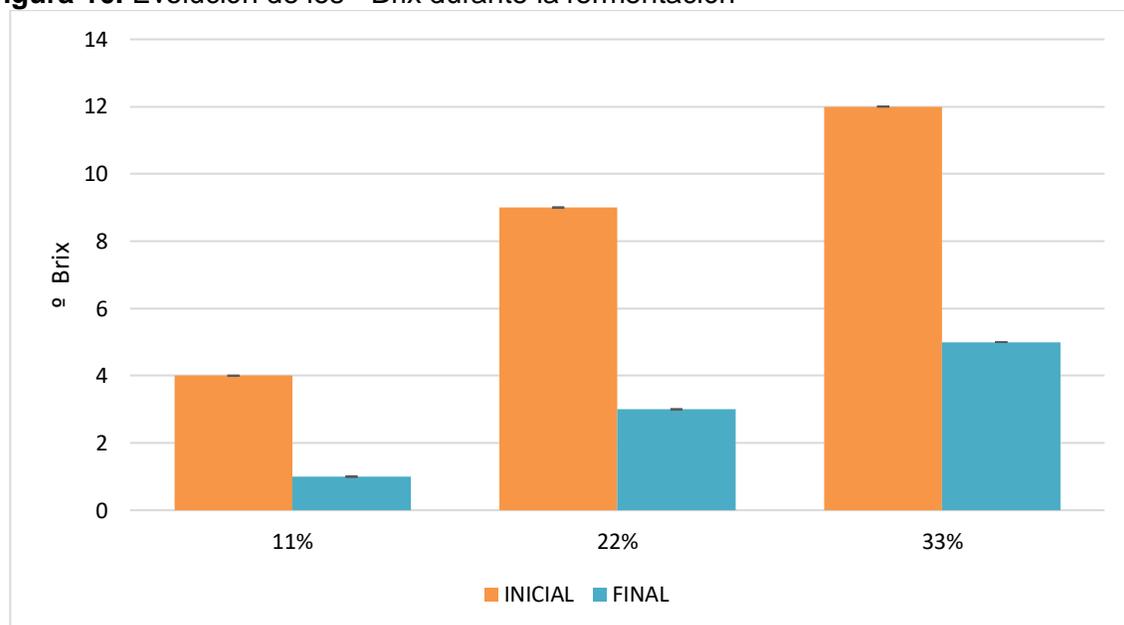


**Fuente:** Autor

En la figura 10 se puede observar la evolución de los grados brix en el proceso de fermentación, a mayor cantidad de arroz hay mayor cantidad de azúcares disponibles, inicialmente el mosto de 11% de arroz partió de 4° Brix y en el transcurso de la

fermentación disminuyó a 2 ° Brix; para el mosto de 22% de arroz partió de 9° Brix y disminuyó a 3° Brix consumiendo en el proceso 6 ° Brix y finalmente el mosto de 33% de arroz que partió de 12° Brix se consumieron 7 ° Brix en el proceso. Por lo anterior, los mostos donde la levadura tuvo disponible más cantidad de azúcares fue donde se obtuvo mayor porcentaje de alcohol, que para este caso fueron los mostos de 22% y 33% con 5° y 7° de alcohol respectivamente. En síntesis, en los mostos a medida que aumenta el tiempo de fermentación los grados brix tienden a disminuir, esto debido a que la levadura utiliza los azúcares disponibles como sustrato para la producción de alcohol, lo cual se corrobora con lo presentado en la figura 9 donde a medida que aumenta el tiempo de fermentación aumenta el porcentaje de alcohol.

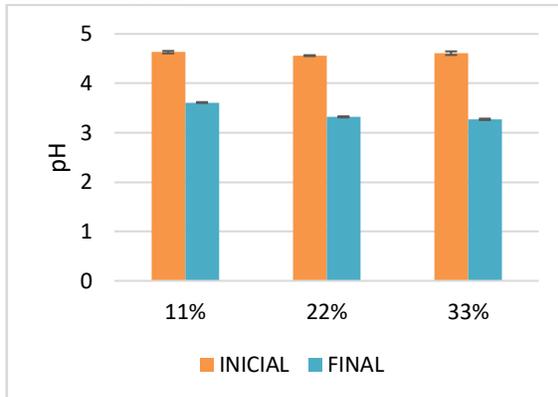
**Figura 10.** Evolución de los ° Brix durante la fermentación



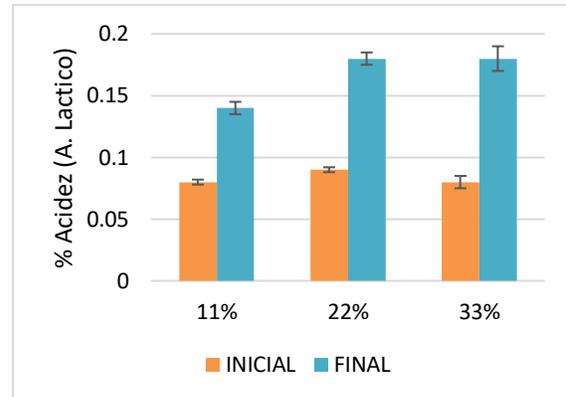
**Fuente:** Autor

En la evolución del pH y la acidez expresada como porcentaje de ácido láctico durante la fermentación se muestran en las figuras 11 y 12 respectivamente. Como ya se mencionó la evolución solo obedece a tres días por lo que se presentan valores iniciales y finales de estos parámetros.

Inicialmente el mosto de 22% presentó un menor pH (4,56) y por lo tanto una mayor acidez (0,09%), mientras que para los mostos de 22% y 33% el pH varió entre 4,61 y 4,63 y el porcentaje de acidez fue menor (0,08%) en comparación con el mosto de 22%. Al finalizar la fermentación el mosto que presentó un mayor descenso en el pH y por lo tanto presentó mayor acidez fue el 33% con una disminución de 1,34 en el pH y un aumento de 0,1% en la acidez total.

**Figura 11.** Evolución del pH durante la fermentación.

Fuente: Autor

**Figura 12.** Evolución de la acidez durante la fermentación

Fuente: Autor

La disminución del pH en el proceso de fermentación es debido a que en el mosto donde hay una mayor cantidad de azúcares disponibles se hace el medio ideal para la reproducción de la levadura y, por lo tanto, tiende a acidificarse debido a la producción de ácido acético durante la fermentación lo cual es natural en una fermentación alcohólica.

### 5.1.6 Sedimentación y clarificación

Para eliminar el almidón y residuos de levadura presente en los mostos se realizaron dos sedimentaciones. En la primera sedimentación se adiciono 2 gramos de bentonita por litro de mosto y se dejó sedimentar por un periodo de 5 días, mientras que para la segunda sedimentación ya que había menor cantidad de partículas suspendidas se adiciono 1 gramo de Bentonita por litro de mosto dejándose sedimentar por un tiempo de 3 días.

Las cantidades de sedimentos obtenidos en la clarificación para cada mosto se presentan a continuación en la tabla 5. Se puede ver que al aumentar el porcentaje de arroz aumenta el porcentaje de sedimentos con respecto a la cantidad de mosto elaborado (20 litros).

**Tabla 5.** Sedimentos obtenidos durante la clarificación de los mostos.

Mostos	Sedimentos (kg)		TOTAL (Kg)	Sedimentos (%)
	Primera clarificación	Segunda clarificación		
11%	4,840	2,530	7,370	36,85
22%	6,950	3,617	10,567	52,84
33%	8,370	4,233	12,803	64,02

Fuente: Autor

En esta etapa se obtuvo mayor cantidad de sedimentos en el mosto de 33% debido a que fue el de mayor concentración de arroz y así mismo fue el de menor rendimiento (35,98%) en bebida clarificada, seguido del mosto de 22% con un rendimiento del 47,16% y finalmente el de 11% con el mayor rendimiento (63,15%).

## 5.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS INICIALES DEL SAKE ELABORADO

En el presente apartado se presenta las características fisicoquímicas de los Sakes elaborados y de la muestra patrón (Sake comercial).

### 5.2.1 pH y acidez total

En la tabla 6 se puede observar el pH y porcentaje de acidez total (ácido láctico) para cada uno de los Sakes elaborados. El sake que presenta menor pH (3,30) y por lo tanto una mayor acidez (0,18%) es el de 33% de arroz debido a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias ácido lácticas. Según (Jianbo *et al.*, 2008) la acidez total de este tipo de licores es un indicio de que el pH general cambia debido a la producción de diversos ácidos orgánicos por parte de los microbios, que es uno de los factores relacionados con las propiedades de fermentación.

**Tabla 6.** pH y acidez total del Sake elaborado

Muestras	pH	% Acidez total
11%	3,75 ± 0,015	0,15 ± 0,005
22%	3,44 ± 0,025	0,17 ± 0,005
33%	3,30 ± 0,049	0,18 ± 0,005
Comercial	4,14 ± 0,020	0,13 ± 0,005
<i>P-valor</i>	0,000	0,000

n=3. Media ± Desviación estándar.  $P \leq 0,05$ . Letras iguales entre filas no existe diferencias significativas.

Según el nivel de significancia para los parámetros pH y acidez total los Sake obtenidos presentan diferencias significativas entre si y presentan diferencias con la muestra patrón (Sake comercial). La muestra de 33% de arroz presento el menor pH con 3,30 y la mayor acidez con 0,18% mientras que el de 11% de arroz presento el mayor pH con 3,75 y la menor acidez con 0,15%. Comparando los Sake obtenidos con la muestra patrón el que más cerca se encuentra en estos parámetros es el de 11% de arroz con una diferencia de 0,02% en la acidez total. Según la guía integral del Sake Japonés el contenido de acidez total de este licor debe estar comprendida entre 0,1 - 0,2 % por lo tanto todos los licores elaborados cumplen con lo establecido, mientras que, para el pH en una investigación hecha por Jung *et al.*, (2013) con diferentes variedades de arroz obtuvieron pH desde 3,4 a 4,5 similares a lo obtenido en la presente investigación (3.3 a 4,1).

### 5.2.2 Color en escala CIEL\*a\*b\* para el Sake

En la tabla 7 se presentan los resultados de la evaluación de color de los Sake obtenidos encontrándose que a medida que se aumenta la concentración de arroz en el licor aumentan las coordenadas L\* a\* y b\*. Teniendo en cuenta las características de color del Sake comercial, en donde el proceso de elaboración es tecnificado principalmente en lo que respecta a la filtración, se presenta una mayor luminosidad la cual esta directamente relacionada con las características de translucidez de esta bebida, así como de las notas verdosas (-a\*) que esta presenta. Este color se ve influenciado conforme se aumenta el porcentaje de arroz en el proceso de elaboración, en donde a mayor concentración de esta materia prima, mayor luminosidad y tinción cromática. Es decir, a mayor proporción

de arroz, la bebida obtenida se acerca mas a las características de color del Sake comercial.

**Tabla 7.** Color en escala CIEL\*a\*b\* del Sake elaborado

Muestras	L*	a*	b*
11%	48,27 ± 0,362 <sup>a</sup>	-1,38 ± 0,032 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,163 <sup>a</sup>
22%	48,75 ± 0,160 <sup>a</sup>	-1,50 ± 0,020 <sup>b</sup>	2,21 ± 0,089 <sup>b</sup>
33%	50,81 ± 1,311 <sup>b</sup>	-1,52 ± 0,025 <sup>b</sup>	2,81 ± 0,176 <sup>b</sup>
Comercial	53,61 ± 0,430 <sup>c</sup>	-1,67 ± 0,005 <sup>c</sup>	3,56 ± 0,056 <sup>d</sup>
<i>p</i> -valor	0,000	0,000	0,000

n=3. Media ± Desviación estándar.  $P \leq 0,05$ . Letras iguales entre filas no existe diferencias significativas.

Los resultados estadísticos indicaron que para el sake elaborado con diferentes porcentajes de arroz difieren significativamente. Al realizar la prueba post hot de las diferencias mínimas significativas (DMS), los Sake elaborados el de 11% y 22% de arroz presentan los niveles mas bajo de luminosidad y no existen diferencias significativas entre estos dos, pero si difieren del de 33% de arroz y de la muestra comercial siendo estos dos últimos los de mayor grado de luminosidad. En cuanto al parámetro a\* dio valores negativos lo que representa coloraciones verdes en el licor observándose que no existe diferencias significativas entre el licor de 22% y 33% de arroz, pero si existen diferencias entre estos dos y la muestra de 11% de arroz y el comercial. Igualmente se presenta el mismo comportamiento para el parámetro b\* que son tonalidades amarillas variando desde 1,62 para la muestra de menor concentración de arroz (11%) hasta 3,56 que es la muestra comercial observándose que no hay diferencias significativas entre la muestra de 22% y 33% de arroz entre si, pero si existen diferencias entre estas y la muestras de 11% de arroz y la muestra comercial.

### 5.2.3 Densidad y turbidez del Sake elaborado

La densidad es un parámetro que indica los solidos solubles contenidos en la bebida, en los resultados obtenidos (tabla 8) se evidencio un aumento de este parámetro a medida que se incremento en porcentaje de arroz en cada uno de los licores; siendo el Sake elaborado con el 33% de arroz el que presenta mayor densidad, teniendo mayor similitud con la muestra comercial. En cuanto a la turbidez se observa que a mayor concentración de arroz hay mayor cantidad de partículas suspendidas en el medio, siendo la muestra de 33% la de mayor turbidez (45,53) con valores muy superiores a la comercial (0,45).

**Tabla 8.** Densidad y turbidez del Sake elaborado

Muestras	Densidad (g/mL)	Turbidez (NTU)
11%	0,9690 ± 0,005 <sup>a</sup>	17,76 ± 0,057 <sup>a</sup>
22%	0,9858 ± 0,001 <sup>b</sup>	22,33 ± 0,577 <sup>b</sup>
33%	0,9921 ± 0,005 <sup>b</sup>	45,53 ± 0,208 <sup>c</sup>
Comercial	1,0000 ± 0,005 <sup>c</sup>	0,450 ± 0,012 <sup>d</sup>
<i>p</i> -valor	0,000	0,000

n=3. Media ± Desviación estándar.  $P \leq 0,05$ . Letras iguales en filas no existe diferencias significativas.

En análisis estadístico mostro que hay diferencias significativas para el parámetro densidad y turbidez entre las bebidas obtenidas y la comercial. Mientras que en la prueba post hot (DMS) el sake elaborado con el 22% y 33% de arroz no difieren entre si para la densidad, pero estos dos si difieren del de 11% de arroz y de la muestra comercial. Para el caso de la turbidez todas las muestras presentan diferencias significativas entre si, siendo la muestra de 11% de los Sake elaborados la de menor turbidez (17,76) valor que es muy superior al de la muestra comercial (0,450), este valor bajo obtenido en la muestra comercial es debido a que las bebidas industriales reciben tratamientos de estabilización previos a la a la filtración con el objeto de eliminar la mayor cantidad de materiales enturbiantes (Rodríguez., 2003) mientras que a los Sake elaborados en la presente investigación solo se les realizo sedimentación.

#### 5.2.4 Solidos solubles y azúcares reductores del Sake elaborado

Los solidos solubles y el contenido de azúcares reductores finales (tabla 9) son proporcionales, a medida que se aumento la concentración de arroz en cada uno de los Sakes aumentaron los solidos solubles (°Brix) y aumento el porcentaje de azúcares reductores.

**Tabla 9.** Solidos solubles y porcentaje de azúcares reductores del Sake elaborado

Muestras de sake	Solidos solubles (°Brix)	Azúcares reductores (%)
11% arroz	1,0 ± 0,000	0,28 ± 0,052
22% arroz	3,0 ± 0,000	1,15 ± 0,045
33% arroz	5,0 ± 0,000	1,57 ± 0,071
Comercial	10,0 ± 0,000	3,41 ± 0,066
<i>p-valor</i>	0,000	0,000

n=3. Media ± Desviación estándar.  $P \leq 0,05$  Letras iguales entre filas no existe diferencias significativas.

De los Sake elaborados el que menor contenido de solidos solubles presento y por ende menor cantidad de azúcares reductores fue la muestra de 11% de arroz con 1°Brix y 0,28% de azúcares mientras que la muestra de 33% de arroz fue la que alcanzo el mayor contenido de solidos solubles 5°Brix y mayor contenido de azúcares reductores 1,57%. Según el análisis estadístico aplicado existen diferencias significativas entre los Sake elaborados y la muestra comercial para los parámetros solidos solubles y azúcares reductores.

#### 5.2.5 Ajuste de la bebida obtenida

Según la guía del sake japonés, la bebida puede ser ajustada en diferentes parámetros químicos como son pH, solidos solubles y porcentaje de alcohol. En este sentido las bebidas obtenidas fueron ajustadas teniendo en cuenta las características de la muestra patrón (Sake comercial). El ajuste del pH a 4,1 se realizo empleando bicarbonato de sodio. Los solidos solubles se ajustaron hasta 10 grados brix con sacarosa comercial de alta pureza. Mientras que para el caso del alcohol fue necesario destilar una parte de cada uno de las bebidas para obtener un porcentaje de alcohol final 15% v/v. Los cálculos para determinar las partes a mezclar de licor destilado con licor sin destilar se realizaron

mediante un cuadro de Pearson obteniéndose que se requería de 1,333 mL de destilado para ajustar el sake de 33%, 1,500 mL para ajustar el sake de 22% y 1,695 mL para ajustar el de 11% obteniéndose un volumen final de 3 litros de cada bebida de acuerdo al porcentaje de arroz. En la tabla 10 se muestran las características finales del sake elaborado y ajustado.

**Tabla 10.** Características fisicoquímicas finales del Sake elaborado

Parámetro	11%	22%	33%	Comercial
Sólidos solubles (°Brix)	10,0 ± 0,000	10,0 ± 0,000	10,0 ± 0,000	10 ± 0,000
Alcohol (% v/v)	15,0 ± 0,000	15,0 ± 0,000	15,0 ± 0,000	15 ± 0,000
pH	4,1 ± 0,000	4,1 ± 0,000	4,1 ± 0,000	4,1 ± 0,000
Acidez total (% ácido láctico)	0,13 ± 0,000	0,13 ± 0,000	0,13 ± 0,000	0,13 ± 0,000
Densidad	0,958 ± 0,001	0,976 ± 0,001	0,985 ± 0,002	1,000 ± 0,015
Turbidez	9,04 ± 0,63	13,71 ± 0,28	36,85 ± 0,21	0,450 ± 0,012
L*	50,38 ± 0,001	50,20 ± 0,001	51,69 ± 0,002	53,61 ± 0,430
a*	-1,09 ± 0,002	-1,42 ± 0,002	-1,48 ± 0,001	-1,67 ± 0,005
b*	1,35 ± 0,001	2,00 ± 0,001	2,63 ± 0,002	3,56 ± 0,056

**Fuente:** Autor

De las características fisicoquímicas se evidencia que el parámetro densidad se ve afectado negativamente por el proceso de destilación efectuado para realizar el ajuste de alcohol de los licores. Evidenciando que el licor con concentración de arroz del 11% es el que menor presenta, esto debido a que fue el que requirió de una mayor adición de alcohol destilado, según Tenorio *et al.*, (2014) a medida que se aumenta el porcentaje de alcohol en una bebida, la densidad de esta tiende a disminuir. En cuanto al parámetro color en comparación con la bebida obtenida antes de ser ajustada este se reduce en el tono (a\* y b\*) mientras que la luminosidad se mejora con la destilación. Por otra parte, la turbidez disminuye conforme se adiciona más alcohol destilado en las bebidas para alcanzar el 15% de alcohol.

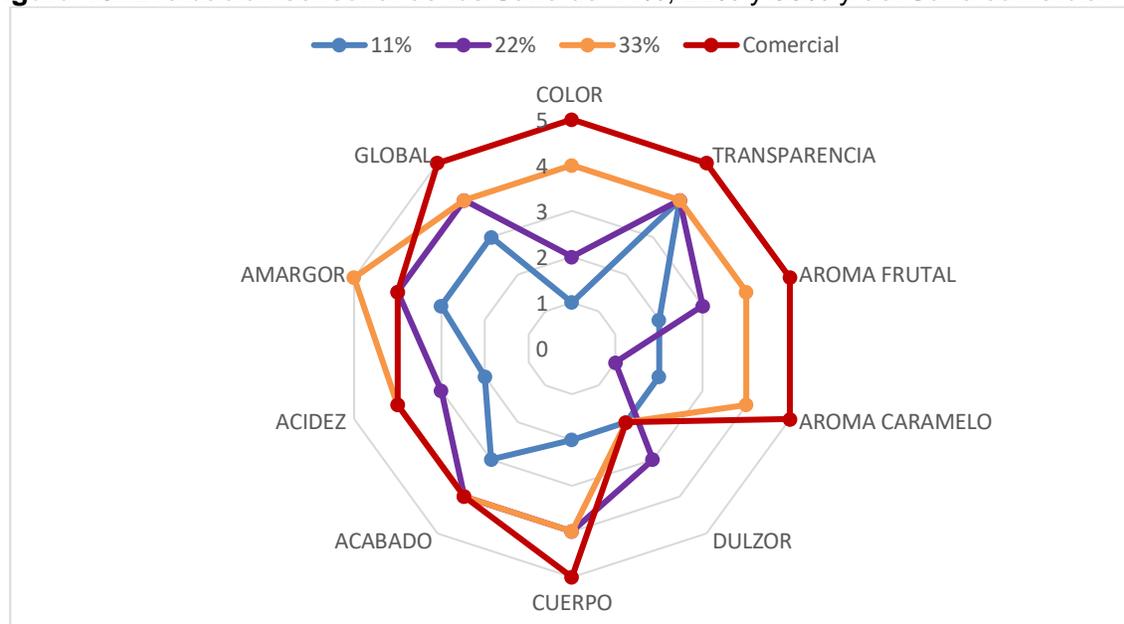
### 5.3 EVALUACIÓN SENSORIAL

Inicialmente fueron convocados 30 jueces consumidores a los cuales se les consultó su frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas, conocimiento sobre la bebida Sake, datos personales y disponibilidad para llevar a cabo las diferentes secciones requeridas principalmente en el proceso de selección y entrenamiento. Para este último requerimiento 4 de los 30 jueces indicaron no contar con el tiempo y el interés para esta participación, por lo que finalmente para el proceso de entrenamiento se contó con un grupo de 26 jueces. En el proceso de selección se consideró como aptos aquellos jueces que obtuvieran un porcentaje de acierto superior al 70% en sus resultados, obteniéndose que de los 26 jueces 12 lograron aciertos hasta del 85,18%.

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial aplicada por los 12 jueces seleccionados a las muestras de Sake elaborado y la muestra comercial se muestran en la figura 13. Se evidencia que la muestra más aceptada por los jueces fue la comercial y

de los Sake elaborados, los más aceptados fueron los que contenían mayor concentración de arroz (22 y 33%).

**Figura 13.** Evaluación sensorial de los Sake de 11%, 22% y 33% y del Sake comercial



Fuente: Autor

### 5.3.1 Fase visual

Los atributos de color y transparencia fueron evaluados por observación directa de las muestras de Sake tanto comercial como las elaboradas a escala de laboratorio. En los resultados se puede observar que los jueces perciben un color menos intenso conforme se disminuye el porcentaje de arroz en el proceso de elaboración del sake, obteniéndose una mayor calificación para el Sake comercial. Las valoraciones bajas en este atributo para las muestras elaboradas con el 22% y 11% de arroz son debidas al proceso de destilación requerido para ajustar su contenido de alcohol, lo que origino que el producto elaborado en laboratorio perdiera color.

En cuanto al atributo de la transparencia de las muestras, los jueces percibieron el sake comercial como el más transparente con una calificación de 5, mientras que las muestras de 11%, 22% y 33% de arroz obtuvieron una calificación de 4. De los atributos anteriormente mencionados se puede decir que el Sake que más se asemeja al comercial es la muestra de 33% de arroz.

### 5.3.2 Fase olfativa

Se evaluaron los aromas a frutas y a caramelo donde los jueces percibieron un mayor aroma frutal en la muestra comercial con una calificación de 5, la cual fue disminuyendo para las muestras a medida que se redujo el porcentaje de arroz empleado en la elaboración de la bebida. Lo anterior significa, que la concentración de arroz influye en

este parámetro, pues a mayor concentración de arroz mayor aroma frutal se percibe. Por otra parte, se debe contemplar que esta pérdida de los aromas característicos del sake puede deberse al proceso de destilación requerido para el ajuste de los mismos.

Para el caso de aroma a caramelo, se presenta la misma calificación en relación a la concentración de arroz empleado en donde a mayor concentración mayor calificación salvo el Sake obtenido con el 22% de arroz que de acuerdo a los jueces es el que presenta una menor intensidad a caramelo.

En estos atributos se puede decir que la muestra que mas se asemeja al sake comercial en cuanto aroma a frutas como aroma a caramelo es la muestra de 33% de arroz.

### 5.3.3 Fase gustativa

En cuanto al dulzor y a pesar de que todas las muestras fueron ajustadas a 10 °Brix, que es lo que contiene el sake comercial, los jueces calificaron el sake de 22% de arroz ligeramente mas dulce que los demás con una calificación de 3, mientras que las muestras de 11%, 33% y el comercial obtuvieron una calificación de 2 indicando que este licor no se caracteriza por ser demasiado dulce. En lo que respecta al cuerpo, el sake comercial obtuvo la mayor calificación, y de acuerdo con el panel de catadores, entre mas porcentaje de arroz se emplee en la elaboración del sake se obtiene una bebida con mayor cuerpo, en donde sensorialmente los que se elaboraron con el 22% y 33% no se diferencian. Estos resultados son corroborados con lo obtenido en las pruebas fisicoquímicas en el parámetro de densidad, donde no se presentaron diferencias significativas entre estas dos muestras.

Para el acabado o regusto, los jueces calificaron con igual intensidad (4/5) al sake comercial, al obtenido con el 22% y el 33% de arroz, en donde manifestaron que la sensación en boca era mas duradera. Este resultado esta ligado al contenido de acidez presente en cada uno de los licores, ya que estas muestras de Sake fueron las que mayor acidez presentaron. La muestra de 11% de arroz, el acabado fue calificado con una nota de 3/5 concordando con la calificación de acidez.

Sensorialmente, el Sake que fue elaborado con el 33% de arroz fue la que presento una mayor intensidad en el sabor amargo lo cual puede estar influenciado por los procesos de gelatinización e hidrolisis enzimática requerido para la obtención de esta bebida, lo cual notoriamente los jueces identifican como una propiedad que se presenta en todas las muestras, siendo este atributo en el que menores variaciones hay entre muestras.

### 5.3.4 Calificación global

De los Sake presentados a los jueces la muestra con una mayor aceptación fue la comercial con una calificación global de 5 esto debido a que es la muestra que presenta mayores aromas tanto frutal como a caramelo, presenta mayor cuerpo, es la de mayor transparencia y la que presenta mayor coloración. Las muestras de 22% y 33% de arroz fueron bien aceptadas por los jueces con una calificación global de 4 esto debido a que la muestra de 33% de arroz presentaba mayor color y aromas a frutas y caramelo y la de 22% presentaba características similares en cuanto transparencia, cuerpo y acabado o regusto. Finalmente, la muestra menos aceptada fue la de 11% de arroz con una

---

calificación global de 3 ya que fue la muestra que presento menor color, menos aromas y poco cuerpo.

## 6. CONCLUSIONES

La acción de las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa en la etapa de licuefacción y sacarificación del almidón se ve influenciada por la concentración de arroz, obteniéndose un porcentaje de conversión de almidón a azúcares reductores que varía desde 34,9% hasta un 64,7% siendo inversamente proporcional a la concentración de arroz.

La producción de azúcares fermentales expresados en grados brix es afectado por la concentración de almidón, presentando mayores azúcares el mosto elaborado con el 33% de arroz. En este sentido la producción de azucares es directamente proporcional a la concentración de arroz en el mosto.

A nivel experimental y en condiciones de laboratorio, se obtuvo el licor Sake mediante hidrólisis enzimática del almidón, el factor concentración de arroz influye significativamente sobre el contenido de solidos solubles ( $^{\circ}$ Brix), porcentaje de alcohol, densidad, color, turbidez, pH y acidez de la bebida, estableciéndose, que de los Sakes elaborados el de 33% en concentración de arroz se asimila más a las características fisicoquímicas encontradas en el Sake comercial.

De las características fisicoquímicas analizadas en el Sake con una concentración de arroz de 33% se obtuvieron los valores más elevados en cuanto a color, densidad, solidos solubles y azúcares reductores y por lo tanto los más similares a los hallados en el Sake comercial, mientras que el Sake elaborado con un 11% de arroz tuvo similitud con el comercial en parámetros como pH, acidez total y turbidez.

El sake elaborado con el 33% de arroz fue el más similar a la bebida comercial obteniendo una densidad de 0,992 g/ml, solidos solubles de 5 $^{\circ}$  Brix, azúcares de 1,57%, en parámetros de color una luminosidad de 50,81, coordenada a\* de -1,52 y coordenada b\* de 2,81.

Sensorialmente los atributos de color, transparencia, aroma y cuerpo son los más influyentes al momento de evaluar el grado de aceptación de la bebida alcohólica Sake, los cuales son afectados negativamente conforme se reduce la concentración de arroz en el proceso de elaboración.

A nivel sensorial el sake elaborado con un 33% de arroz presento mayor aceptación sobre las demás concentraciones por atributos como color, aroma a frutas, aroma a caramelo, cuerpo, acabado, acidez y amargor.

De acuerdo a los resultados fisicoquímicos y sensoriales obtenidos es factible elaborar la bebida Sake a través de la hidrólisis enzimática del almidón de arroz con un porcentaje de 33% debido a que los parámetros evaluados son similares a la de la bebida sake comercial.

## **7. RECOMENDACIONES**

La hidrólisis enzimática requiere más estudios de optimización con el fin de obtener una mayor cantidad de azúcares reductores y por ende obtener mayores niveles de producción de etanol en la etapa de fermentación. Asimismo, se requiere de realizar estudios con mayores concentraciones de arroz con el fin de tener una mayor similitud en las características fisicoquímicas y sensoriales al sake comercial.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta, R. 2012. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá, Colombia.

Agencia Nacional de Impuestos. Producción, Consumo, Estadísticas de Impuestos de Licores. (Consultado en línea). Disponible en: [http://www.nta.go.jp/foreign\\_language/statistics/tokei-e/h14/syuzei.htm](http://www.nta.go.jp/foreign_language/statistics/tokei-e/h14/syuzei.htm). Consultado: 30-04-2019.

Agronet. 2006. Yuca en producción de etanol. Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario (Consultado en línea). Disponible en: [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_si2/2006718143257\\_Yuca%20en%20pruduccin%20de%20etanol.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/2006718143257_Yuca%20en%20pruduccin%20de%20etanol.pdf). Consultado: 30-04-2019.

Aguilar, B., FranYios, J. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letter in Applied microbiology, Vol 37, Nº 1, 268 – 274 pp.

Asociación Japonesa de Fabricantes de Sake y Shochu e Instituto Nacional de Investigación de Bebidas Alcohólicas. Guía integral del Sake Japonés, cap 1, 2-3 pp. (Consultado en línea) Disponible en: [https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no\\_1.pdf](https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no_1.pdf). Consultado: 30-04-2019.

Asociación Japonesa de Fabricantes de Sake y Shochu e Instituto Nacional de Investigación de Bebidas Alcohólicas. Guía integral del Sake Japonés, cap 2, 2-10 pp. (Consultado en línea) Disponible en: [https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no\\_2.pdf](https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no_2.pdf). Consultado: 30-04-2019.

Asociación Japonesa de Fabricantes de Sake y Shochu e Instituto Nacional de Investigación de Bebidas Alcohólicas. Guía integral del Sake Japonés, cap 8, 42-44 pp. (Consultado en línea) Disponible en: [https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no\\_8.pdf](https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no_8.pdf). Consultado: 30-04-2019.

Asociación Japonesa de Fabricantes de Sake y Shochu e Instituto Nacional de Investigación de Bebidas Alcohólicas. Guía integral del Sake Japonés, cap 10, 47-49 pp. (Consultado en línea) Disponible en: [https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no\\_10.pdf](https://www.japansake.or.jp/sake/english/pdf/spa/no_10.pdf). Consultado: 30-04-2019.

Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., Chirinos, M. 2012. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. Revista Multiciencias. Vol. 12, Nº 2, 129 – 135 pp.

Bailey, P.S., Bailey, C.A. 1998. Química orgánica: conceptos y aplicaciones. Quinta edición. Editorial Prentice Hall. México. 470 p.

Beltrán, A. D. 2010. Aplicación de la enzima  $\alpha$ -amilasa comercial ban® 480I a la harina de arroz de la variedad fedearroz 50 para la elaboración de una bebida vegetal. Tesis de grado, programa ingeniería de alimentos, Universidad de la Salle.

Beltrán, G., Torija, M.J Novo, M., Ferrer, N. Poblet, M., Guillamon, J.M. 2002 Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study, Systematic and Applied Microbiology, Vol 25, N° 1, 287-293 pp.

Buitrago, J. C. 2007. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces Cerevisiae*. Trabajo de grado Presentado como requisito Para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de ciencias. Bogotá D.C.

Castillo, W.H., España, S.F. 2011. Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de licor de arroz (sake) en la provincia de Loja. Trabajo de grado para optar el título en administración de empresas. Universidad Nacional de Loja. Loja Ecuador

Chen, M., Xia, L., Xue, P. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. International Biodeterioration & Biodegradation Vol 59, N° 1, 85–89 pp.

Chica, N. 1996. Sacarificación del almidón de papa. Trabajo final presentado como requisito para optar por el título de Especialista en Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.

Crueger, W., Crueger, A. 1993. Biotecnología: manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 213-231 pp.

Cummings, H., Englyst, H. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. American Journal of Clinical Nutrition. Vol 61, N°1, 938–945 pp.

Egúsqüiza, A. 2015. Aplicación de una enzima alfa Amilasa fungal a la harina integral de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) para la elaboración de una bebida natural energética y vitamínica. Universidad Le Cordon Bleu. Lima- Peru.

Espitia, L. C. 2009. Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Folch, J., Covarrubias, A. 2004. Revista latinoamericana de microbiología. Vol. 46, N° 1-2, 24 - 46 pp.

Furukawa, S. 2012. Sake: Quality characteristics, flavour chemistry and sensory analysis. (Consultado en línea). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/237842605\\_Sake\\_Quality\\_characteristics\\_flavour\\_chemistry\\_and\\_sensory\\_analysis/references](https://www.researchgate.net/publication/237842605_Sake_Quality_characteristics_flavour_chemistry_and_sensory_analysis/references). Consultado: 08-03-2019.

Galvis, J. M. 2009. Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol a partir de levaduras nativas. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química. Universidad industrial de Santander. Grupo de investigación en bioquímica y microbiología química. Bucaramanga Colombia.

Gauntner, J. 2002. The Sake Handbook, Tuttle Publishing.

Herrera, A. J. 2013. Diseño de las etapas de hidrólisis de almidón y fermentación para producir bioetanol basado en la respuesta dinámica del sistema. Trabajo final presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

Hiroichi, A., Takashi I. 2010. *Sake*, Brewing Society of Japan, Tokio

Hoseney, R. 1991. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 23-106 pp.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas Y Certificación ICONTEC. GTC 4. Manual de métodos analíticos para el control de calidad de bebidas alcohólicas. Bogotá D.C. ICONTEC Colombia 2004.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas Y Certificación ICONTEC. NTC 4129. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de evaluadores. Parte 1: evaluadores seleccionados. Bogotá D.C. ICONTEC Colombia 1997.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. NTC 5114. Bebidas alcohólicas. Métodos para determinar la acidez y el pH. Bogotá D.C. ICONTEC Colombia 2003.

Jianbo, J., Kim, S., Jin, Q., Eom, H., y Han, N. S. 2008. Análisis de diversidad de bacterias del ácido láctico en takju, vino de arroz coreano. Revista de Microbiología y Biotecnología, Vol 18, N° 1, 1678–1682 pp.

Jung, H., Seung, J. L., Jeong, H. L., Bum, K. K., Kee, J.P. 2013. Chemical and sensory profiles of makgeolli, Korean commercial rice wine, from descriptive, chemical, and volatile compound analyses. Magazine Food chemistry, Vol 152. N° 1, 624-632 pp.

Kłosowski, G., Czuprynski, B., Wolska, M. 2006. Characteristics of alcoholic fermentation with the application of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: As-4 strain and I-7-43 fusant with amyolytic properties. *Journal of Food Engineering*, Vol 76, N° 1, 500-505 pp.

León, A. I. 1997. Obtención de jarabe de glucosa del almidón de arroz (*Oryza sativa*) por acción de la alfa amilasa y la amiloglucosidasa. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en industrias alimentarias. Universidad nacional agraria de la selva. Tingo María, Perú.

Loaiza, J. K. 2016. Evaluación del contenido de amilosa en arroz mediante espectroscopia de infrarrojo cercano-NIRS. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia.

López, Á., Trujillo, Y., Penagos, L. 2010. Efecto de las condiciones de empaclado y el tiempo de almacenamiento en el color del grano del frijol seco cargamento blanco (*Phaseolus vulgaris* L). *Revista Científica Guillermo de Ockham*, Vol 8, N° 1, 73-82 pp.

Mariño, R. 1989. Selección de cepas de *Aspergillus niger* para la producción de amilosa. Trabajo de grado para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Martínez, C., Cuevas, F. 1989. Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz. CIAT.

Mesas, J., Alegre, M. T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment* 2, Vol 4, 174-183 pp.

Navarro, M. A., y Sossa, D. P. 2003. Obtención de etanol, a partir de almidón de papa proveniente del sector agrícola. Requisito parcial para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

Nolivos, R. 2011. Elaboración de edulcorantes a partir de almidones aplicando enzimas alfa y beta amilasas de origen vegetal. tesis para optar el título de ingeniero químico. Facultad Ingeniería Química. Universidad de Guayaquil.

Oates, C. G. 1997. Hacia una comprensión de la estructura de los gránulos de almidón y la hidrólisis. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, Vol 8, N° 1. 375–382 pp.

O'Toole, D.K. 2016. Beverages: Asian Alcoholic Beverages. *Encyclopedia of Food Grains*. 10.1016/b978-0-12-394437-5.00234-5

Organización mundial del comercio. 1996. Orden de Ejecución de la Ley del Impuesto sobre Bebidas Alcohólicas, artículo 2.

Organización mundial del comercio.1996. Ley del Impuesto sobre las Bebidas Alcohólicas del Japón, artículo 3.

Ortiz, I., Álvarez, V., González, G., Valenzuela, L., Potisek, M., Chávez, J. 2015. Concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculos de *Caladium bicolor* en diferentes etapas fenológicas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 6, N° 3, 483-494 pp.

Owen, P. 1989. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Pedroza, A. 1999. Producción de amilasa termoestable a partir de *Thermus* sp. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.

Peña, D., Molina, R., Torres, R. 2009. Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (*Aspergillus niger*). Memorias del IV Simposio de Química Aplicada – SIQUIA.

Philip, H., Haruo M. 2006. *The Book of Sake: A Connoisseur's Guide*, Kodansha International, Tokio

Proaño, J. 2013. El efecto del uso de probióticos (*Lactobacillus plantarum* & *Lactobacillus casei*) y enzimas amilasas (fungamyl) & pectinasas (afpl), en la fermentación ácido-láctica de camote (*Ipomoea batatas* L.). Revista Investigación y Desarrollo, Vol. 6, N° 2, 74-89 pp.

Pulloquina, L. 2011. Estudio del efecto de Glucosidasas y Alfa-Amilasas en la elaboración de Pan con sustitución parcial de Harina de Papa (*Solanum Tuberosum*) Nacional. Tesis para optar al título ingeniera de alimentos, Universidad técnica de Ambato. Ambato-Ecuador.

Rega, L. 2015. Obtención de jarabes glucosados a partir de sorgo mediante hidrólisis enzimática. Trabajo de grado para optar el título de especialista en ingeniería química. Universidad central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Cuba.

Restrepo, P. S. 2012. Optimización del proceso de fermentación de la fábrica de licores y alcoholes de Antioquia (fla). Informe final de la práctica profesional realizada en la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín Colombia.

Reyna, M., Robles, M., Reyes, P y Mendoza R. 2004. Hidrólisis enzimática del almidón. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 7 N° 1, 40-44 pp.

Ríos, C., Maldonado, L., Caballero, L. 2016. Bebida fermentada a base de arroz con adición de probióticos. Revista @limentech ciencia y tecnología alimentaria. Vol 14, N° 1, 58 – 73 pp.

Robinson, D. Bioquímica y valor nutritivo de los Alimentos. España: Editorial Acribia, S.A; 1991.

Rodríguez, C. 2011. Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (*Musa Cavendish*) para la obtención de jarabe de glucosa. Tesis para optar al título Ingeniera de Alimentos, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición; Quito, Ecuador.

Rodríguez, H. 2003. Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A. Tesis para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Ronquillo, H. 2012. Estudio del efecto de la adición de la enzima alfa amilasa en un pan tipo muffin, elaborado con diferentes tipos de harina de trigo. Tesis para optar al título ingeniera de alimentos, Universidad técnica de Ambato. Ambato-Ecuador.

Ruiz, R. 2001. Hidrólisis enzimática de desechos del umarí (*Poraqueiba sericea* Tulasne) y de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, Vol 1, N° 1, 22 - 29 pp.

Santander, M. C. 2006. Optimización de las concentraciones de urea y fosfato de amonio en la producción de alcohol a partir de miel Final y miel virgen de caña de azúcar empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Requisito parcial para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., y Mikami, B. (2000). Comparación de las capacidades de degradación de las amilasas alfa y beta amilasa en gránulos de almidón en bruto. Proceso de bioquímica, Vol 35, N°1. 711–715pp.

Suárez, D. M. 2013. Cerveza: componentes y propiedades. Trabajo fin de master. Universidad de Oviedo, España.

Tenorio, D., Pradena, J., Garcia, M., Rodriguez, M., Cuenca, A. 2014. Proyecto de innovación: El vino y sus análisis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Terebiznik, M. 1998. Alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*: estudios de producción por fermentación en sustrato sólido, purificación y estabilización. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos aires- Argentina.

Tomasso, M. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Químico. Facultad de Química. Universidad de la República Uruguay.

Toro, M., Guerra, M., Espinoza, C., Newman, A., 2011. Cambios en la composición proximal de harina de maíz precocida, arroz, pastas y cereales infantiles al prepararlos en el hogar para su consumo. *Anales Venezolanos de Nutrición*, Vol 24, N° 1, 27-33 pp.

Torres, M., Carmona, R., Aguirre A. 2015. Obtención y caracterización estructural y funcional de almidón acetilado de malanga (*Colocasia esculenta* Schott). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, Vol 6, N° 4, 905-912 pp.

Ward, O.P. 1991. *Biología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 274 pp.

White, J. 1995. *Yeast Technology*. Wiley & Sons. USA. 431 pp.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Formato de selección de jueces

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
PROGRAMA INGENIERIA DE ALIMENTOS

A continuación, encontrará una serie de preguntas sobre sus hábitos de consumo de bebidas alcohólicas, por favor marque con una X la respuesta que más considere.

Nombre \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_  
Edad \_\_\_\_\_ Celular \_\_\_\_\_

Estaría usted dispuesto a participar en el proceso de entrenamiento de jueces para la evaluación sensorial de una bebida tradicional Japonesa "Sake".

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

¿Fuma? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cuántos cigarrillos al día? \_\_\_\_\_

¿Es consumidor frecuente de bebidas alcohólicas?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

¿Con que frecuencia consume bebidas alcohólicas?

Una vez por semana \_\_\_\_\_

Cada 15 días \_\_\_\_\_

Cada mes \_\_\_\_\_

Cada 3 meses \_\_\_\_\_

Cada año \_\_\_\_\_

Otra \_\_\_\_\_ ¿Cual? \_\_\_\_\_

El Sake es una bebida alcohólica a base de arroz ¿Lo ha consumido? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

¿Consume bebidas alcohólicas a base de arroz? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cual? \_\_\_\_\_

¿Con que frecuencia consume bebidas alcohólicas a base de arroz?

Una vez por semana \_\_\_\_\_

Cada 15 días \_\_\_\_\_

Cada mes \_\_\_\_\_

Cada 3 meses \_\_\_\_\_

Cada año \_\_\_\_\_

Otra \_\_\_\_\_ ¿Cual? \_\_\_\_\_

Observaciones

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

## 9.2 Formato de evaluación sensorial de los Sake elaborados

## CATA DE SAKE

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_ LUGAR: \_\_\_\_\_

Frente a usted hay dos muestras de Sake codificadas aleatoriamente, las cuales deberá evaluar primeramente en atributos visuales, luego olfativos y finalmente en boca.

Por favor marque con una cruz dentro de la casilla el grado de intensidad según sea su percepción y la escala descrita para cada uno de estos.

## Fase visual

Atributos	Muestras	(-) (+)				
		1	2	3	4	5
<b>Color</b> Incoloro → Ámbar	294					
	267					
	541					
	782					
<b>Transparencia</b> Transparente → Apagado	294					
	267					
	541					
	782					

## Fase olfativa

Atributos	Muestras	(-) (+)				
		1	2	3	4	5
<b>Aroma a manzana</b> Indetectable → Fuerte	294					
	267					
	541					
	782					
<b>Aroma a caramelo</b> Indetectable → Fuerte	294					
	267					
	541					
	782					

## Fase gustativa



### 9.3 Ficha técnica Alfa amilasa HT 1000 A

#### FICHA TECNICA

Galletería, Almidones

**PROENZIMAS**  
ENZIMAS PARA PROCESOS INDUSTRIALES

PROENZIMAS S.A

Calle 56 No. 5N - 65

PBX: 447 6028

FAX: 446 6442

Cali - Colombia

dirtecnica@proenzimas.com

www.proenzimas.com

#### *HT 1000 A* <sup>©</sup>

Enzima Alfa amilasa

**HT – 1000 A** es una nueva Alfa-Amilasa Bacterial termoestable, grado alimenticio en polvo, obtenida por fermentación controlada de una Cepa especial de bacterias que produce enzima de alta estabilidad.

Esta enzima hidroliza rápidamente las uniones alfa D -1,4 de los enlaces glucosídicos del almidón para producir dextrinas solubles y reducir la viscosidad del almidón gelatinizado.

#### Efecto del pH

El rango efectivo de pH está entre 6.0 y 8.0

La enzima es estable a pH entre 5.0 y 8.5

El pH óptimo de trabajo es 6.5

#### Efecto de la Temperatura

El rango efectivo de temperatura de trabajo para el **HT – 1000 A** está entre 50 ° C y 90 ° C. La temperatura óptima de operación es de 70 ° C.

La enzima muestra buen desempeño en niveles de temperatura inferiores a los óptimos señalados.

#### Propiedades Físicas

Forma	:	Polvo seco.
Color	:	Habano a ligeramente tostado.
Solubilidad	:	La porción enzimática es soluble en agua.
Actividad	:	500.000 MWU / g. +/- 5 %

La característica de turbiedad que se presenta ocasionalmente al diluir la enzima en agua, antes de la aplicación al proceso, se debe a las características del vehículo en el que se ha soportado.

## 9.4 Ficha técnica Glucoamilasa

# GLUCOAMILASA



Technical Data

Sheet/Ficha técnica

**» Descripción:**

La glucoamilasa está hecha de *Aspergillus niger* a través de una técnica de extracción y cultivo. Este producto puede ser usado en la industria del alcohol, destilado, cerveza, ácido orgánico, azúcar, farmacia y otras industrias.

**Número CAS:** 9032-08-0

**» Calidad sensorial:**

Posee una apariencia de líquido color café, con olor característico de la fermentación.

**» Propiedades físicas y químicas:**

Contenido, %	98,5 – 101,5
pH	Estable: 3,0-5,5; óptimo: 4,0-4,5
Actividad enzimática, u/mL	≥ 150000
Temperatura de actividad, °C	Favorable a 58 – 60
Densidad Bulk, g/mL	≤ 1,25
Consistencia ion calcio	El ion calcio puede proteger el producto
Tamaño de partícula, tamiz 0,4mm %	≥ 80

**» Almacenamiento y empaque:**

Tambores de 25 kilos. Almacenar este producto en un lugar seco con temperatura adecuada y en contenedores cerrados herméticamente, evitando la exposición al sol. A 25°C, durante 3 meses la actividad enzimática se mantiene por encima del 95%, después de 6 meses el producto mantiene una actividad enzimática del 85%. Aumentar dosificación después de la vida útil. Dosificación: 80 – 120 u/g de material. La unidad de Glucoamilasa es equivalente a una cantidad de enzima que hidroliza el almidón soluble para obtener 1mg de glucosa a 40°C y un pH de 4,6 en 1 hora.

La información contenida aquí es una fiel copia de la ficha técnica de nuestro proveedor/The information content on this document is provided by the data sheet of the supplier.