UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA: INGENIERIA EN ALIMENTOS

TEMA:

"ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*) **TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA".**

Proyecto de Trabajo de Graduación, modalidad: Seminario de Graduación presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR:

Collaguazo Simbaña Paulina Elizabeth

TUTOR:

Ing. mario paredes M.Sc.

Ambato - Ecuador

2011

Ing. mario paredes

TUTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Investigación: **"ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (***Oryza sativa***)TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA"** desarrollado por la señorita Paulina Elizabeth Collaguazo Simbaña; observa las orientaciones metodológicas de la Investigación Científica.

Que ha sido dirigida en todas sus partes, cumpliendo con las disposiciones en la Universidad Técnica de Ambato, a través del Seminario de Graduación.

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la respectiva calificación.

Ambato, 20 de junio del 2011

_____

Ing. mario paredes

TUTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido del Trabajo de Investigación **"ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (***Oryza sativa***)TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA"**, corresponden a Paulina Elizabeth Collaguazo Simbaña y del Ing. Mario Paredes Tutor del trabajo de Investigación, y del patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato.

_____	_____
Paulina Collaguazo	Ing. mario paredes
Autor del Trabajo de Investigación	**Tutor del Trabajo de Investigación**

A CONSEJO DIRECTIVO DE LA FCIAL

El Tribunal de Defensa del Trabajo de Investigación **"ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (***Oryza sativa***)TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA",** presentado por la señorita Paulina Elizabeth Collaguazo Simbaña y conformada por : Ing. Román Rodríguez y la Ing. Aracely Pilamala Miembros del Tribunal de Defensa y Tutor del Trabajo de Investigación Ing. Mario Paredes P. y presidido por el Ingeniero Romel Rivera, Presidente de Consejo Directivo, Ingeniera Mayra Paredes E., Coordinadora del Décimo Seminario de Graduación FCIAL-UTA, una vez escuchada la defensa oral y revisado el Trabajo de Investigación escrito en el cuál se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas por el Tribunal de Defensa del Trabajo de Investigación, remite el presente Trabajo de Investigación para uso y custodia en la Biblioteca de la FCIAL.

_____
Ing. Romel Rivera
Presidente Consejo Directivo

_____
Ing. Mayra Paredes E.
Coordinadora Décimo Seminario de Graduación

_____
Ing. Román Rodríguez
Miembro del Tribunal

_____
Ing. Aracely Pilamala
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

El presente trabajo de graduación está dedicado a mi persona y a aquellas personas que han sido mi fuente inspiración durante este largo transitar en el diario vivir, y siempre viviré eternamente agradecida:

Mi sincero agradecimiento a DIOS y a la VIRGEN por bendecirme para dar un paso más en mi vida.

A mis padres Lilia Simbaña y Javier Collaguazo, por alentar mis triunfos y perdonar mis fracasos, siendo así mi ejemplo de lucha y mi fuente de confianza y superación. Mis viejitos que con tanto amor, sacrificio y abnegación me apoyaron en esta etapa de mi vida, estimulándome a seguir adelante y vencer todos los obstáculos para lograr mis metas propuestas.

A mi hijo Ariel Alejandro Pilaguano Collaguazo y mi esposo Nelson Efraín Pilaguano Carpio, quienes son mi motivo de lucha y perseverancia.

A mis hermanos Ana María, Andrea, Camila y Javier; quienes han alegrado mi vida y llenado de amor.

A mi tío Edison Patricio Collaguazo quien con su carisma y profesionalismo ha sido un ejemplo a seguir.

A mi familia en general, por permanecer siempre a mi lado en las dificultades y triunfos con su apoyo incondicional.

Paulina Elizabeth Collaguazo

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, a sus distinguidas autoridades y docentes, que han generado en mi valores y conocimientos, guiándome por un camino profesional de calidad.

Al Ingeniero Mario Paredes, director de tesis, que con sus conocimientos, paciencia, acertada orientación, por el apoyo y la confianza brindada en la realización del presente trabajo de Graduación.

A la Ingeniera Mayra Paredes, coordinadora del X Seminario de Graduación, por la paciencia y apoyo durante la realización del presente trabajo de investigación.

Finalmente a mis amigos, que con su apoyo incondicional han logrado que valore el verdadero sentido de la amistad.

Paulina Elizabeth Collaguazo

ÍNDICE GENERAL

PÁGINAS PRELIMINARES

Certificación de Aprobación del Tutor de Tesis	i
Declaración de Autenticidad y Autoría	ii
Aprobación del Tribunal de Grado	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice General de Contenidos	vi
Resumen Ejecutivo	xiii

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

	PÁGINA
1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN	1
1.2.1.1 MACRO CONTEXTUALIZACIÓN	2
1.2.1.2 MESO CONTEXTUALIZACIÓN	4
1.2.1.3 MICRO CONTEXTUALIZACIÓN	6
1.2.2 ANÁLISIS CRÍTICO	7
1.2.3 PROGNOSIS	10
1.2.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
1.2.5 INTERROGANTES DE LA INVESTIGACION	11
1.2.6 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11

1.3 JUSTIFICACIÓN 12
1.4 OBJETIVOS 13

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN 14
2.2 FUNDAMENTACION FILOSÓFICA 16
2.3 FUNDAMENTACION LEGAL 16
2.4 CATEGORIAS FUNDAMENTALES 17
2.4.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA 17
2.4.1.1 POLISACARIDOS 17
2.4.1.1.1CELULOSA . 17
2.4.1.1.2HEMICELULOSA 18
2.4.1.1.3LIGNINA 18
2.4.1.1.2OTAS SUSTANCIAS 18
2.4.2EL ARROZ 19
2.4.2.1ESTRUCTURA DEL GRANO DE ARROZ 19
2.4.3LA CASCARILLA DE ARROZ 20
2.4.4ENZIMA 21
2.4.4.1DEFINICIÓN 22
2.4.4.2APLICACIONES COMO CATALIZADORES EN PROCESOS INDUSTRIALES 23
2.4.4.3ENZIMA HEMICELULASA 24
2.4.5FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA 25
2.4.6CARBONATACIÓN 26
2.4.7ANÁLISIS SENSORIAL 27
2.6 HIPÓTESIS 28

2.7 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES 29

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 ENFOQUE DE LA INVESTIGACION 30
3.2 MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN 30
3.3 NIVEL O TIPOS DE INVESTIGACIÓN 31
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS 31
3.4.1 MATERIA PRIMA 31
3.4.2 MATERIALES Y REACTIVOS 32
3.4.2.1 MATERIALES 32
3.4.2.2 REACTIVOS 32
3.4.2.3 METODOLOGÍA 32
3.4.2.4 METODOS DE ANÁLISIS 35
3.4.2.4.1 GRADOS BRIX 35
3.4.2.4.2 pH 35
3.4.2.4.3 ACIDEZ TOTAL 35
3.4.2.4.4 GRADO ALCOHÓLICO 36
3.4.2.4.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO 37
3.4.2.4.6 ANÁLISIS SENSORIAL 38

3.5 POBLACIÓN Y MUESTRA. 38
3.5.1 POBLACIÓN 39
3.5.2 MUESTRA 39
3.5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL 39
3.5.3.1RESPUESTAS EXPERIMENTALES 40

3.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 41
3.6.1 VARIABLE INDEPENDIENTE 41
3.6.2 VARIABLE DEPENDIENTE 42
3.7PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN 43
3.8 PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN 43

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1DEGRADACION ENZIMATICA DE LA HEMICELULOSA 44
4.1.1 SÓLIDOS SOLUBLES 42
4.2CARACTERIZACIÓN DEL MOSTO (CON ADICIÓN DE PULPA DE MORA), ANTES DE LA FERMENTACIÓN 45
4.3. FERMENTACIÓN DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA 46
4.1.4.1 SÓLIDOS SOLUBLES 46
4.1.4.2 pH 46
4.1.4.2 ACIDEZ TOTAL 47
4.1.5DETERMINACION DEL GRADO ALCOHÓLICO EN EL MEJOR TRATAMIENTO 47
4.1.6CARBONATACIÓN DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA 48
4.1.7ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN EL MEJOR TRATAMIENTO 48
4.1.8ANÁLISIS SENSORIAL 48
4.1.8.1 COLOR 49
4.1.8.2 AROMA 49
4.1.8.3 SABOR 49
4.1.8.4ACEPTABILIDAD 49
4.1.9DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN EL MEJOR TRATAMIENTO 50
4.1.10ANÁLISIS ECONÓMICO 51
4.1.11VERIDICACIÓN DE HIPÓTESIS 51

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES 52
5.2 RECOMENDACIONES 54

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 DATOS INFORMATIVOS 56
6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA 57
6.3 JUSTIFICACIÓN 58
6.4 OBJETIVOS 63
6.4.1 OBJETIVO GENERAL 63
6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 64
6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD 65
6.6 FUNDAMENTACIÓN 65
6.7 METODOLOGÍA 68
6.8 ADMINISTRACIÓN 70
6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN 71
7. BIBLIOGRAFÍA 72

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS **PÁGINA**

Tabla 1. Análisis próximo de la cascarilla de arroz en diferentes variedades y por diferentes países 3
Tabla 2. Características químicas de la cascarilla de arroz a nivel mundial 4
Tabla. 3. Análisis próximo de la cascarilla de arroz en Colombia 5
Tabla 4. Análisis químico de la composición de la cascarilla de arroz en Colombia 5
Tabla 5.Desaprovechamiento de la cascarilla de arroz 39
Tabla 6.Degradación enzimática de la hemicelulosa para la obtención de una bebida alcohólica 40
Tabla 6.7.1 Modelo Operativo (Plan de acción) 68
Tabla 6.8.1 Administración de la Propuesta 69
Tabla 6.9.1 Previsión de la Evaluación 70

RESUMEN

El desaprovechamiento de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), en Ecuador ha sido el principal motivo de realización de este estudio.

La cascarilla de arroz es biomasa lignocelulósica que en su composición físico química están presente polisacáridos, lignina, celulosa, hemicelulosa y otros componentes. De aquí parte el interés por aprovechar este material como materia prima principal en la elaboración de una bebida alcohólica, a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa, misma que se encuentra en pocas cantidades en la cascarilla de arroz.

Para lograr una degradación eficiente de hemicelulosa, la cascarilla es sometida a un pre-tratamiento que consta de un proceso de delignificación, es decir, con acción de NaOCl (6,25%) durante 2 horas; 100 rpm; 30°C para liberar la celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en dicho material lignocelulósico.

Para la actuación y verificación de la eficiencia de la enzima GranozymePM2 (hemicelulasa), se realiza una combinación de las variables: Temperatura del medio acuoso (30°C, 35°C y 40°C) y Porcentaje de enzima (1% y 0,5%). Las mismas que según el análisis estadístico se destaca que el mejor tratamiento en cuanto a la obtención del mayor porcentaje de sólidos solubles es a_2b_0 (40°C/1%enzima): 7,83°Brix en un tiempo de 15 días.

A continuación se adiciona el 15% de pulpa de mora para enmascarar el sabor a forraje propio de la cascarilla de arroz en función al volumen del mosto y se lo dispone en recipientes adecuados para iniciar el proceso de fermentación, con la inoculación de levaduras. Durante todo el tiempo del proceso fermentativo se registran cambios de °Brix, pH, acidez (g acido acético/100 ml mosto). A los 22

culmina la fermentación, y a continuación se ejecuta un proceso de decantación de sólidos (primer trasiego) y luego de 15 días se realiza el segundo trasiego, para una posterior pasteurización y carbonatación.

Una vez obtenida la bebida, se realiza análisis sensoriales, y en base a estos resultados se deduce que el mejor tratamiento es el a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), y al 22% de los catadores les agrada el color y aroma de este tratamiento, al 18% de los catadores les agrada el sabor y el 20% aceptan globalmente esta bebida alcohólica, por lo tanto la dosis de enzima utilizada para la degradación enzimática y la temperatura del medio acuoso si influyen sobre estas variables, excepto en sabor.

Para el análisis sensorial se utilizaron 8 catadoressemi-entrenados, alumnos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que aprobaron el modulo de Análisis sensorial (Séptimo y noveno semestre) ya que estos pueden distinguir las características mencionadas en la hoja de catación y un diseño experimental de bloques completos. En el mejor tratamiento se realizan los siguientes análisis: grado alcohólico, análisis microbiológico (recuento total de coliformes, mohos y levaduras y coliformes totales), análisis de proteínas y un estudio económico para el proyecto de investigación en general.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*) TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

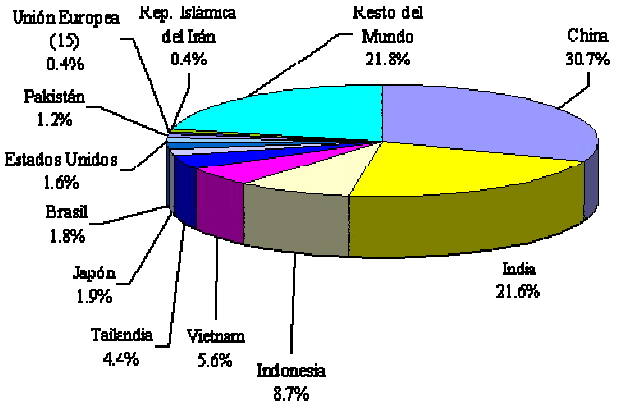
1.2.1CONTEXTUALIZACIÓN.

1.2.1.1MACRO CONTEXTUALIZACIÓN: A NIVEL MUNDIAL

El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, aunque es el más importante del mundo si se considera la extensión de la superficie en que se cultiva y la cantidad de gente que depende de su cosecha. A nivel mundial, el arroz ocupa el segundo lugar después del trigo si se considera la superficie cosechada, pero si se considera su importancia como cultivo alimenticio, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales. Además de su importancia como alimento, el arroz proporciona empleo al mayor sector de la población rural de la mayor parte de Asia, pues es el cereal típico del Asia meridional y oriental, aunque también es ampliamente cultivado en África y en América, y no sólo ampliamente sino intensivamente en algunos puntos de Europa meridional, sobre todo en las regiones mediterráneas. (24)

La producción está geográficamente concentrada pues más del 90% proviene de Asia oriental y meridional. China e India proporcionan más de la mitad del arroz mundial (52,3% de 1999 a 2003), pero es también cierto que estos dos países contienen más de la tercera parte de la población mundial. Brasil es, delante de Estados Unidos, el primer productor no asiático, siendo Italia el país que ocupa el primer lugar europeo. (25)

Figura 1. Proporción de la producción mundial de arroz cáscara, paddy (media 1999 al 2003)



Fuente: UNCTAD según los datos estadísticos de La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (25)

La evolución de la producción mundial muestra un crecimiento notable y bastante regular. Este aumento se debe casi exclusivamente al aumento de la producción en Asia meridional y oriental. (25)

Sin embargo, en el interior de este conjunto la evolución no es homogénea. Generalmente la producción asiática crece, con excepción de Japón. La disminución de la producción asiática , lo que era considerada al final de los años 1990 no más que un epifenómeno, comienza a afectar a ciertos países como China, el primer productor mundial, a raíz de una reducción de la áreas arroceras por causa de la escasez del agua y la competición de los oleaginosos más lucrativos. Sin embargo, a pesar de eso, la producción de arroz sigue siendo vital en todos los países de la región. (25)

1.2.1.1.1 ANÁLISIS APROXIMADO DE LA CASCARILLA DE ARROZ

La composición inmediata de una sustancia es el contenido (porcentaje en masa) de carbono fijo, volátiles, humedad y cenizas. (27)

Tabla 1. Análisis próximo de la cascarilla de arroz en diferentes variedades y por diferentes países.

Parámetros	Canadá				California		China
	V_1	V_2	V_3	V_4	V_i	V_T	V_1
Material Volatil	66,40	67,30	63,00	67,70	63,52	65,47	51,98
Carbono Fijo	13,60	13,90	12.40.	14,20	16,22	45,86	25,10
Ceniza	20,00	18,80	24,60	18,20	20,26	48,67	16,92
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,00	100,0	100,00

Fuente: http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf (2007)

1.2.1.1.2 COMPOSION FISICO QUIMICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

Uno de los elementos que apropia la combustión de cascarilla de arroz es la celulosa $(C_6H_{10}O_5)n$ siendo el componente principal de las fibras de este subproducto agrícola. (27)

Tabla 2. Características químicas de la cascarilla de arroz a nivel mundial

Parámetros	Canada				California		China
	v_1	v_2	v_3	v_4	V_i	V_2	V_1
Celulosa	29,20	33,47	25,89	35,50	-	-	-
Hemicelulosa	20,10	21,03	18,10	21,35	-	-	-
Lignina	20,00	18,80	24,60	18,20	-	-	-

Fuente: http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf, (2007)

Nomenclatura Utilizada

V1, V2, V3, V4 = Variedades de cascarilla de arroz.
VT = Tallo de cascarilla de arroz.

Los rangos obtenidos para el análisis químico a nivel mundial corresponden a los siguientes: La celulosa 25.89 – 35.5 %; Hemicelulosa 18.1 – 21.35 % y la Lignina 18.20 – 24.6 %. (27)

1.2.1.2MESO CONTEXTUALIZACIÓN: A NIVEL DE CENTRO Y SUR AMÉRICA

1.2.1.2.1 ANÁLISIS APROXIMADO DE LA CASCARILLA DE ARROZ

La composición inmediata de una sustancia es el contenido (porcentaje en masa) de carbono fijo, volátiles, humedad y cenizas, en la Tabla 1 y 2 se muestra el análisis próximo de la cascarilla de arroz. Los volátiles tienen un papel importante durante la ignición en las etapas iniciales de la combustión de la biomasa. (27)

En la tabla 1, se observa claramente que el porcentaje de carbono fijo se encuentra entre 12.40 – 25.10%, Las cenizas entre 16.92 – 24.6 % y el material volátil entre51.98 – 67.7 % para las diferentes variedades utilizada. El análisis próximo

de la cascarilla colombiana tabla 2, está dentro de los rangos encontrados a nivel mundial, teniendo mucha similitud con los resultados obtenidos por la Universidad de California. (27)

Tabla. 3 Análisis próximo de la cascarilla de arroz en Colombia

Elemento	%
Carbono fijo	16,67
Cenizas	17,89
Volátiles	65,47

Fuente: http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf, (2007)

1.2.1.2.2 COMPOSION FÍSICO QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

La composición química de la cascarilla colombiana presenta un porcentaje de celulosa un poco mayor lo que es muy bueno por su aporte en la combustión, (Tabla 3) pero la Lignina se encuentra dentro del rango obtenido a nivel mundial (Tabla 2). (27)

La lignina cuando es sometida a altas temperaturas desarrolla una propiedad aglomerante en la cascarilla de arroz, transformándola en una pasta sólida "Grumo de cascarilla al rojo vivo" difícil de romper. (27)

Tabla 4. Análisis químico de la composición de la cascarilla de arroz en Colombia.

Elemento	%
Fibra (celulosa)	39,05
Lignina	22,8
Proteínas	3,56
Extracto no nitrogenado	6,6
Extracto con éter	0,93

Fuente: http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf, (2007)

En el caso particular colombiano, el sector arrocero, genera cerca de dos

millones de toneladas de residuos lignocelulósicos al año, dentro de los cuales se encuentran el tamo y la cascarilla de arroz. Específicamente, la cascarilla esta compuestas por lignina (20 - 25 %), celulosa (35 – 40 %) y hemicelulosa (15 - 20 %), por lo que se considera un sustrato adecuado para la producción de etanol, dada su disponibilidad y su relativo bajo costo (18).

En Uruguay, por cada tonelada de arroz que se procesa, se extrae un 20%-22% de cáscara que tiene usos muy limitados localmente. Una parte de este residuo es vendida a las cementeras del departamento de Lavalleja, que lo utilizan como combustible en sus plantas y las cenizas se inyectan en el portland, lo que contribuye a que el producto final sea más liviano y resistente. Cantidades menores se colocan en los criaderos avícolas, que usan la cascarilla para hacer las camas de los pollos. Finalmente, otra parte de la cáscara extraída de la molienda actualmente se quema para generar vapor en la planta de Arrozur, en donde se produce el arroz parboiled y el aceite de arroz (19).

1.2.1.3 MICRO CONTEXTUALIZACIÓN: A NIVEL DE ECUADOR

El arroz es el cultivo más extenso del Ecuador, ocupa más de la tercera parte de la superficie de productos transitorios del país. Según el Censo Nacional Agropecuario del 2002, el arroz se sembró anualmente en alrededor de 340 mil hectáreas cultivadas por 75 mil unidades de producción agropecuarias, las cuales el 80% son productores de hasta 20 hectáreas. (20)

No solo en términos sociales y productivos el cultivo del arroz es la producción más importante del país, sino también en términos calóricos la gramínea es la que mayor aporte de calorías brinda de todos los cereales (FAO). (20)

Los sistemas de manejo de la producción arrocera dependen de la estación climática, zona de cultivo, disponibilidad de infraestructura de riego, ciclo vegetativo, tipo y clase de suelo niveles de explotación y grados de tecnificación. (20)

De acuerdo a los datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca del Ecuador y el Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria, para el año 2009 de superficie disponibles señalan aproximadamente 371 mil hectáreas sembradas de arroz en el territorio nacional. La tendencia es más bien decreciente en cuanto a esta variable, se detecta claros picos de siembra en el 2004 y 2007 con casi 433 y 410 mil hectáreas respectivamente (INEC). (20)

De forma correspondiente a la superficie sembrada, la producción de arroz también ha tenido una baja desde 2007 cuando se produjo aproximadamente 1.73 millones de toneladas métricas de arroz paddy, este año se alcanzará las 1.37 millones de TM (INEC–2007, MAGAP–SIGAGRO-2009). (20)

En el período 2005 a 2009 se registran decrecimientos promedio anuales de 2.8% en superficie sembrada y de 4.2% en producción. Si el análisis se realiza para el último trienio, la superficie casi no varía mientras que la cantidad producida de arroz decrece anualmente en 2% en promedio (INEC–2005-2008, MAGAP–SIGAGRO- 2009). (20)

La mayor área sembrada de arroz en el país está en la Costa, pero también se siembra en las estribaciones andinas y en la Amazonía pero en cantidades poco significantes. Apenas dos provincias, Guayas y Los Ríos, representan el 83% de la superficie sembrada de la gramínea en el Ecuador. Otras provincias importantes en el cultivo son Manabí con 11%, Esmeraldas, Loja y Bolívar con 1% cada una; mientras que el restante 3% se distribuye en otras provincias. (20)

En cuanto a la producción, de forma correspondiente, Guayas y Los Ríos tienen el 47% y 40% respectivamente. Manabí el 8% y las restantes provincias productoras representan producciones menores y por tanto, su rendimiento también es más bajo que las principales zonas productoras. (20)

1.2.2. ANÁLISIS CRÍTICO.

En nuestro país se han estado introduciendo en los últimos años bebidas alcohólicas tipo coctel de diferentes sabores, a las cuales se ha adicionado anhídrido carbónico, para crear una sensación de frescura en el consumidor y astringencia producida por el gas en el paladar, lo cual ha resultado muy exitoso para las empresas productoras de bebidas alcohólicas, pero, no se ha tomado en cuenta que este tipo de productos deja una sensación de regusto (sabor amargo que perdura por varios minutos en la boca), lo cual puede deberse a que este tipo de bebidas no son elaboradas con productos naturales, sino mas bien con aditivos químicos, los cuales a la larga afectan la salud del consumidor. (6)

El presente trabajo de investigación, está orientado hacia la producción de una bebida alcohólica espumante a partir de la degradación enzimática de un componente (hemicelulosa) presente en materia prima natural (cascarilla de arroz)sin la adición de aditivos que atenten contra la salud del consumidor, de esta manera tratando de abaratar costos.

Con los procesos tecnológicos actuales tenemos una clara idea de todos los tratamientos que podemos realizar en un alimento cualquiera, mediante su transformación con lo cual prolongamos la vida útil que en muchos casos en estado natural es corta, incentivando a los productores agroalimentarios mejoren sus ingresos económicos, ya que en los últimos tiempos se evidencia un déficit en la economía nacional en cuanto se refiere a la agricultura.

1.2.2. EL ÁRBOL DE PROBLEMAS.

Esquema 1.- El árbol de problemas

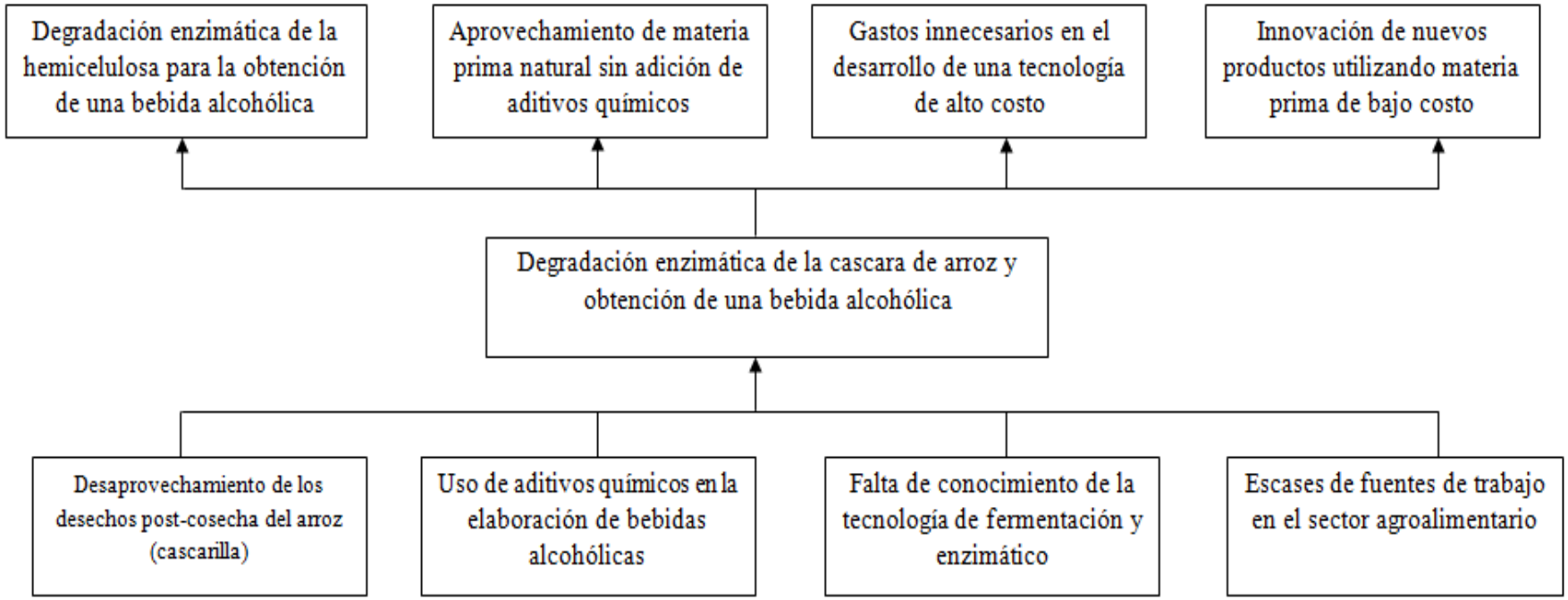


Gráfico No. 1: El árbol del problema

Elaborado por: Collaguazo Paulina, 2011

CAUSA (V.I.): Desaprovechamiento de la cascarilla de arroz

EFECTO (V.D.): Degradación enzimática de la hemicelulosa para la obtención de una bebida alcohólica.

1.2.3. PROGNOSIS.

Siendo el caso de no ejecutar el presente trabajo de investigación, se limitan las fuentes de consulta, no siendo benéfico para otras personas que son razón y fundamento de toda investigación; el ser humano necesita tener a su alcance nuevos elementos para su bienestar, por ello el trabajo planteado. Además se está limitando el campo de estudio acerca de la utilización de enzimas que degradan hemicelulosa (GRANOZYME PM2) para la obtención de azúcares fermentables, y un posterior proceso fermentativo.

Además de esta manera se contribuye con el cuidado de la salud del consumidor, tratando en lo posible de excluir del proceso de fabricación de bebidas alcohólicas los aditivos químicos y reemplazarlos por productos naturales que son desaprovechados durante procesos postcosecha del arroz, como es el caso de la cascarilla de arroz, que prácticamente se convierte en la quinta parte del volumen del cereal que compran.

Con el presente proyecto de investigación se logra adoptar el enfoque de producción en armonía con el medio ambiente sin perturbar el entorno y ofrecer una alternativa de autoempleo a nivel familiar, local y/o regional, que eleve el nivel de vida, y se traduzca en mayores ingresos que impacten en la nutrición, alimentación y arraigo en las comunidades rurales.

1.2.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Cómo se obtiene una bebida alcohólica a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz?

1.2.5. INTERROGANTES

¿De qué manera se aprovechara la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) en el sector agroalimentario?

¿En qué magnitud el enzima Hemicelulasa (GRANOZYME PM2), degradara la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)?

¿Influye la concentración de enzima que se utiliza para degradar hemicelulosa, en la obtención de azúcares fermentables?

¿Cuál será el nivel de aceptación de la bebida alcohólica carbonatada de acuerdo a las cataciones realizadas?

1.2.5. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Categoría: Bebidas
Sub categoría: Bebida alcohólica carbonatada
Área: Tecnología de bebidas alcohólicas carbonatadas
Sub área: Fermentación

Delimitación Temporal:

El presente estudio se realizó desde diciembre del 2010 hasta abril del 2011.

Delimitación Espacial:

El presente estudio fue ejecutado en la Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos - Laboratorios de Biotecnología, Microbiología, Procesamiento.

1.3. JUSTIFICACIÓN.

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato hidropónico. Entre sus principales propiedades físico-químicas tenemos que es un sustrato orgánico de baja tasa de descomposición, es liviano, de buen drenaje. (22)

La importancia socio-económica del arroz para las regiones productoras, demandan mayor atención en todas las actividades orientadas a incrementar en el sector campesino productor de arroz (*Oryza sativa*). Ante este panorama, es necesario ensayar nuevas alternativas, para el aprovechamiento del subproducto de la cosecha del arroz (cascarilla), específicamente de la composición química que esta posee, en la elaboración de una bebida alcohólica, la misma que puede ser aplicada tanta a pequeña como a gran escala.

El estudio demostrara al sector industrial otras alternativas para elaborar nuevos productos, con materia prima autóctona de nuestra región que tiene un bajo costo y la tecnología de fermentación es relativamente de baja inversión y produce altas ganancias, tomando en cuenta principalmente la salud del consumidor, es decir, sustituir aditivos químicos por naturales y mejorar la calidad de vida, fomentando el desarrollo de la localidad.

Cabe destacar que la investigación es factible a nivel tecnológico debido a que se dispone de materia prima y por ende se asegura el éxito de las industrias y del micro empresario que deseen adoptar esta tecnología. Sustenta la idea de aprovechar los subproductos agrícolas con el fin de generar un producto biotecnológico. Es una tecnología fácil de implementar y puede convertirse en una fuente secundaria de ingresos económicos, de esta manera se evitará la migración de campesinos a ciudades potenciales económicamente.

De esta manera se promueve la organización social y se logra el desarrollo de pequeñas empresas para satisfacer la demanda del mercado local y regional, además de que se promueve la generación de empleos directamente para los socios de la microempresa.

1.4 OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la tecnología para la obtención de una bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación de la cascarilla de arroz tratada enzimáticamente con hemicelulasa (Granozyme PM2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aplicar un método enzimático a la cascarilla de arroz para su aprovechamiento biotecnológico.
- Obtener una bebida alcohólica carbonatada a partir de la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz.
- Determinar el grado alcohólico del producto obtenido.

- Identificar el grado de aceptabilidad de la bebida alcohólica carbonatada mediante un análisis sensorial.
- Desarrollar un estudio económico para verificar la factibilidad del proyecto de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Al revisar investigaciones que servirán se soporte al presente estudio se puede citar los trabajos realizador en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, acerca de la elaboración de bebidas alcohólicas usando tratamientos enzimáticos:

Estudios muestran la intervención de los preparados enzimáticos en la producción de vino de mora de Castilla (*Rubus glaucus Benth*) mejora el rendimiento del vino y ayuda también en la clarificación, facilitando la liberación del zumo con la degradación de la pectina, esto se puede observar claramente en los valores de absorbancia, mientras que los vinos obtenidos con Vinozym-L tienen los valores más bajos de absorbancia, lo cual indica que la enzima actúa sobre la clarificación del vino. También menciona que el preparado enzimático ayuda a descomponer selectivamente los polisacáridos del hollejo, liberando los valiosos compuestos del color y aroma responsables del bouquet del vino. (6)

Otra investigación establece una tecnología para la obtención de una bebida alcohólica a partir de maíz (*Zea mays* variedad *Morochon*) usando tratamientos enzimáticos, concluyendo que al trabajar con fungamyl 2500BG utilizando un 0,06% del peso requerido para malta y jora, se reducen notablemente los tiempos de reacción , de 150 minutos para malta y jora y 75 minutos para fungamyl 2500BG, así como se incrementa el porcentaje de desdoblamiento de almidones, para malta y jora de un 72% al 90% para fungamyl 2500BG. (11)

Cabe resaltar que en la misma institución no se han encontrado investigaciones en las que utilicen cascarilla de arroz como materia prima para la obtención de una bebida alcohólica a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en dicha materia.

En fuentes bibliográficas revisadas por internet; en un artículo publicado registra que en Colombia, en la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Programa Ingeniería de Alimentos, en el Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería publica el articulo técnico:"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ PRETRATADA CON NaOCl, MEDIANTE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS", evalúan la obtención de etanol desde cascarilla de arroz por medio de un proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas, que se realiza sobre cascarilla de arroz pre tratada con NaOCl en un proceso de delignificación química. (10)

De aquí se obtuvieron los siguientes resultados:

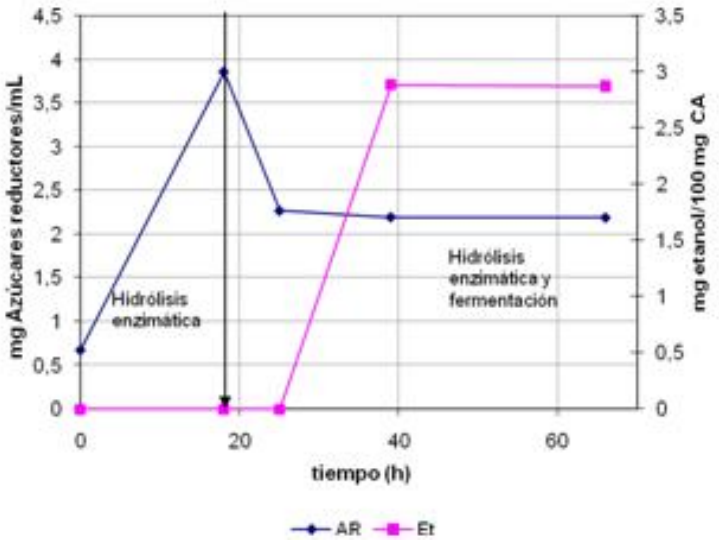


Figura 2. Consumo de azúcares reductores y producción de etanol a partir de cascarilla de arroz, 2009. (10)

2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

El presente estudio tiene un fundamento de carácter académico científico con clara predisposición dialéctica en la que predomina en análisis, la síntesis, la inducción y la deducción.

Es análisis porque permite desglosar las partes del tema investigativo y someterlo al crisol de la ciencia. Es sintético por cuanto se abstrae el conocimiento para poder llegar a generalizaciones. Es inductivo porque vamos de lo particular a lo general en el proceso de investigación; y por último es deductivo por cuanto en algunas etapas de la investigación hemos iniciado de lo general a lo particular.

Por lo tanto, se pretende buscar posibles soluciones para evitar el desaprovechamiento de la cascarilla de arroz en el sector agroalimentario, implementando nuevas tecnologías con la finalidad de mejorar la calidad de una bebida alcohólica y posiblemente elaborarla como una bebida tradicional.

2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL.

Para una correcta investigación, lo recomendable es basarse en documentación legal:

- (INEN 0350:78) Bebidas alcohólicas. Ensayo de catado

Durante el proceso de fermentación se aplicaron los siguientes métodos de análisis:

- Determinación De Sólidos Solubles: Comelius Ough, (1996) “Tratado básico de enología” (ANEXO A-1)
- Determinación de pH: Cornelius Ough, (1996) Tratado básico de enología y legislación vigente sobre los métodos oficiales de análisis de vinos.(ANEXO

A-2)

- Determinación de acidez total: CARBONELL Mater, 1970. “Tratado de vinicultura”. Primera Edición. Editorial AEDOS. Barcelona-España. Pp. 30-53, 41, 159-168.(ANEXO A-3)
- Análisis microbiológico: http://www.3M.com/microbiology (ANEXO A-4)
- Determinación grado alcohólico: Carbonell Mater, 1970. “Tratado de vinicultura”.(ANEXO A-5)

2.4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El perfil de investigación tiene una fundamentación técnica porque es necesario que se optimice la utilización de instrumentos y herramientas de laboratorio, reactivos.

2.4.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.

Los materiales lignocelulósicos tienen tres componentes fundamentales, los polisacáridos, la lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular.

2.4.1.1 Polisacáridos

El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos. (28)

2.4.1.1.1 Celulosa

La celulosa, componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de

madera, es un polímero lineal de β-D-Glucosa con un peso molecular de aproximadamente 500.000. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β-(1,4). El número de azúcares de cadena (grado de polimerización G.P.), varía en los diferentes materiales celulósicos. (28)

2.4.1.1.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas están constituidas por polímeros de unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. (28)

2.4.1.1.3 Lignina

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada. (28)

2.4.1.1.4 Otras sustancias

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros.

Los componentes solubles en solventes neutros, representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

Las cenizas, son residuos inorgánicos que permanecen después de quemar la

biomasa a altas temperaturas, suelen ser menos del 2% de peso seco de la madera. (28)

2.4.2. EL ARROZ

2.4.2.1. ESTRUCTURA DEL GRANO DE ARROZ

El fruto del arroz es una cariópside en la cual la semilla única esta fusionada con la pared (pericarpio) del ovario maduro, formando un grano en forma de semilla. La cariópside está rodeada por la lemma y la palea. Entre las variedades, la cariópside del arroz varia ampliamente en forma y tamaño. La semilla de arroz madura se cosecha como un grano cubierto (arroz bruto) en el cual está encerrada la cariópside. (17)

Anatomía del grano de arroz

Los componentes principales del grano de arroz son la vaina, la cubierta de la cariópside, endospermo y embrión. (17)

Corteza

La cariópside del arroz está rodeada por una corteza (cascara) compuesta de dos hojas modificadas, la pálea y una lemma más grande. La pálea y la lemma se mantienen unidas por estructuras en forma de gancho (Bechtel y Pomeranz, 1978). Las células de la corteza madura están altamente lignificadas y son frágiles, y contienen grandes concentraciones de sílice, quizá en las células epidérmicas externas. (17)

Cubierta de la cariópside

Rodeando el endospermo de la cariópside del arroz maduro, pero dentro de la corteza se encuentran tres capas distintas que forman la cubierta de la cariópside-el pericarpio, la cubierta de la semilla y la nucela.

La cubierta de la semilla esta debajo del pericarpio. Limitando la cutícula de la cubierta de la semilla esta otra cutícula gruesa de las células nucleares comprimidas. (17)

Endospermo

El endospermo consta de:

- Una capa de aleurona que forma la capa más externa del tejido del endospermo. El número de capas de aleurona presentes depende de su localización en el grano, la variedad y los factores ambientales. La capa de aleurona es rica en fosforo, magnesio y potasio.
- Un endospermo de almidón, que consta de células de parénquima de pared delgada, por lo general alargadas radialmente y con una gran carga de gránulos de almidón compuestos y algunos cuerpos proteínicos. (17)

Embrión

El embrión o germen es muy pequeño y se localiza en el lado ventral de la cariópside. Contiene las hojas embrionarias (plúmula) y la raíz embrionaria primaria (radícula), que están unidas por un tallo muy corto (el mesocotilo). La plúmula está rodeada por una cubierta protectora en forma de cilindro, el coleoptilo, y la radícula está rodeada por una masa de tejido blanco, la caleorriza. La superficie externa del embrión está rodeada por la capa de aleurona. El coleoptilo está rodeado por el escutelo y el epiblasto. El rastro vascular del coleoptilo esta fusionedo con las partes

laterales del escutelo. (17)

2.4.3 LA CASCARILLA DE ARROZ

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato hidropónico. Entre sus principales propiedades físico-químicas tenemos que es un sustrato orgánico de baja tasa de descomposición, es liviano, de buen drenaje, buena aireación y su principal costo es el transporte. (22)

La cascarilla de arroz es el sustrato empleado para los cultivos hidropónicos bien sea cruda o parcialmente carbonizada. El principal inconveniente que presenta la cascarilla de arroz es su baja capacidad de retención de humedad y lo difícil que es lograr el reparto homogéneo de la misma (humectabilidad) cuando se usa como sustrato único en camas o bancadas. (22)

El incremento en la Agricultura e Industrialización particularmente en el sector alimenticio resulta en una abundancia de materiales de desecho. La mayoría de estos materiales contienen grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa y lignina, tales como: aserrín, paja de arroz, hojas de caña, desechos de algodón, pulpa de café, etc. (22)

En la Tabla 2, se aprecian los rangos obtenidos para el análisis químico a nivel mundial corresponden a los siguientes: Celulosa 25.89 – 35.5 %; Hemicelulosa 18.1 – 21.35 % y la Lignina 18.20 – 24.6 % (27)

2.4.4 ENZIMA

2.4.4.1 DEFINICIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones químicas del metabolismo celular ocurran a una velocidad significativa en condiciones ambientales extremadamente suaves, compatibles con la mantención de la viabilidad celular. El uso de enzimas con propósitos tecnológicos presupone hacer de estos catalizadores fisiológicos catalizadores de proceso, capaces de transformar materias primas en productos con valor agregado. (7)

Las enzimas son largas cadenas de aminoácidos, ligados mediante enlaces peptídicos. Están presentes en todas las células vivas donde realizan una función vital, controlando los procesos metabólicos, mediante los cuales los nutrientes se convierten en energía y fuente de nuevas estructuras celulares. (13)

En cierto modo, las enzimas son catalizadores ideales, dada su elevada especificidad, alta eficiencia en la conversión sustrato-producto y elevada actividad en condiciones ambientales moderadas, lo que les abre una amplia gama de posibilidades de aplicación.

A comienzos de la década del 60 puede estimarse que más del 70% del mercado mundial de enzimas está constituido por enzimas extraídas de plantas y órganos animales. En la actualidad la situación se ha invertido representando las enzimas microbianos alrededor del 75% del mercado. Del restante 25% un alto porcentaje corresponde a la quimosina o renina de cuajo, amilasas de cereales germinados y proteasas de origen vegetal. (7)

Actualmente las enzimas son empleados en su mayor parte como catalizadores en procesos industriales, el uso de enzimas como catalizadores en procesos

industriales es sin duda el rubro de mayor significación económica, representando más del 80% del volumen de ventas del sector a escala mundial. (7)

2.4.4.2. APLICACIONES COMO CATALIZADORES EN PROCESOS INDUSTRIALES

Existen una gran variedad de enzimas disponibles comercialmente que difieren en la fuente biológica, actividad, pureza, forma física y características tales como pH y temperatura óptima. (19)

El uso de enzimas con fines industriales incluye tanto aquellos casos en que la enzima es empleado en calidad de aditivo para modificar alguna propiedad funcional de un producto, como aquellos en que la enzima es utilizado como catalizador de proceso para fabricar un producto derivado de la acción enzimática sobre una cierta materia prima. (7)

Frente a las variadas alternativas de biotransformación, los procesos enzimáticos ofrecen las ventajas de alta especificidad y eficacia en la conversión de sustrato-producto (en una fermentación rara vez mas del 15% del sustrato es convertido en producto; en una reacción enzimática la transformación puede aproximarse al 100%). Sin embargo, estas ventajas deben contraponerse con el costo de obtención de la enzima desde el sistema celular que la produce. (7)

2.4.4.3. ENZIMA HEMICELULASA

Las hemicelulasas son enzimas que catalizan la conversión (a veces denominada sacarificación) de las hemicelulosas de la biomasa vegetal para obtener sus pentosas componentes (azúcares con 5 átomos de carbono). (24)

La enzima hemicelulasa que impurifica algunas celulasas puede utilizarse para

degradar pentosanos de harina de trigo con objeto de mejorar la calidad del pan; de forma similar, hemicelulasas presentes como impurezas en las pectinasas comerciales se emplean para licuar el mucílago en la preparación del café. Las enzimas hemicelulasas comerciales provienen de *Aspergillus* spp y también contienen xilanasas, mananasas y arabinofuranasas. (5)

GRANOZYME PM2, es el nombre comercial de la Enzima hemicelulasa que la Empresa GRANOTEC ha facilitado, en una muestra de 50 gramos para el proyecto.

Esta enzima, es una preparación de enzima hemicelulasa para tratamientos de harina de trigo. Esta enzima se obtiene a partir de cultivos específicos de *Aspergillus niger.*

Descripción

Polvo de color beige claro con olor aromático de libre fluidez.

Composición

Enzima hemicelulasa estandarizada, harina de trigo, almidón, carbonato de calcio y fosfato tricalcico como excipientes.

Especificaciones

Humedad	Máximo 10%
pH	7,0-9,0

GRANOZYME PM2contiene una actividad enzimática mínima declarada de 2500 FxU/g que corresponde a la actividad de enzima que libera una cantidad de xilanasa durante la reducción de los grupos equivalentes a 1 µ mol/min de xilanasa a 30°C bajo condiciones estándar utilizando el método de hidrólisis. (ANEXO H-1)

2.4.4.4 FERMENTACION ALCOHÓLICA

El esquema de la transformación del mosto en vino es complejo. En el pasado, antes de los descubrimientos de Pasteur, se interpretaba la fermentación como un proceso espontaneo del mosto como materia orgánica.
Pasteur demostró que la Fermentación se produce por medio de las levaduras cuando estas viven sin aire y transforman la glucosa del azúcar del mosto del que se nutren en alcohol y gas carbónico. (12)

La reacción esquemática podría ser la siguiente:

$$C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_6O + 2CO_2$$

Glucosa alcohol gas carbónico

En realidad se cumple al 90%, pero el hecho es muy complejo y además de alcohol y gas carbónico se obtiene un gran número de sustancias: ácidos, alcoholes, aldehídos, etc., algunos en cantidades mínimas.

2.4.5 CARBONATACIÓN

Hay dos aplicaciones diferentes para la carbonatación de bebidas:

- Bebidas suaves carbonatadas con contenido de dióxido de carbono de 5 a 8 g/l.
- Bebidas no carbonatadas o con una ligera carbonatación, de hasta 1 g/l, para realzar el perfil de sabor y la sensación en la boca.

Para bebidas suaves carbonatadas, el nivel de carbonatación es un parámetro clave de calidad. Los productores exigen una inyección precisa de CO2 y una alta consistencia en el producto envasado. (32)

La tendencia hacia ingredientes naturales y mayor contenido de jugo en bebidas suaves deja a los productos más susceptibles a contaminación microbiana. Esto requiere una rigurosa higiene en la planta y que todo el proceso pueda ser limpiado con efectividad en el sitio.

La dosificación de bajas cantidades de CO_2 en bebidas no carbonatadas, para crear una experiencia excitante para el paladar, es parte del tratamiento aséptico. El gas estéril es inyectado en la bebida pasteurizada antes del envase en cartones asépticos o en otros contenedores, todo bajo condiciones asépticas. (32)

El sistema de carbonatación en línea de Tetra Pak consta de mezcladores higiénicos, que crean micro burbujas, garantizando la disolución total del gas en el producto. No utiliza discos porosos ni velas de calentamiento para la dispersión del gas. (32)

2.4.6 ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas humanos que utilizan los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído para medir las características sensoriales y la aceptabilidad de los productos alimenticios, y de muchos otros materiales. No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir o reemplazar la respuesta humana; por lo tanto, la evaluación sensorial resulta un factor esencial en cualquier estudio sobre alimentos. (20)

La información sobre las características sensoriales específicas de un alimento requiere pruebas orientadas al producto. La identificación y medición de las propiedades sensoriales es factor esencial para el desarrollo de nuevos productos alimenticios, etc. Este tipo de información cuantitativa orientada al producto, se obtiene llevando a cabo evaluaciones sensoriales en el laboratorio, con paneles entrenados. (20)

En las pruebas orientadas hacia el producto, se emplean pequeños paneles entrenados que funcionan como instrumentos de medición. Las pruebas sensoriales producirán resultados confiables solamente si se ejerce un control experimental adecuado en todas las etapas de su proceso. (20)

2.5. HIPÓTESIS.

Ho: La degradación enzimática de hemicelulosa es efectiva
Hi: La degradación enzimática de hemicelulosa no es efectiva

FACTOR A

Ho:	a0=a1=a2	Ho= El efecto de las temperaturas en la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), es el mismo
Hi:	a0≠a1≠a2	Hi= El efecto de las temperaturas en la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), no es el mismo

FACTOR B

Ho:	b0=b1	Ho= El efecto del porcentaje de enzima utilizada en la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa)* es el mismo
Hi:	b0≠b1	Hi= El efecto del porcentaje de enzima utilizada en la degradaciónenzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) no es el mismo

	INTERACCIÓN A*B	
Ho:	(A*B)ij=0	Ho= El efecto combinado de temperaturas y porcentaje de enzima en la degradaciónenzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) es el mismo
Hi:	(A*B)ij≠0	Hi= El efecto combinado de temperaturas y porcentaje de enzima en la degradaciónenzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) no es el mismo

2.6. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES.

2.6.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Desaprovechamiento de la cascarilla de arroz

2.6.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Degradación enzimática de la hemicelulosa para la obtención de una bebida alcohólica.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE.

El presente trabajo de investigación tiene un enfoque constructivista con un criterio de juicio crítico y propositivo; es constructivista porque los conocimientos y la investigación es fruto de la revisión bibliográfica del autor.

Tiene juicio crítico porque refleja el nivel de conocimiento adquirido en los diferentes semestres que oferta la Facultad y es propositivo porque se registra una solución al problema investigado.

3.2. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN.

Para el desarrollo del presente proyecto de investigación existió sustento bibliográfico, documental y de campo; sustento bibliográfico y documental, de tal manera que se facilitó la recopilación de información referente al tema y así facilitar el desarrollo de la investigación y la comprobación de las hipótesis planteadas; de campo porque el proyecto se elaboró en el lugar en el cual se produce el objeto de estudio.

3.3. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación tiene los siguientes niveles: Exploratorio, Descriptivo, Correlacional o asociación de variables; es exploratorio porque permite desarrollar una tecnología para la elaboración de una bebida alcohólica carbonatada a partir de la cascarilla de arroz tratada enzimáticamente; es descriptivo porque a partir de un análisis sensorial se definirá la mejor formulación; y es correlacional o de asociación de variables porque permite enfrentar o confrontar a la variable independiente con la variable dependiente.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. MATERIA PRIMA

El presente trabajo se realizo utilizando cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), misma que fue adquirida de la ciudad de Guayaquil.

3.4.2. MATERIALES Y REACTIVOS

3.4.2.1. MATERIALES

- Bandejas plásticas y metálicas
- Baldes plásticos y metálicos
- Ollas de acero inoxidable
- Balanza mecánica
- Balanza digital Scienthec 210 x 0.0001g SA 210.
- Recipientes plásticos para fermentación de 6 l.
- Refractómetro MASTER-α rango 0.0~33.0%
- pH metro digital HANNA Hl 208

- Termómetro digital
- Túnel de secado
- Alcoholímetro
- Termómetro
- Vasos de precipitación
- Probetas
- Material de vidrio
- Mangueras plásticas
- Embudo
- Tamiz

3.4.2.2. REACTIVOS

- Solución reguladora estándar buffer pH 4.01 color rojo
- Agua destilada
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- Enzima GRANOZYME PM2 (hemicelulasa)
- Placas Petrifilm Mohos y levaduras, aerobios totales, colifomes fecales.

3.4.3. METODOLOGÍA

3.4.3.1. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*) TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA.

a. Se realiza la limpieza de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)**,** eliminando

materiales extraños como piedras, plástico, entre otros.

b. Luego se procede a realizar un pre-tratamiento que consiste en el lavado de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) con Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6,25% durante un tiempo de 2 horas a 100 rpm y 30°C, para conseguir la liberación de la celulosa de la lignina y la liberación de las hemicelulosas.
c. Posteriormente se lava con abundante agua la cascarilla pre-tratada, con la finalidad de eliminar el NaOCl que penetro en la cascarilla durante el pre-tratamiento.
d. La cascarilla bien lavada y excenta de residuos de NaOCl, es sometida a un proceso de secado a una temperatura de 60°C durante 12 horas.
e. Una vez seca la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), se procede a la molienda de la misma hasta obtener un producto fino (hasta una granulometría de malla 1mm), con el objetivo de disminuir la superficie de contacto con la enzima.
f. El producto obtenido en el paso anterior es disuelto en agua, mediante una relación de 0,5 Kg de cascarilla de arroz molida por 5 litros de agua a una temperatura de 35°C a 40°C y un pH de 7-8; en 6 envases distintos, de tal manera que se tiene los siguientes tratamientos:

a_0b_0: 30°C; 1% enzima
a_0b_1: 30°C; 0,5% enzima
a_1b_0: 35°C; 1% enzima
a_1b_1: 35°C; 0,5% enzima
a_2b_0: 40°C; 1% enzima
a_2b_1: 40°C; 0,5% enzima

g. Dejar la mezcla en reposo, hasta que alcance el máximo de °Brix, manteniéndose la temperatura y pH antes mencionados. Durante este tiempo se realizan y registran los análisis de temperatura, pH y °Brix diariamente.
h. A la mezcla resultante se adiciona 15% de pulpa de mora como saborizante en base al volumen de la mezcla obtenida.
i. Enfriar las mezclas indicadas anteriormente, que serán el medio en el cual se

inoculara la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o levadura utilizada en panificación.

j. Se ajustan los °Brix de cada una de las mezclas (21 °Brix), lo cual se logro adicionando azúcar; una vez ajustados los grados Brix se inocula la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (1g/1 litro de mosto) y fosfato de amonio en proporción 1g/1 litro de mosto. Durante todo el proceso de fermentación se realizan análisis de pH, acidez y grados Brix todos los días. La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente.
k. Cuando los grados Brix han dejado de disminuir se suspende el proceso de fermentación y transcurridos 15 días se realiza el primer trasiego, luego de 7 días se efectúa el segundo trasiego.
l. Una vez finalizado el tiempo del segundo trasiego, se realiza el sulfitado de la bebida (metabisulfito de sodio; 1g/1 litro de mosto) y posteriormente la pasteurización de la bebida alcohólica a 65°C por 30 minutos, para así eliminar los posibles microorganismos indeseables existentes en la misma.
m. Para realizar la carbonatación de la bebida alcohólica, se coloca la bebida en un contenedor grande con una tapa de sello hermético. La relación de bebida y hielo seco es de 1-2 libras de hielo seco por 1 galón de líquido (1 libra = 453gr, 1 galón = 3.73 litros). Se debe asegurar que exista suficiente campo en el contenedor para alojar el hielo seco.
n. Se añade el hielo seco al contenedor. Normalmente, el hielo seco mezclado con el agua generará mucho gas, así que se debe esperar a que el gas se disipe antes de sellar el contenedor.
o. Luego se deja que la bebida y el hielo reposen durante 50 a 60 minutos por cada galón de bebida. El hielo se fundirá y el dióxido de carbono se mezclará con la bebida creando las conocidas burbujas en las bebidas carbonatadas.
p. La bebida se envasa en botellas de vidrio previamente esterilizadas (90°C por 5 minutos).
q. Finalmente se almacenan las botellas a temperatura ambiente, de las cuales se tomaran muestras para realizar el análisis sensorial respectivo.

3.4.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.4.1. GRADOS BRIX

La medición de sólidos solubles se realizan con un Refractómetro MASTER-α rango 0.0~33.0%, para lo cual se colocan de 2 a 3 gotas del liquido a ser analizado sobre el prisma del equipo y se procede a realizar la lectura.

3.4.4.2. pH

Para la determinación del pH se usa un pH metro digital HANNA Hl 208, el cual previo al análisis debe ser calibrado con solución buffer 7 y 4, para análisis en la degradación enzimática y en la fermentación respectivamente. Luego de la calibración, se introduce el electrodo en el líquido en estudio y se toma directamente la lectura.

3.4.4.3. ACIDEZ TOTAL

- Viértase en un vaso de precipitación 10 cc de mosto, medidos con una pipeta
- Se añaden 2-3 gotas de solución de fenolftaleína
- Se vierte gota a gota desde la bureta la solución de Hidróxido de Sodio 0,1N sobre el mosto que contiene el vaso, en continuo movimiento de agitación hasta la aparición uniforme del color rosa del indicador, que demostrara la neutralización de los ácidos del mosto.
- Se toma lectura de los mililitros y decimas gastados de la solución de Hidróxido de sodio 0,1N, este valor se multiplica por 0,49 (factor para expresar la acidez en acido sulfúrico), donde la cantidad resultante es los ácidos contenidos en el mosto y expresados en acido sulfúrico. Para expresar

la acidez total del mosto en acido acético bastara multiplicar el valor de la acidez total sulfúrica por 1.23. (2)

3.4.4.4. GRADO ALCOHÓLICO

Los métodos oficiales están basados en la destilación generalmente. Se determinara la valoración alcohólica en un aparato de vidrio.

Viértase en el matraz de 1 litro, limpio y enjuagado con agua destilada, 200 ml de bebida alcohólica medidos con un matraz aforado a 15°C, de fondo plano, también perfectamente limpio y enjuagado con una misma cantidad de la misma bebida alcohólica.

Lávese por dos veces consecutivas el matraz aforado con unos 100 ml de agua destilada, y viértase ambos contenidos en el balón de destilación.

Instálese el equipo de destilación y compruébese los cierres.
Enciéndase el mechero y procédase a una destilación lenta y suave. El agua de refrigeración ha de ser constantemente fría.

Recójanse los destilados en el mismo matraz aforado; antes, se pondrán unos centímetros cúbicos de agua destilada en el matraz, los necesarios para que el pico final del tubo refrigerante quede sumergido y los primeros destilados, muy ricos en alcohol, no se pierdan parcialmente en la atmosfera. Deténgase la operación en el momento en que se hayan recogido exactamente los 200 ml iniciales.

Los 200 ml de destilado viértanse en una probeta de 300 ml, limpia y seca. Agítese para conseguir la homogenización y déjese luego unos minutos en reposo.

Introdúzcase en la probeta un alcoholímetro contrastado, que aprecie las decimas de grado, perfectamente limpio, acompañándole cogido por el vástago hasta

que flote. Fíjese que el alcoholímetro no roce las paredes de la probeta.

Cuando el alcoholímetro permanezca sin moverse, léase, por la parte inferior del menisco que se forma al ser mojado el vástago por el líquido alcohólico. Anótese la lectura. (2)

3.4.4.5. ANÁLISIS MICROBIOLOGICO: Recuento de Mohos y Levaduras, recuento total de aerobios y recuento total de coliformes.

Los alimentos frescos y muchos alimentos elaborados están contaminados, por lo menos en la superficie, por bacterias, mohos y levaduras, que son la forma de vida microscópica de mayor significación en la descomposición de alimentos. (Trujillo Acela, 1985)

- Esterilizar todos los materiales a utilizar en la siembra.
- Preparar una dilución de la muestra con el agua peptonada.
- Mezclar u homogenizar la muestra mediante los métodos usuales
- Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.
- Con una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 ml de muestra en el centro del film inferior.
- Baja el film superior; deja que caiga, evitando introducir burbujas de aire. No deslizarlo hacia abajo.
- Colocar el aplicador en el film superior sobre el inoculo.
- Con cuidado ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inoculo sobre el área circular. No se debe girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.
- Incubar las placas Petrifilm cara arriba en pilas de hasta 20 placas a temperaturas de: 30 °C durante 48/72 (aerobios totales), 25°C±1°C durante 3-5 días (mohos y levaduras) y 24 horas ≠ 2 horas a 35 °C ± 1 °C (coliformes totales).

- Leer las placas Petrifilm en un contador de colonias standardtipo Quebec o una fuente de luz con aumento. (33)

3.4.4.6. ANÁLISIS SENSORIAL

Para enmascarar el sabor a forraje se adicionó el 15% de pulpa de mora como saborizante; este porcentaje se adicionó en base al volumen de mosto obtenido antes de la fermentación.

El análisis sensorial se lleva a cabo con 8 catadores semi-entrenados, estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que hayan aprobado el módulo de Análisis sensorial (Séptimo y noveno semestres), sexo masculino de edades comprendidas entre 21-23 años. En este caso se evalúa la aceptabilidad, sabor, color y aroma.

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA.

3.5.1 POBLACIÓN.

Para el presente estudio se utilizó como población cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), proveniente del Cantón Durán en la Provincia de Guayas y la enzima Granozyme PM2 adquirida en la empresa GRANOTEC, la cual degrada la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*).

3.5.2 MUESTRA

Se utilizó como población cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), proveniente del Cantón Durán en la Provincia de Guayas la misma que fue seleccionada y lavada con NaOCl como pre tratamiento para delignificar la cascarilla.

También se utilizó la enzima Granozyme PM2, que es una hemicelulasa.

3.5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente nivel de estudio corresponde a un diseño experimental A*B (3*2). Lo que corresponde a 6 tratamientos, que con una réplica dan un total de 12 tratamientos.

Los tratamientos experimentales son la combinación la temperatura del medio en el que la enzima realiza la degradación de hemicelulosay el porcentaje de enzima que se añadió para degradar la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz(*Oryza sativa*).

De esta manera se tiene:

Tabla 1.- Factores y niveles que intervienen en el Diseño Experimental A*B para la evaluación del mejor tratamiento en la "Obtención de una bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) tratada enzimáticamente con hemicelulasa".

Factores o Variables de estudio	Niveles
Factor A: Temperatura del medio acuoso	a_0: 30°C
	a_1: 35°C
	a_2: 40°C
Factor B: Tratamiento enzimático (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2)	b_0= 0,1%
	b_1= 0,05%

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

3.5.3.1. RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Las respuestas experimentales que se analizaron fueron:° Brix, pH, gradoalcohólico, Acidez total (al añadir el jugo de mora como saborizante), Análisis microbiológico, Porcentaje de Proteína.

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

3.5.1 OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE.

Tabla 5. Desaprovechamiento de la cascarilla de arroz

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato hidropónico.	Agroalimentario, para el aprovechamiento de su composición química, en la elaboración de un producto biotecnológico	Ausencia de conocimiento en tecnologías que permitan obtener productos biotecnológicos a bajo costo	¿Cuál será el beneficio para el sector agropecuario al aprovechar este subproducto de la cosecha de arroz?	Análisis visual de inspección

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

3.5.2OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLE DEPENDIENTE.

Tabla 6.Degradación enzimática de la hemicelulosa para la obtención de una bebida alcohólica

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
Bebida fermentada Bebidas obtenidas por fermentación alcohólica de mostos y sometidas a operaciones tales como clarificación, estabilización y conservación.	Fermentación alcohólica	Determinación del grado alcohólico Determinación de acidez total Determinación de pH Determinación de °Brix Análisis sensorial Análisis microbiológico	¿Qué grado alcohólico tendrá el producto final? ¿Cuál será el valor de pH que alcanza la bebida alcohólica tras el proceso fermentativo? ¿Cuál será el valor de °Brix apropiado para esta bebida? ¿Cuál será mejor tratamiento en base a la aceptabilidad del producto?	Brixómetro pHmetro Método propuesto por: Comelius Ough, (1996) "Tratado básico de enología"; Sólidos solubles Métodos propuestos por: Cornelius Ough, (1996) Acidez Análisis sensorial, Cuestionario

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

3.6. PLAN DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

En el presente estudio, la recolección de datos se realizo durante toda la fase experimental, para lo cual se registraron valores de análisis físico-químicos como son: pH, °Brix, acidez total.

Una vez que se adquirió el producto se aplicaron distintas formulaciones para presentación a los catadores y generar una información a través de hojas de evaluación sensorial, para lo cual se utilizo el formato que se presenta en el ANEXO C.

El panel de catación consta de 8 personas.

Luego de la fase experimental se realizo evaluaciones químicas y microbiológicas como: Recuento de mohos y levaduras, determinación de ° Brix, grado alcohólico, porcentaje de proteína. Los mismos que permitieron determinar la calidad del producto terminado.

3.7. PLAN DEPROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

- Revisión detallada y critica de la información.
- Se elaboró tablas comparativas para determinar la degradación de la hemicelulosa en base al alcance del máximo de ° Brix.
- Para el procesamiento de datos se emplearon los paquetes estadísticos Excel e InfoStat, ambos programas disponibles en la Universidad Técnica de Ambato, en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, con la finalidad de establecer conclusiones y recomendaciones en el presente estudio.
- La interpretación de resultados se realizó en base a un análisis de varianza y pruebas significativas de Tukey con la finalidad de establecer el mejor tratamiento.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de las determinaciones realizadas antes y durante del proceso de fermentación se presentan en el Anexo D, donde se logra observar los siguientes análisis: °Brix, pH, acidez total, sensorial, microbiológico, grado alcohólico y proteína.

4.1. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA HEMICELULOSA

4.1.1 Sólidos solubles

En al Tabla D-2, se puede observar la variación de °Brix durante el proceso enzimático, de esta manera se tiene en los 6 tratamientos inician en 0,5°Brix, valor que incrementa de acuerdo al porcentaje de enzima utilizada y temperatura del medio acuoso, manteniendo un pH de 7-8, de acuerdo a la hoja técnica correspondiente a la enzima.

Durante 35 días se ha alcanzado el mayor porcentaje de sólidos solubles en los 6 tratamientos, pero unos en menor tiempo que otros. Tales son las combinaciones de temperatura y porcentaje de enzima que se tiene que: el tratamiento a_0b_1 es el que menos porcentaje de sólidos solubles ha adquiridoen más tiempo de degradación enzimática (4,9°Brix en 35 días), seguido del tratamiento a_0b_0 con 7°Brix en 34 días; el tratamiento a_1b_0 alcanzo 7,53°Brix en 16 días; el tratamiento a_1b_1 con 7,65°Brix en 28 días; continuando con el tratamiento a_2b_1 con 7,73 en 28 días y finalmente el tratamiento que alcanzó un mayor porcentaje de sólidos solubles es a_2b_0 con 7,83°Brix en 15días.

El líquido obtenido en el procesamiento químico, llamado hidrolizado o mosto, presenta una concentración de 20 % de glucosa (25), pero estos autores obtienen este resultado al hidrolizar la celulosa y en este caso se hidrolizó hemicelulosa que es el componente de la biomasa lignocelulósica que se encuentra en menor porcentaje, lo cual se demuestra con los resultados obtenidos.

El Gráfico 1 muestra las curvas de degradación enzimática y varían de acuerdo a la temperatura que se aplicó a los distintos tratamientos y al porcentaje de enzima, es decir, a mayor temperatura y porcentaje de enzima manteniendo un pH en un rango de 7-8 se obtiene mayor porcentaje de sólidos solubles en menor tiempo.

Además en laTabla E-1,se muestran los resultados del Análisis de Varianza para los resultados de Variación de grados Brix, durante el proceso de degradación enzimático de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), indicando que existe diferencia significativa entre los tratamientos principales y la interacción, por lo tanto se realiza la prueba de diferenciación de Tukey que corrobora con un nivel de significancia del 0,05 en la interacción AB, el tratamiento con mayor cantidad de sólidos solubles es el a_2b_0(40°C; 1% enzima Granozyme PM2).

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MOSTO (CON ADICIÓN DE LA PULPA DE MORA), ANTES DE LA FERMENTACIÓN.

Los datos que se presentan en laTabla D-3, son receptados antes de iniciar el proceso de fermentación y después de adicionar la pulpa de mora (15%) como saborizante de la bebida durante el proceso de fermentación.
Los resultados obtenidos corresponden a los análisis de °Brix, pH y acidez total (g de ácido málico/ 100 ml de mosto).

4.3. FERMENTACIÓN DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA

4.3.1 Sólidos solubles

Al analizar la Tabla D-4, se observa que el proceso de fermentación inicia en 22±1°Brix, siendo el tiempo de duración de la fermentación para todos los tratamientos de 22 días; tiempo en el cual se suspende el registro de datos ya que existe constancia en ellos, siendo estos valores: máximo 12,35°Brix y mínimo 10,75°Brix. Esto permite determinar la velocidad de consumo de laos azúcares por parte de las levaduras, durante el proceso fermentativo.

La reducción del contenido de azúcar durante la fermentación es aproximadamente lineal y que la velocidad de fermentación con una cepa de levadura determinada depende de la temperatura que es el medio normal de control de la misma. (16)

En el Gráfico 2, se muestra el decremento de sólidos solubles durante los 22 días debido a la acción de las levaduras que convierten los azúcares en alcohol y CO_2.Las curvas de fermentación son similares, debido a que se utilizo un solo tipo de levadura en todos los tratamientos (*Saccharomyces cerevisiae*).

4.3.2 pH

En la Tabla D-5, se registran datos de variación de pH, durante 22 días de fermentación y se observan leves cambios para todos los tratamientos. Los cambios oscilan entre 4,34- 5,43 como se aprecia en el Gráfico 3.

Los cambios de pH se deben a la dureza del agua y a la adición de los microorganismos sobre los carbohidratos y evidentemente con estos valores de pH, durante la fermentación es posible que se desarrollen microorganismos indeseados. Esto lo corrobora Carbonell (1970), indicando que un pH alto originara un vino propicio a las contaminaciones bacterianas, mientras que con los

valores de pH bajos se consigue rendimientos en alcohol más considerables.

4.3.3 Acides Total (g acido málico/100 ml bebida)

Al analizar la Tabla D-6, se observa que en el proceso fermentativo los valores de acidez en cada uno de los tratamientos no muestran cambios significativos, mismos que al finalizar el proceso son diferentes en cada uno de los tratamientos, estos cambios se debe a la composición de la materia prima, a la disolución del CO_2 en el mosto, de tal manera que produzcan ácidos, que serán neutralizados por las bases que presenta el agua utilizada en la dilución.

De esta manera, en el Gráfico 4 se registran valores finales de acidez total en un rango de 0,44-1,73, los mismos que están expresados como porcentaje de acido acético, valores que comparados con el de una bebida obtenida a base de cereal como la cerveza que es de 0,31% indica que la bebida obtenida en este estudio es medianamente aceptable.

La levadura produce diversos ácidos orgánicos a partir del acido pirúvico a través de diversas rutas bioquímicas metabólicas secundarias a la ruta principal de la fermentación alcohólica. Estos ácidos orgánicos provocan un aumento de la acidez y un descenso de pH. (31)

4.4 GRADO ALCOHÓLICO EN EL MEJOR TRATAMIENTO a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima, 15% pulpa de mora)

En la Tabla D-9, se reportan los valores de grado alcohólico de las 2 replicas del mejor tratamiento a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima, 15% pulpa de mora), 9,1 y 9,7°GL, que de acuerdo a la Norma INEN 360 para bebida alcohólica tipo vino el valor oscila entre 8-18°GL, por lo que se encuentra dentro del rango de una bebida alcohólica, la cantidad de alcohol se produce a partir de los sólidos (azúcares) consumidos por las levaduras.

4.5 CARBONATACIÓN DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA

Mediante el proceso que implica la utilización de hielo seco (1-2 libras de hielo seco por 1 galón de líquido (1 libra = 453gr, 1 galón = 3.73 litros)), no se ha logrado obtener una bebida carbonatada por un tiempo considerable. El CO_2 diluido se mantuvo constante durante un día, lo cual no es beneficio en el trabajo de investigación.

4.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN EL MEJOR TRATAMIENTO a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima, 15% pulpa de mora)

En la Tabla D-8 se registran los resultados de los Análisis microbiológicos (Recuento de aerobios totales (ufc/ml),Recuento de mohos y levaduras(ufc/ml), Recuento de coliformes totales (ufc/ml)) realizados en el mejor tratamiento de la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), notando que existe ausencia de microorganismos ($< 10*10^1$ ufc/ml), lo cual es un indicativo que el tratamiento térmico (65°C/5minutos) y el sulfitado de la bebida son eficaces, cumpliendo la función de inhibir el crecimiento de mohos, levaduras y otros microorganismos perjudiciales para el producto y el consumidor.

4.7 ANÁLISIS SENSORIAL

4.7.1. Color

En la Tabla E-5 se puede identificar, según el análisis de varianza que existe diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel del 0,05 de significancia, corroborando con la prueba de diferenciación de Tukey a un nivel de significancia de 0,05 que el mejor tratamiento es a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), seguido del tratamiento a_2b_0 (40°C; 1% enzima) y continuando con el tratamiento a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima). Estos resultados estadísticos demuestran que el

porcentaje de enzima y la temperatura de degradación de hemicelulosa inciden de alguna manera sobre este atributo sensorial.

En el Gráfico 6, se muestran los porcentajes de aceptabilidad del color de la bebida alcohólica por parte de los catadores; siendo así, al 22% de los catadores les agrada el color del tratamiento a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), al 19% de los catadores les agrada los tratamientos a_2b_0 (40°C; 1% enzima) y a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima), al 18% les agrada el tratamiento a_1b_0(35°C; 1% enzima), al 13% agrada el tratamiento a_0b_1(30°C; 0,5% enzima) y al 9% les agrada el tratamiento a_0b_0 (30°C; 1% enzima).

4.7.2. Aroma

La Tabla E-4, muestra que según el análisis de varianza y la Prueba de diferenciación de Tukey a un nivel de significancia de 0,05, que el mejor tratamiento es el a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima) y en el Gráfico 7, se indica que este atributo del mismo tratamiento es aceptado por el 22% de los catadores, al 21% de los catadores les agrada el tratamiento a_2b_0 (40°C; 1% enzima), al 18% agrada el tratamiento a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima), al 16% les agrada el tratamiento a_1b_0(35°C; 1% enzima), al 12% agrada el tratamiento a_0b_1(30°C; 0,5% enzima) y al 11% les agrada el tratamiento a_0b_0 (30°C; 1% enzima).

4.7.3. Sabor

La Tabla E-3, indica que en el análisis de varianza a un nivel de significancia del 0,05 no existe diferencia significativa entre los 6 tratamientos, es decir, el porcentaje de enzima y la temperatura de degradación de hemicelulosa no inciden sobre este atributo sensorial.

En el Gráfico 8, se indican los porcentajes de aceptabilidad a este atributo por parte de los catadores, siendo así, al 18% de los catadores les agrada el tratamiento a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), al 17% de los catadores les agrada el

tratamiento a_2b_0 (40°C; 1% enzima), al 15% agrada el tratamiento a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima), al 17% les agrada el tratamiento a_1b_0(35°C; 1% enzima), al 16% agrada el tratamiento a_0b_1(30°C; 0,5% enzima) y al 17% les agrada el tratamiento a_0b_0 (30°C; 1% enzima).

4.7.4. Aceptabilidad

La Tabla E-5 reporta resultados del análisis de varianza a un nivel de significancia del 0,05 y denota que existe diferencia significativa entre los tratamientos, lo que se comprueba con la prueba de diferenciación de Tukey, demostrando que el mejor tratamiento es a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), seguido del tratamiento a_2b_0 (40°C; 1% enzima) y continuando con el tratamiento a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima). De esta manera, el porcentaje de enzima y la temperatura de degradación de hemicelulosa inciden de alguna manera sobre este atributo sensorial.

En el Gráfico 5, se registran los porcentajes de aceptabilidad por parte de los catadores a este atributo sensorial, de esta manera se tiene que; al 20% de los catadores les agrada el tratamiento a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), al 19% de los catadores les agrada el tratamiento a_2b_0 (40°C; 1% enzima), al 18% agrada el tratamiento a_1b_1 (35°C; 0,5% enzima), al 16% les agrada el tratamiento a_1b_0(35°C; 1% enzima), al 14% agrada el tratamiento a_0b_1(30°C; 0,5% enzima) y al 13% les agrada el tratamiento a_0b_0 (30°C; 1% enzima).

Al mejor tratamiento se realiza un análisis microbiológico, determinación de grado alcohólico y análisis del porcentaje de proteína.

4.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN EL MEJOR TRATAMIENTO a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima, 15% pulpa de mora)

El porcentaje de proteína fue realizado únicamente para una sola replica del mejor tratamiento puesto que el costo del análisis realizado en el Instituto Nacional

Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) tiene un costo de 45 USD.

De esta manera, se tiene que la bebida alcohólica carbonatada tiene 3,4% de proteínas; valor que tiene concordancia con el valor proteico que tiene la cascarilla de arroz en Colombia (3,56%), determinado mediante un análisis químico (29), a más de ello el porcentaje de proteína también se debe a la pulpa de mora adicionada como saborizante.

4.9. ANÁLISIS ECONÓMICO

Se realizó el análisis de costo de producción (ANEXO F), para determinar la factibilidad de elaboración de la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación de cascarilla de arroz tratada enzimáticamente con Hemicelulasa (Granozyme PM2) y según los resultados obtenidos en la tabla F-6, el costo de venta al público de la bebida obtenida es 2,84$/botella de 500 ml, siendo factible la elaboración de este tipo de bebida ya que este valor sería más bajo si existiese mayor producción.

4.10. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

Según el análisis de varianza realizado para la verificación de la Hipótesis Nula mostrados en la Tabla E-1 se demuestra que existe diferencia significativa a un nivel de 0,05 para la variable a (Temperatura), variable b (% de enzima) y la interacción a*b (Temperatura * Porcentaje de enzima), teniendo como respuesta experimental el porcentaje de sólidos solubles (°Brix);de esta manera se RECHAZA la Hipótesis Nula, lo que quiere decir que la variable temperatura del medio acuoso difiere significativamente sobre el porcentaje de enzima para la degradación de la hemicelulosa y la posterior obtención de azúcares fermentables.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos y de acuerdo a los objetivos planteados se puede concluir lo siguiente:

- Al haber estudiado la tecnología para la obtención de una bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación de la cascarilla de arroz tratada enzimáticamente con hemicelulasa (Granozyme PM2), se obtuvieron resultados alentadores, puesto que se ha logrado degradar hemicelulosa del 4,9% al 7,83% en los tratamientos a_0b_1(30°C; 0,5% enzima) y a_2b_0 (40°C; 1% enzima) respectivamente, obviamente el resto de tratamientos se encuentran dentro del rango mencionado; el rango de porcentajes antes mencionados se toman en cuenta en base al % de sólidos solubles que se obtuvieron durante 35 días, tiempo que se necesito para alcanzar el porcentaje máximo de °Brix.

  Además de ello se utilizó pulpa de mora como saborizante, misma que fue adicionada antes de iniciar el procesado de fermentación en un 15% en relación al volumen de preparado de cascarilla que se tiene, en los 6 tratamientos. Cabe resaltar que para la elaboración de dicha bebida no se requiere de equipo e instrumentos sofisticados y la materia prima está disponible a nivel del Ecuador.

- Se ha aplicado 6 tratamientos o métodos enzimáticos, para degradar la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (Oryza sativa). Estos métodos han permitido aprovechar las cualidades físico químicas de la cascarilla de arroz en la elaboración de bebidas alcohólicas aptas para el consumo humano. En su composición química están presentes polisacáridos, lignina, celulosa, hemicelulosa y otras sustancias. En este caso se ha logrado degradar la hemicelulosa, cuya función es servir de unión entre la lignina y la celulosa, por esta razón es importante realizar un proceso de deslignificación antes de realizar el proceso enzimático, es decir, liberar la lignina, celulosa y hemicelulosa; dicho proceso se logro con NaOCl (6,25%). Para el proceso de degradación enzimática se tomaron en cuenta 2 variables (b: temperatura del medio y a: porcentaje de enzima), cuya combinación da como resultados los siguientes % de sólidos solubles: a_0b_0 (30°C/1%enzima): 7%; a_0b_1 (30°C/0,5%enzima): 4,9%; a_1b_0 (35°C/1%enzima): 7,53%; a_1b_1 (35°C/0,5%enzima): 7,65%; a_2b_0 (40°C/1%enzima): 7,83%; a_2b_1 (40°C/0,5%enzima): 7,73%.

- Se ha obtenido una bebida alcohólica, a partir de la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz, para lo cual se ha utilizado una combinación de variables. Se utilizan las interacciones Temperatura (30°C, 35°C, 40°C)*Porcentaje de enzima utilizada (1%, 0,5%), tomando en cuenta como respuesta experimental los °Brix y para la determinación del mejor tratamiento se realiza un análisis de varianza y la prueba de diferenciación de Tukey con un nivel de significancia del 0,05, determinando que el mejor tratamiento con alto % de °Brix alcanzados es a_2b_0 con 7,83°Brix en 18 días.

  No se logro realizar una carbonatación eficiente debido a que se utilizó hielo seco para este proceso y el CO_2 diluido solo duro 1 día en la bebida alcohólica, no dando el resultado que esperábamos en cuanto al logro de una bebida carbonatada.

- Se ha determinado que el grado alcohólico del producto obtenido, para el

mejor tratamiento (a2b0: es 40°C; 1% enzima) es 9,1°GL y 9,7°GL para la réplica 1 y 2 respectivamente, valores que de acuerdo a la Norma INEN 360, para bebida alcohólica tipo vino oscila entre 8-18°GL, indicando que el producto obtenido esta dentro de las estimaciones normativas. Cabe mencionar que la cantidad de alcohol producido, dependerá de la cantidad de azúcar que consumen las levaduras durante el proceso fermentativo.

- Mediante un análisis sensorial y las respectivos análisis de varianza y prueba de diferenciación de Tukey con un nivel de significancia del 0,05; se deduce que el mejor tratamiento es el a_2b_1 (40°C; 0,5% enzima), y al 22% de los catadores les agrada el color y aroma de este tratamiento, al 18% de los catadores les agrada el sabor y el 20% aceptan globalmente esta bebida alcohólica, por lo tanto la dosis de enzima utilizada para la degradación enzimática y la temperatura del medio acuoso si influyen sobre estas variables, excepto en sabor. Cabe mencionar que para enmascarar el sabor a forraje propio de la cascarilla de arroz se ha logrado adicionando el 15% de pulpa de mora en base al volumen de preparado enzimático que se obtuvo, para los 6 tratamientos.

- Mediante el desarrollo de un estudio económico para verificar la factibilidad del proyecto de investigación, se tiene que el costo de venta al público es 2,84$/botella de 500 ml, siendo factible la ejecución del proyecto, ya que es una valor accesible al público, puesto que el estudio se realizo a nivel de laboratorio, ya a nivel industrial, estos costos disminuirían.

5.2.RECOMENDACIONES

- Realizar un proceso de delignificacion y triturado de la cascarilla de arroz para así liberar las celulosas, hemicelulosas presentes en dicha biomasa lignocelulósica y también aumentar la superficie de contacto con las enzimas.

- Utilizar la enzima Granozyme PM2 en una concentración del 2%, 3% / kg de cascarilla y 40°C para acortar el tiempo de degradación de hemicelulosa.
- Degradar la celulosa para obtener mayores % de sólidos solubles durante el proceso de degradación enzimática.
- Realizar análisis de proteínas de los desechos de la fermentación luego de concentrarlos ya que se los puede usar como enriquecedor proteínico de alimento para animales.
- Realizar un análisis físico químico de la cascarilla de arroz de nuestro país (distintas variedades) y compararlas para así tener fuentes bibliográficas de la geografía ecuatoriana.
- Trabajar con otro tipo de biomasa lignocelulósica para la obtención de una bebida alcohólica.
- No utilizar hielo seco para la carbonatación de la bebida.

CAPITULO VI
PROPUESTA

6.1. DATOS INFORMATIVOS

Tema:"ESTUDIO DE LA TECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*) TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON CELULASA."

Institución ejecutora: Universidad Técnica de Ambato (U.T.A.), a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (F.C.I.A.L.).

Beneficiarios: Productores Agropecuarios del sector arrocero del país y los consumidores de bebidas alcohólicas tradicionales.

Ubicación: Ambato-Ecuador

Tiempo estimado para la ejecución: 4 meses

Inicio: Diciembre del 2010 **Final:** Abril del 2011

Equipo técnico responsable: Egda. Paulina Elizabeth Collaguazo Simbaña, Ing. Mario Paredes MSc., Ing. Mayra Paredes.

6.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Generalmente el desaprovechamiento de la cascarilla de arroz como subproducto de la cosecha del mismo es evidente en el sector arrocero, únicamente lo utilizan como abono para sus cultivos o simplemente lo desechan como un contaminante mas del medio ambiente. Por esta razón se ha visto conveniente aprovechar la cascarilla de arroz como materia prima para la elaboración de una bebida alcohólica, utilizando un equipo mínimo y los principios básicos para obtener un producto de buena calidad organoléptica, a partir de la degradación enzimática de la celulasa presente en dicho componente orgánico.

El uso de los residuos lignocelulósicos como biomasa-materia prima para la producción de alcohol, tiene las siguientes ventajas:

- La celulosa es un recurso abundante y fácilmente disponible que se encuentra en todo tipo de material vegetal incluidos los productos de desecho, como los tallos y las mazorcas de maíz, la pasta de madera, virutas de madera, caña de azúcar, hojas de paja y cascarilla de arroz.
- Es muy barato su costo y más bien solventa un problema de eliminación de residuos.
- El uso de residuos lignocelulósicos reduciría la utilización de almidones y azúcares (Maíz, yuca, papa, remolacha, melaza, etc.), que tendrían una mejor aplicación en la alimentación humana.
- El uso de capacidad productiva no utilizada en agricultura e industria forestal.
- La revitalización de las economías rurales mediante la producción y el procesado local de fuentes de materias primas renovables, y el consiguiente desarrollo más equilibrado entre áreas urbanas y rurales.
- Mayor facilidad para lograr un desarrollo económico ambientalmente sostenible mediante el uso de materias primas renovables y la disminución de las emisiones netas de CO_2 a la atmósfera.(28)

Para lograr la degradación de la celulosa se utiliza las enzimas Celluclast y Viscozyme, que degradaran la celulosa presente en la cascarilla de arroz en azúcares fermentables.

Industrialmente las bebidas alcohólicas tradicionales como la chicha no son muy explotadas, ya que generalmente se consume vinos frutales u otra bebida de alto grado alcohólico. Por lo tanto se ha visto conveniente aportar en el área tecnológica, siendo benéfico para el sector arrocero, para que la cascarilla como subproducto de la cosecha de arroz sea aprovechada al máximo gracias a su composición química en el ámbito alimentario.

6.3JUSTIFICACIÓN

El arroz es el cultivo más extenso del Ecuador, ocupa más de la tercera parte de la superficie de productos transitorios del país. Según el Censo Nacional Agropecuario del 2002, el arroz se sembró anualmente en alrededor de 340 mil hectáreas cultivadas por 75 mil unidades de producción agropecuarias, las cuales el 80% son productores de hasta 20 hectáreas. (21)

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato hidropónico. Entre sus principales propiedades físico-químicas tenemos que es un sustrato orgánico de baja tasa de descomposición, es liviano, de buen drenaje. (23)

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos o enzimáticos. (29).

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma, Phanerochaete* y *Fusaruim,* han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo. (29).

El complejo celulolítico de hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad cuya denominación y mecanismo de acción son los siguientes:

1. Endo-β-glucanasas
   β-(1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC3.2.1.4.)
2. Exo-β-glucanasas.
   a. β-(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC3.2.1.91.)
      Celobiohidrolasa (CBH)
   b. β -(1,4)-glucanglucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.)
      Glucohidrolasa (GGH)
3. β -glucosidasa (EC 3.2.1.21.).

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β-(1,4) y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone, aproximadamente un 20% del total de proteínas del complejo. (29)

La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Este enzima

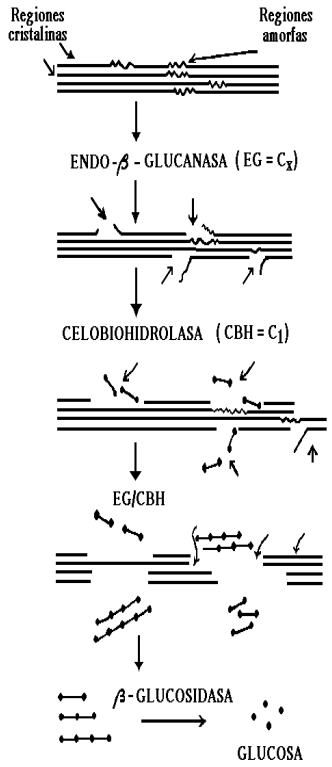
tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Este enzima constituye del 50-80% del complejo celulolítico. (29)

La glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y CMC. (29)

La β-glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que sobre las endo y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumulara en el medio de reacción. (29)

Si se añaden celulasas al material lignocelulósico la hidrólisis de la celulosa es demasiado lenta, debido a la asociación de esta con la lignina que constituye una barrera física a la penetración de los enzimas. Otros factores como la porosidad (área superficial accesible), la critalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido en lignina y hemicelulosa dificultan la accesibilidad de las celulasas reduciendo la eficiencia de la hidrólisis. Todos estos factores hacen necesaria una etapa de pretratamiento, previa a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico facilitando la acción de los enzimas. (29)

Figura 1. Mecanismo de acción de las celulasas



Pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Los objetivos fundamentales del pre-tratamiento van encaminados a: reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis. Además, un pretratamiento eficaz debe reunir otras características como: bajo consumo energético, bajos costes de inversión, utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables y debe ser aplicable a diversos substratos. (29)

Pre-tratamiento físicos

Trituración mecánica

La trituración de los materiales lignocelulósicos mediante una combinación de astillado y molienda, reduce la cristalinidad de la celulosa, aumenta la superficie específica y la densidad aparente, facilitando la hidrólisis posterior. Existen diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillos). Los molinos de bolas vibratorias se han mostrado más efectivos que los molinos de bolas ordinarios en la reducción de la cristalinidad y aumento de digestibilidad de astillas de abeto y chopo. (29)

Este tipo de pre-tratamiento tiene el inconveniente de su alto consumo energético que depende, tanto del tamaño final de partícula al que se muela el material, como del tipo de material a pre-tratar. (29)

Pre-tratamiento químicos

El objetivo de estos pre-tratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando la acción de las enzimas. Entre los pre-tratamientos químicos se encuentran los tratamientos con agua caliente líquida, oxidación húmeda, ozono, álcalis, ácidos, organosolventes y agentes oxidantes. (29)

Tratamiento con agua caliente líquida

Consiste en someter a la biomasa a la acción de agua caliente en torno a una temperatura de 220 C durante un tiempo determinado. El reactor debe estar presurizado para mantener el agua en estado líquido. Durante este pre-tratamiento se recuperan la mayoría de los pentosanos y se obtiene un hidrolizado que no muestra inhibición en el posterior proceso de fermentación. (29)

Debido al escaso aprovechamiento de la cascarilla de arroz en el sector agropecuario y agroindustrial, sería de gran trascendencia crear una alternativa tecnológica para el aprovechamiento máximo de este material orgánico en el sector alimentario. (29)

Por otra parte, la cascarilla de arroz es rica en lignina, celulosa, hemicelulosa y para iniciar un proceso fermentativo es menester degradar estos componentes a azúcares más simples con la aplicación de enzimas específicos para que las levaduras arranquen el proceso de fermentación. (29)

6.4 OBJETIVOS

6.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la tecnología para la elaboración de una alcohólica a partir de la degradación de la cascarilla de arroz (O*ryza sativa*) tratada enzimáticamente con celulasa.

6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar ingresos económicos a los productores agropecuarios al aprovechar las propiedades físico-químicas de la cascarilla de arroz (O*ryza sativa*).
- Analizar la eficiencia de la degradación de celulosa con la enzima Celluclast.
- Ofertar en el mercado una bebida alcohólica a partir de cascarilla de arroz con excelentes características sensoriales.

6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

El proyecto de investigación es de tipo tecnológico, ya que permite implementar una nueva metodología en la elaboración de bebidas alcohólicas utilizando materia prima de bajo costo (cascarilla de arroz) y aprovechar la composición física química de la misma, la enzima Granozyme PM2, con la finalidad de degradar la hemicelulosa presente en la cascarilla y así obtener azúcares más simples que sirvan como alimento para las levaduras que inician el proceso fermentativo, y de esta manera reducir la cantidad de azúcar que se

adiciona para alcanzar 21°Brix en el mosto.

Además este análisis de factibilidad es de carácter socio económico y ambiental, ya que se podrá potenciar el aprovechamiento de la cascarilla de arroz evitando desecharla como basura y así mejorar la calidad de vida de los agricultores generando un ingreso económico más.

Según el análisis de costo de producción (ANEXO F), para determinar la factibilidad de elaboración de la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación de cascarilla de arroz tratada enzimáticamente con Hemicelulasa (Granozyme PM2) y según los resultados obtenidos en la tabla F-6, el costo de venta al público de la bebida obtenida es 2,84$/botella de 500 ml, siendo factible la elaboración de este tipo de bebida ya que este valor sería más bajo si existiese mayor producción.

6.6 FUNDAMENTACIÓN

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. La formación de biomasa vegetal a partir de luz solar se lleva a cabo mediante la fotosíntesis, gracias a la cual se forman moléculas de alto contenido energético en forma de energía química. La producción de biomasa a escala global en el planeta es muy alta, estimándose que la fotosíntesis fija anualmente $2,2 \times 10^{11}$ toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial. (30)

Atendiendo a su origen, la biomasa se puede clasificar en:

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales. Aunque es una de las principales fuentes energéticas en los países en vías de desarrollo, no es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo, ya que podría originar una rápida degradación de los ecosistemas.
- Biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden

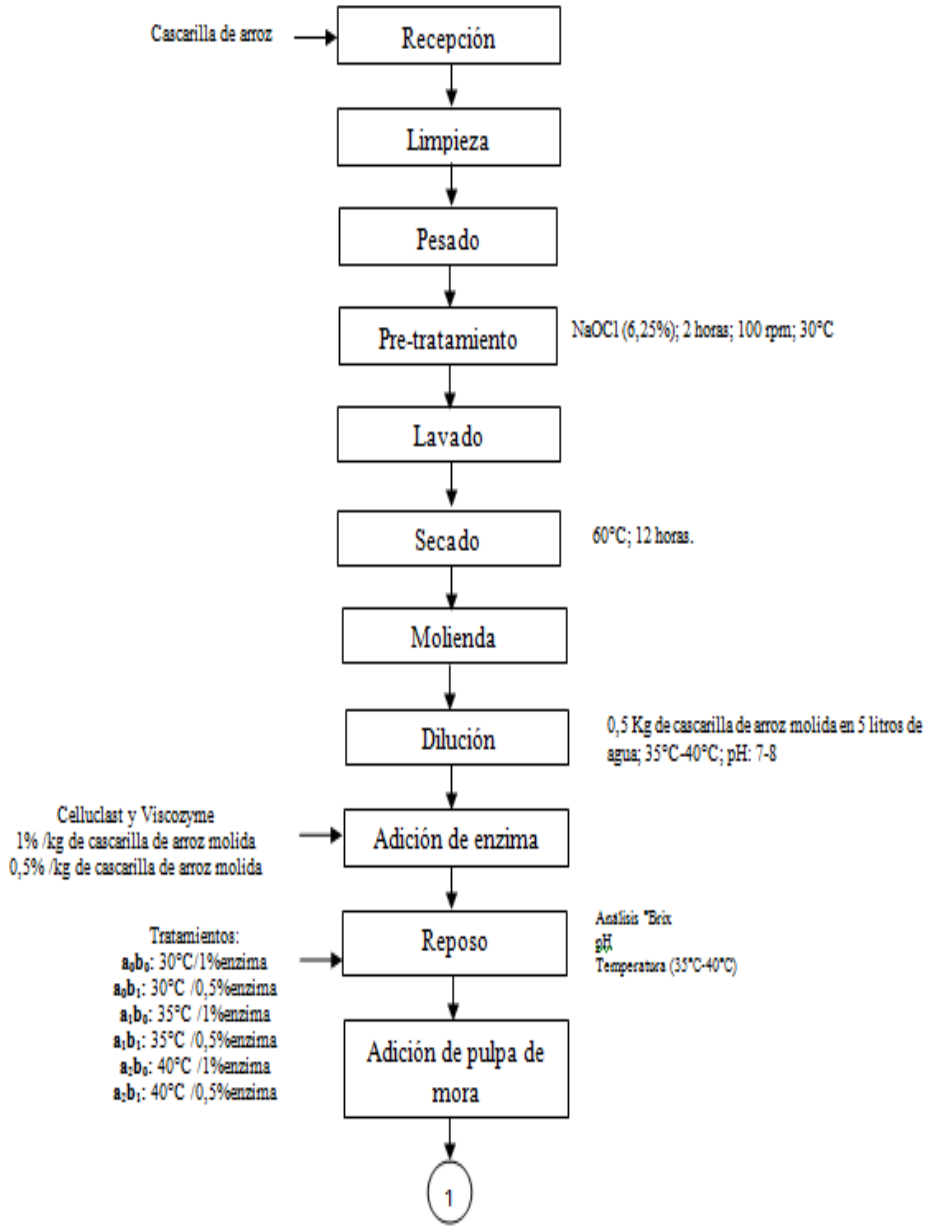
de los cultivos leñosos y herbáceos, destacando los producidos en los cultivos de cereal. Los de origen forestal proceden de los tratamientos silvícolas, de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales. También se pueden considerar incluidos en este grupo los residuos de la industria papelera y la fracción orgánica de los residuos domésticos e industriales, los cuales no sólo no tienen valor económico en el contexto en que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales en su eliminación.

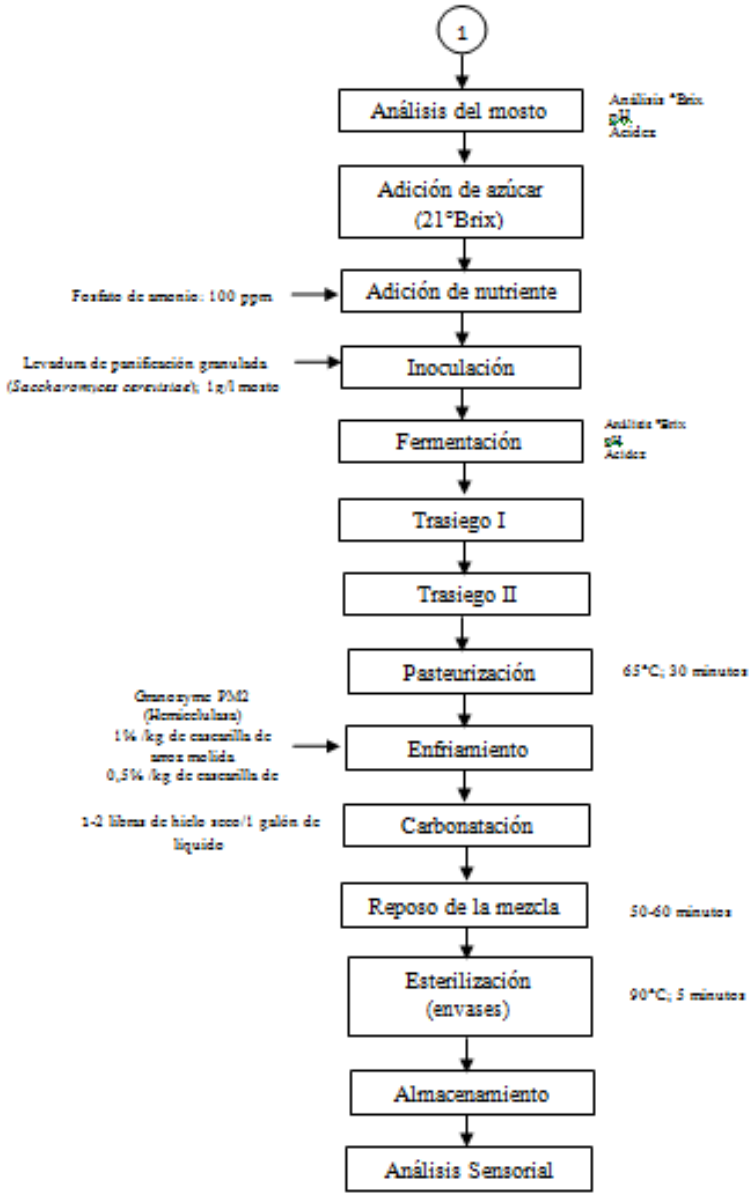
- Cultivos energéticos, son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios. Se diferencian dos tipos: los orientados a la producción de materiales leñosos con especies de crecimiento rápido como el eucalipto o el chopo, y los orientados a la producción de especies vegetales anuales, como por ejemplo, el cardo cynara. (30)

Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos ß-1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente. El interés por las celulasas y xilanasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra.

Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras. (31)

Grafico 6.6.1.- Diagrama de Flujo de la elaboración de una bebida alcohólica a partir de la degradación enzimática de celulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa)* con Celluclast y Viscozyme.




1
Análisis del mosto
Análisis °Brix
pH
Acidez
Adición de azúcar
(21°Brix)
Fosfato de amonio: 100 ppm
Adición de nutriente
Levadura de panificación granulada
(Saccharomyces cerevisiae); 1g/l mosto
Inoculación
Fermentación
Análisis °Brix
pH
Acidez
Trasiego I
Trasiego II
Pasteurización
65°C; 30 minutos
Gmanzyme PM2
(Hemicelulasa)
1% /kg de cascarilla de
arroz molida
0,5% /kg de cascarilla de
Enfriamiento
1-2 libras de hielo seco/1 galón de
líquido
Carbonatación
Reposo de la mezcla
50-60 minutos
Esterilización
(envases)
90°C; 5 minutos
Almacenamiento
Análisis Sensorial

Análisis:

Físico – Químicos

- Sólidos Solubles
- pH
- Acidez Total
- Cenizas

Microbiológicos

En los análisis microbiológicos se realiza: recuento para anaerobios totales, mohos y levaduras, coliformes fecales.

Sensoriales

Dentro de los análisis sensoriales se evalúan los siguientes atributos sensoriales:

- Color
- Olor
- Sabor
- Apreciación

La evaluación sensorial se realiza empleando un panel de catadores semi-entrenados, utilizando la hoja de cata Anexo C.

6.7 METODOLOGÍA. MODELO OPERATIVO

Para la elaboración de la bebida se procede de acuerdo al grafico 6.6.1, diagrama de flujo de elaboración de una alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*); para ello es necesario que en el proceso se tome en cuenta la higiene ya que de ello dependerá garantizar la calidad del producto

Tabla 6.7.1 Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsable	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Degradación de celulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), con Celluclast y Viscozyme para la elaboración de bebidas alcohólicas	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	$ 100	1 mes
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Elaborar la metodología del proceso	Aplicación de Tecnología de elaboración del producto	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	$ 300	1 mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Ejecutar la propuesta	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	$ 200	1 mes
4. Evaluación de la propuesta	Comprobación del proceso de la ejecución	Encuestas a consumidores	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	$ 100	1 mes

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

6.8 ADMINISTRACIÓN

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Ing. Mario Paredes MSc., Ing. Mayra Paredes, Egda. Paulina Collaguazo.

Tabla 6.8.1 Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	**Situación actual**	**Resultados esperados**	**Actividades**	**Responsables**
Incremento de sólidos solubles durante la degradación enzimática de celulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa)*	Desaprovechamiento de la cascarilla de arroz en el sector agropecuario.	Altas concentraciones de sólidos solubles	Determinar el incremento de °Brix debido a la actuación de las enzimas Celluclast y Viscozyme Realizar análisis físico – químicos, microbiológicos sensoriales, proteínas	Investigador: Ing. Mario Paredes MSc., Ing. Mayra Paredes, Egda. Paulina Collaguazo

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Tabla 6.9.1 Previsión de la Evaluación

Preguntas Básicas	Explicación
¿Por qué evaluar?	- Verificar la calidad de la bebida alcohólica elaborada. - Mejorar las tecnologías aplicadas en la elaboración de bebidas alcohólicas.
¿Para qué evaluar?	- Determinar la eficiencia de las enzimas utilizadas para la degradación de celulosa.
¿Qué evaluar?	- Proceso utilizado. - Función de la enzima celulósica. - Incremento de °Brix durante la degradación enzimática. - Características sensoriales del producto terminado.
¿Quién evalúa?	- Director del proyecto. - Tutor. - Calificadores.
¿Cuándo evaluar?	- Todo el tiempo desde las pruebas preliminares hasta la obtención del producto.
¿Cómo evaluar?	- Mediante instrumentos estadísticos de evaluación.
¿Con qué evaluar?	- Experimentación. - Normas establecidas.

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

CAPITULO VI
MATERIALES DE REFERENCIA

7.1 Bibliografía

1. AROZARENA, Iñigo. 2007. “Seminario Internacional – Tecnología para la elaboración de vino de frutas”. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Universidad Pública de Navarra.
2. CARBONELL Mater, 1970. “Tratado de vinicultura”. Primera Edición. Editorial AEDOS. Barcelona-España. Pp. 30-53, 41, 159-168.
3. FENNEMA, Owen. 1985. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Tomo 1. Editorial Reverté, S.A. Barcelona-España. Pp. 342-398
4. FORSYTHE, S.J. (1999). Higiene de los Alimentos, microbiología y HACCP; Guía de Interpretación 3M Petrifilm. Microbiology Products-Laboratoires 3M Santé.
5. GACESA, P.; HUBBLE J. 1990. Tecnología de enzimas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España. Pp. 103-116, 174.
6. GAMBOA, M. 2003. “Utilización de preparados enzimáticos en la producción de vino de mora (Rubus glaucus Benth). Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos. FCIAL-UTA. Ambato-Ecuador. Pp. 97-98.
7. ILLANES, Andrés. 1994. “Biotecnología de enzimas”. s/ed. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile. Pp. 11, 12, 13.

KRETZCHMAR, Hermann. 1961. “Levaduras y Alcoholes” .s/ed. Editorial Reverté S.A. España. Pp. 160, 161, 319.

8. PARSONS, David. 1999. “Maíz”, Cuarta edición. Editorial Trillas. México. Pp. 9, 11-24.
9. PIÑEROS, Yineth; OTÁLVARO, Ángela. 2009. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE CASCARILLA DE

ARROZ PRETRATADA CON NaOCl, MEDIANTE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/CV-51.pdf

10. Pozo Freddy, Alex Valencia. 2004. “Establecer una tecnología para la obtención de una bebida alcohólica a partir de maíz (*Zea mays* variedad *morochon*) usando tratamientos enzimáticos. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos. FCIAL-UTA. Ambato-Ecuador. Pp. 63-65.
11. Mijares María, García-Pelayo. 2000. “El vino de la cepa a la copa”. Tercera edición. Edición Mundi-Prensa. Madrid-España. Pp. 57-59.
12. Revista Novo Nordisk, 1995. “Enzimas-campos de aplicación”. Pp. 5, 26.
13. NORMAS INEN 360 AL 04.02-307. “Determinación de grado alcohólico en vinos”
14. NORMAS INEN 339AL 04.02-201 Bebidas Alcohólicas. Muestreo.
15. RANKINE, Bryce. 1989, “Manual Práctico de Enología”. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. P. 336
16. SARAJIT, K. 1986. Producción de arroz. Fundamentos y Prácticas. Editorial Limusa, México D.F. Pp. 21-29, 175-179, 573-583.
17. VARMAN, Alan; SUTHERLAND, Jane. 1997. Bebidas. Tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España. Pp. 377-453.
18. WISEMAN, Alan. 1985. Manual de biotecnología de los enzimas. 2da. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España. Pp. 320-340
19. Watts. B.M. y otros. 1992. “Métodos sensoriales básicos”. s/ed. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. Montevideo-Uruguay. Pp. 5-9.

7.2 Web grafía

20. AGROCADENA DE ARROZ Y PILADORAS - PANORAMA NACIONAL, 2010. Disponible en: http://www.magap.gob.ec/sigagro/charts/arroz_panoramanac.htm,
21. BLANCO, María del Rosario. 1999. Disponible en: http://www.agrarias.unlz.edu.ar/files/anatomia/alimento%20y%20rumen%20I.htm
22. CALDERÓN Felipe. 2002. Dr. Calderón Asistencia Técnica Agrícola. Disponible en: http://www.drcalderonlabs.com/Investigaciones/Cascarilla_Caolinizada/La_Cascarilla_Caolinizada.htm.
23. CENTRO DE INFORMACION E INNOVACION BIOTECNOLOGICA. 2011. Hemicelulasas auxiliares en un cóctel de enzimas principales. Disponible en: http://www.ibercib.es/info_noticia/hemicelulasas-auxiliares-en-un-coctel-de-enzimas-principales.aspx
24. IBERCIB. Hemicelulasas auxiliares en un cóctel de enzimas principales. 2011. Disponible en: http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm
25. BIBLIOTECA VIRTUAL WIKIPEDIA. 2011. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Hemicelulosa
26. BABILONIA R., AGUILAR J. 2008, Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos –cáscaras de arroz (*Oryza sativa*). Disponible en: http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf
27. VALVERDE, A. 2007. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/CV-51.pdf
28. CASCARILLA DE ARROZ Y SU APROVECHAMIENTO. 2010. Disponible en: http://www.engormix.com/MA-agricultura/cultivos-tropicales/articulos/aprovechamiento-cascarilla-oryza-sativa-t2754/078-p0.htm
29. REVISTA NOTICIAS. CELULASAS. 2010. Disponible en:

http://www.cinvestav.mx/Portals/0/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Avance%20y%20perspectiva/sepoct02/4%20CELULASAS.pdf

30. SOLO CIENCIA. 2009. Disponible en: http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/10211425 5-260.pdf
31. TETRAPAK. Carbonatación de bebidas. 2011. Disponible en: http://www.tetrapak.com/co/products_and_services/processing_equipment /beverage_equipment/carbonation/pages/default.aspx
32. 3M. 1994. “Guía de interpretación para recuentos de mohos y levaduras. Disponible en: http://www.3M.com/microbiology
33. INDUSTRIA DE LOS CEREALES Y DERIVADOS. 2008. Disponible en: http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm

ANEXO A

FUNDAMENTACIÓN LEGAL

(Métodos de análisis para la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

Anexo A-1

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

Fundamento:

Los sólidos solubles de los vinos frutales dulces comprenden principalmente el contenido de azúcares de las frutas, midiendo el índice de refracción del mosto y vino.

Materiales y equipos:

Refractómetro (Brixómetro)
Agua destilada

Procedimiento:

La muestra del mosto se enfrenta a la cara del prisma del refractómetro se ilumina y se observa la escala interior que va desde O a 30 ° Brix; el campo de visión se dividirá en una zona iluminada y otra oscura y la unión de ambas zonas *cruzará* la escala en un punto que representará el ° Brix del mosto.

Referencia:

Comelius Ough, (1996) Tratado básico de enología

Anexo A-2

DETERMINACIÓN DE pH

Fundamento:

El pH se obtuvo a través de la medida realizada entre dos electrodos sumergidos en el líquido que se estudia para la medida de la diferencia de potencial; y está relacionado con la resistencia a enfermedades, con el tinte o matiz de color, sabor. Porcentaje del total de dióxido de azufre en estado libre, susceptibilidad al enturbiamiento por fosfato de hierro, etc.

Materiales y equipos:

pH metro graduado
Soluciones buffer pH 4.00 y 7.00
Agua destilada

Procedimiento:

Se coloca la muestra del vino en un vaso de precipitación entre 25 y 30 ml de muestra.
Se coloca el pHmetro con solución buffer 4.00 y 7.00
Se introduce el electrodo en la muestra analizada cuya temperatura debe estar programada entre 20 - 25 °C y se lee el valor del pH.
De cada muestra se efectúa dos determinaciones de lectura
Expresión del resultado, el pH del vino se expresa con dos decimales.

Referencia:

Cornelius Ough, (1996) Tratado básico de enología y legislación vigente sobre los métodos oficiales de análisis de vinos.

Anexo A-3

DETERMIANCIÓN DE ACIDEZ TOTAL

Fundamento:

La acidez total está considerada como la suma total de los ácidos valorables obtenida cuando se lleva la bebida alcohólica a neutralidad (pH 7.00), por adición de una solución alcalina.

Materiales y equipos:

Pipeta de 20ml
Vaso de precipitación de 100 ml
Bureta de 50 ml
pH-metro
Solución de hidróxido de sodio 0.1 N
Solución buffer de 4.00 y 7.00

Procedimiento:

- Viértase en un vaso de precipitación 10 cc de mosto, medidos con una pipeta
- Se añaden 2-3 gotas de solución de fenolftaleína
- Se vierte gota a gota desde la bureta la solución de Hidróxido de Sodio 0,1N sobre el mosto que contiene el vaso, en continuo movimiento de agitación hasta la aparición uniforme del color rosa del indicador, que demostrara la neutralización de los ácidos del mosto.
- Se toma lectura de los mililitros y decimas gastados de la solución de Hidróxido de sodio 0,1N, este valor se multiplica por 0,49 (factor para expresar la acidez en acido sulfúrico), donde la cantidad resultante es los ácidos contenidos en el mosto y expresados en acido sulfúrico. Para expresar la acidez total del mosto en acido acético bastara multiplicar el valor de la acidez total sulfúrica por 1.23. (Carbonell, Mateo. 1970)

Anexo A-4

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Materiales y equipos:

- Placas petrifilm (3M) para recuento total de aerobios
- Placas petrifilm (3M) para mohos y levaduras
- Placas petrifilm (3M) para recuento total coliformes.
- Micropipeta electrónica
- Cámara de flujo laminar
- Puntas de 5 ml
- Homogenizador de tubos
- Incubadora
- Cuenta colonias

Reactivos:

- Agua peptonada (Peptona Braw).

Procedimiento:

- Esterilizar todos los materiales a utilizar en la siembra.
- Preparar una dilución de la muestra con el agua peptonada.
- Mezclar u homogenizar la muestra mediante los métodos usuales
- Colocar la placa Petrifilm en un superficie plana. Levantar el film superior.
- Con una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 ml de muestra en el centro del film inferior.
- Baja el film superior; deja que caiga, evitando introducir burbujas de aire. No deslizarlo hacia abajo.

- Colocar el aplicador en el film superior sobre el inoculo.
- Con cuidado ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inoculo sobre el área circular. No se debe girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.
- Incubar las placas Petrifilm cara arriba en pilas de hasta 20 placas a temperaturas de: 30 °C durante 48/72 (aerobios totales), 25°C±1°C durante 3-5 días (mohos y levaduras) y 24 horas ≠ 2 horas a 35 °C ± 1 °C (coliformes totales).
- Leer las placas Petrifilm en un contador de colonias standard tipo Quebec o una fuente de luz con aumento.

Referencia: 3M. 1994. "Guía de interpretación para recuentos de mohos y levaduras. Disponible en: http://www.3M.com/microbiology

Anexo A-5

DETERMINACIÓN DE GRADO ALCOHÓLICO

Materiales y equipos:

Los métodos oficiales están basados en la destilación generalmente. Se determinara la valoración alcohólica en un aparato de vidrio.

Viértase en el matraz de 1 litro, limpio y enjuagado con agua destilada, 200 ml de bebida alcohólica medidos con un matraz aforado a 15°C, de fondo plano, también perfectamente limpio y enjuagado con una misma cantidad de la misma bebida alcohólica.

Lávese por dos veces consecutivas el matraz aforado con unos 100 ml de agua destilada, y viértase ambos contenidos en el balón de destilación.

Instálese el equipo de destilación y compruébese los cierres.
Enciéndase el mechero y procédase a una destilación lenta y suave. El agua de refrigeración ha de ser constantemente fría.

Recójanse los destilados en el mismo matraz aforado; antes, se pondrán unos centímetros cúbicos de agua destilada en el matraz, los necesarios para que el pico final del tubo refrigerante quede sumergido y los primeros destilados, muy ricos en alcohol, no se pierdan parcialmente en la atmosfera. Deténgase la operación en el momento en que se hayan recogido exactamente los 200 ml iniciales.

Los 200 ml de destilado viértanse en una probeta de 300 ml, limpia y seca. Agítese para conseguir la homogenización y déjese luego unos minutos en reposo.

Introdúzcase en la probeta un alcoholímetro contrastado, que aprecie las

decimas de grado, perfectamente limpio, acompañándole cogido por el vástago hasta que flote. Fíjese que el alcoholímetro no roce las paredes de la probeta.

Cuando el alcoholímetro permanezca sin moverse, léase, por la parte inferior del menisco que se forma al ser mojado el vástago por el líquido alcohólico. Anótese la lectura.

Referencia:

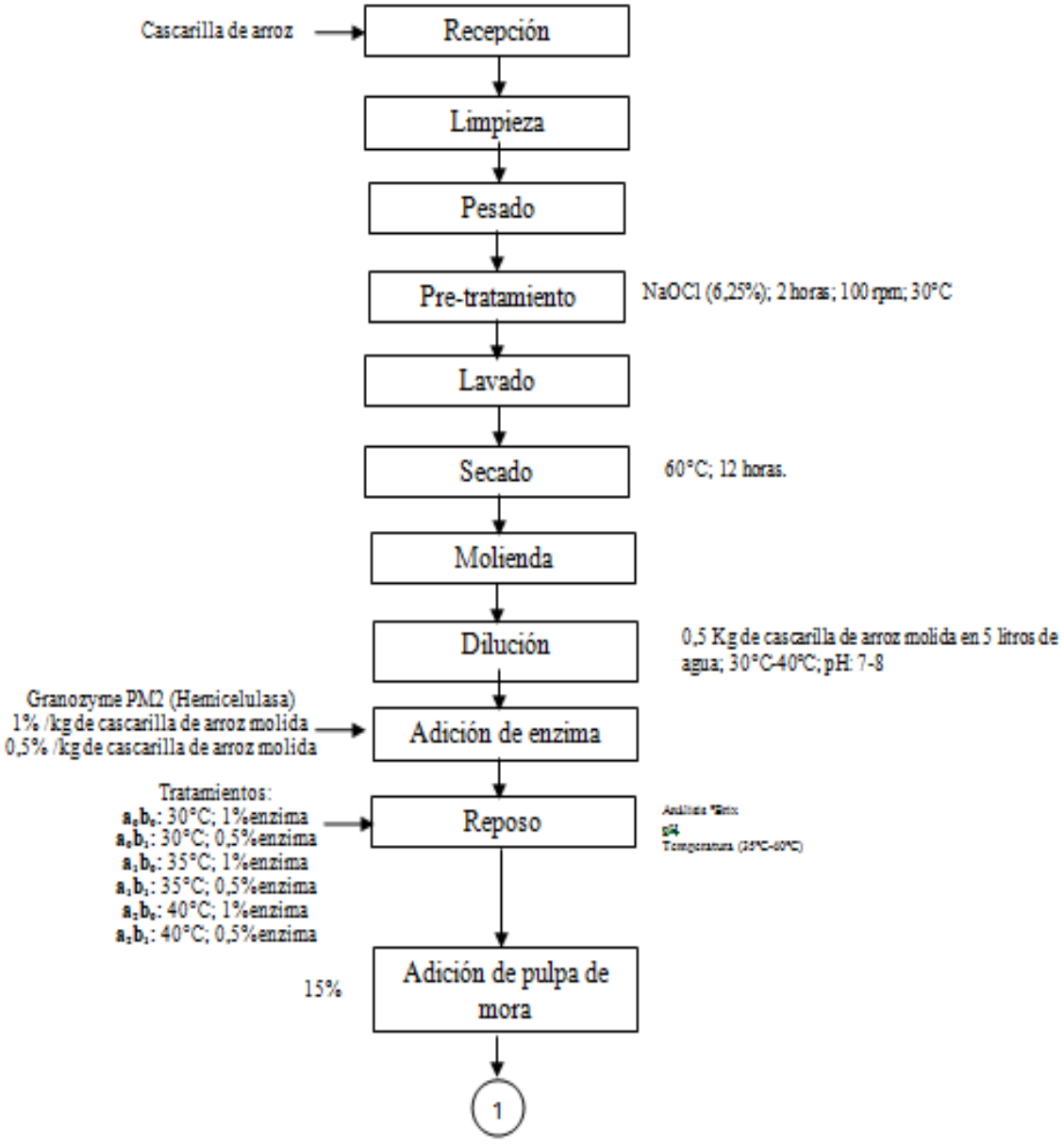
Carbonell Mater, 1970. “Tratado de vinicultura”. Primera Edición. Editorial AEDOS. Barcelona-España.

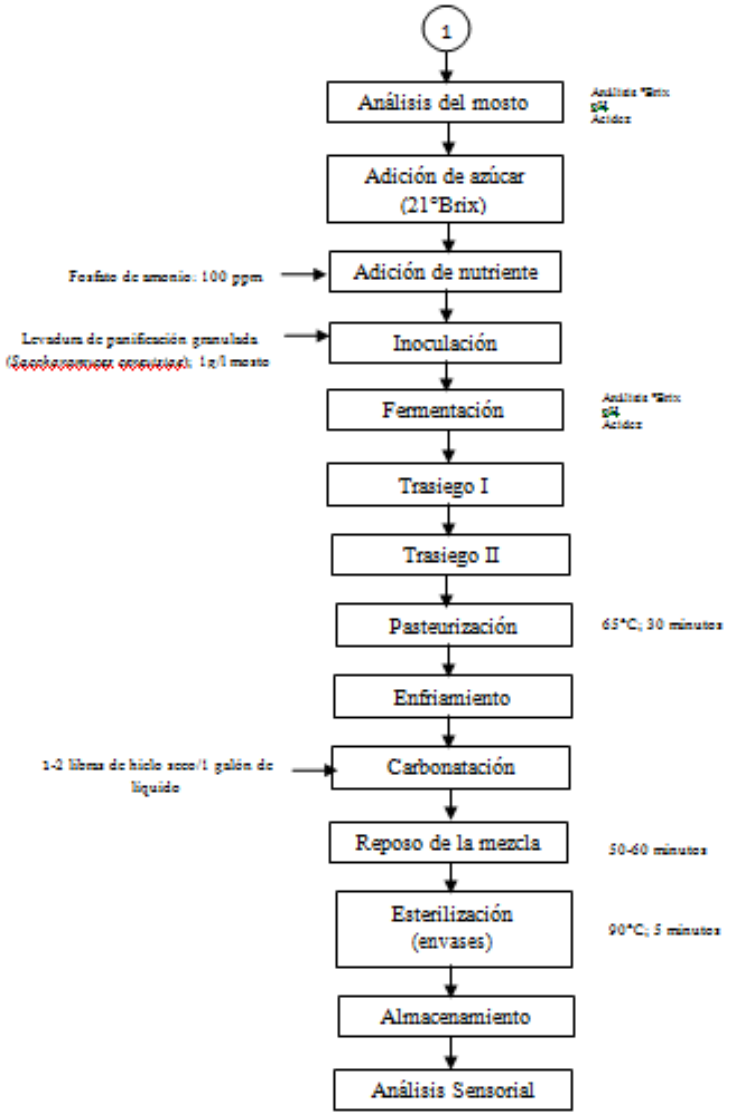
ANEXO B

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (Oryza sativa) TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA.

ANEXO B-1

Gráfico 1.- Diagrama de Flujo de la elaboración de una alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de la hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa)* con Granozyme PM2 (Hemicelulasa)




1
Análisis del mosto
Análisis °Brix
pH
Acidez
Adición de azúcar
(21°Brix)
Fosfato de amonio: 100 ppm
Adición de nutriente
Levadura de panificación granulada
(Saccharomyces cerevisiae): 1g/l mosto
Inoculación
Fermentación
Análisis °Brix
pH
Acidez
Trasiego I
Trasiego II
Pasteurización
65°C; 30 minutos
Enfriamiento
1-2 libras de hielo seco/1 galón de
líquido
Carbonatación
Reposo de la mezcla
50-60 minutos
Esterilización
(envases)
90°C; 5 minutos
Almacenamiento
Análisis Sensorial

ANEXO C

HOJA DE CATACIÓN – PRUEBA DE ANÁLISIS SENSORIAL PARA LA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA CASCARILLA DE ARROZ (Oryza sativa) TRATADA ENZIMÁTICAMENTE CON HEMICELULASA.

ANEXO C-1

CATADOR N°……

PRUEBA DE ANÁLISIS SENSORIAL PARA UNA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN ENZIMATICA DE HEMICELULOSA PRESENTE EN CASCARILLA DE ARROZ (Oryza sativa)

Nombre: …… Sexo: …….
Edad: …… Fecha: ……

INSTRUCCIONES: Por favor, pruebe cada muestra y valore los atributos indicados de acuerdo a la siguiente escala hedónica.

7 Me gusta mucho
6 Me gusta
5 Me gusta ligeramente
4 Ni me gusta ni me disgusta
3 Me disgusta ligeramente
2 Me disgusta
1 Me disgusta mucho

Atributo	**Muestra**					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Color						
Aroma						
Sabor						
Aceptabilidad						

Observaciones
.....
.....

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

ANEXO D

RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Tabla D-1. Detalle del Diseño Experimental A*B y simbología utilizada

	b_o	b_1
a_o	30°C; 1% enzima	30°C; 0,5% enzima
a_1	35°C; 1% enzima	35°C; 0,5% enzima
a_2	40°C; 1% enzima	40°C; 0,5% enzima

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

a: Temperatura de la Dilución de Cascarilla (°C)
a_o: 30°C
a1:35°C
a_2: 40°C

b: Porcentaje de enzima utilizada (Granozyme PM2)
b_o : 1%
b_1 : 0,5%

R_1 Réplica 1
R_2 Réplica 2

Tabla D-2. Variación de Sólidos solubles durante la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) tratada enzimáticamente con Granozyme PM2

	Tiempo (Días)																								
Tratamiento	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**28**	**29**	**30**	**33**	**34**	**35**
a0b0 R1	0,5	0,7	0,9	1,1	1,28	1,52	1,75	1,98	2,22	2,45	2,85	3,1	3,35	3,55	3,77	4,35	4,68	4,95	5,18	5,4	5,85	6,1	6,3	6,8	6,9	7
a0b0 R2	0,5	0,7	0,92	1,16	1,3	1,56	1,78	2	2,25	2,55	2,88	3,1	3,35	3,52	3,75	4,3	4,65	4,92	5,15	5,36	5,82	6	6,25	6,9	7	7
Promedio	0,50	0,70	0,91	1,13	1,29	1,54	1,77	1,99	2,24	2,50	2,87	3,10	3,35	3,54	3,76	4,33	4,67	4,94	5,17	5,38	5,84	6,05	6,28	6,85	6,95	7,00
a0b1 R1	0,5	0,65	0,78	0,88	0,98	1,35	1,5	1,65	1,8	1,98	2,35	2,48	2,65	2,8	3	3,35	3,5	3,68	3,82	3,95	4,3	4,45	4,58	4,6	4,75	4,9
a0b1 R2	0,5	0,65	0,78	0,89	0,99	1,38	1,52	1,69	1,85	2	2,38	2,5	2,68	2,82	3,02	3,4	3,58	3,72	3,85	3,98	4,3	4,45	4,58	4,6	4,7	4,9
Promedio	0,50	0,65	0,78	0,89	0,99	1,37	1,51	1,67	1,83	1,99	2,37	2,49	2,67	2,81	3,01	3,38	3,54	3,70	3,84	3,97	4,30	4,45	4,58	4,60	4,73	4,90
a1b0 R1	0,5	0,8	1,1	1,4	1,69	2,4	5,7	6,05	6,3	6,6	6,9	7,2	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
a1b0 R2	0,5	0,78	1,1	1,38	1,68	2,38	5,68	6,02	6,32	6,6	6,95	7,22	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55
Promedio	0,50	0,79	1,10	1,39	1,69	2,39	5,69	6,04	6,31	6,60	6,93	7,21	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53
a1b1 R1	0,5	0,65	0,9	1,28	1,6	2,2	2,5	2,8	3,1	3,4	4	4,3	4,6	4,9	5,3	6	6,3	6,65	7	7,3	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
a1b1 R2	0,5	0,65	0,9	1,29	1,62	2,2	2,5	2,8	3,15	3,42	4,05	4,35	4,65	4,98	5,3	6,05	6,3	6,62	7	7,35	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
Promedio	0,50	0,65	0,90	1,29	1,61	2,20	2,50	2,80	3,13	3,41	4,03	4,33	4,63	4,94	5,30	6,03	6,30	6,64	7,00	7,33	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65
a2b0 R1	0,5	1,3	2,1	3	3,8	5,1	5,8	6,4	7	7,3	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85	7,85
a2b0 R2	0,5	1,3	2,1	3	3,8	5,2	5,9	6,5	7,1	7,4	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
Promedio	0,50	1,30	2,10	3,00	3,80	5,15	5,85	6,45	7,05	7,35	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83	7,83
a2b1 R1	0,5	1	1,6	2,2	2,7	3,6	4,1	4,6	5,1	5,6	6,6	6,9	7,2	7,5	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
a2b1 R2	0,5	1	1,6	2,1	2,65	3,7	4,2	4,6	5,1	5,65	6,7	7	7,3	7,6	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75
Promedio	0,50	1,00	1,60	2,15	2,68	3,65	4,15	4,60	5,10	5,63	6,65	6,95	7,25	7,55	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73	7,73

Tabla D-3. Caracterización del mosto (Dilución de cascarilla + pulpa de mora) antes del proceso de fermentación

Tratamiento	°Brix	pH	Acidez Total (g acido acético/100 ml mosto)
a0b0 R1	7,4	5,4	1,5
a0b0 R2	7,4	5,5	1,7
Promedio	7,40	5,45	1,60
a0b1 R1	5,2	5	1,38
a0b1 R2	5,2	4,9	1,36
Promedio	5,20	4,95	1,37
a1b0 R1	7,7	4,7	1,3
a1b0 R2	7,7	4,7	1,3
Promedio	7,70	3,57	1,30
a1b1 R1	7,8	3,57	0,99
a1b1 R2	7,9	3,57	0,98
Promedio	7,85	3,57	0,99
a2b0 R1	8,1	4	1,2
a2b0 R2	8	4	1,10
Promedio	8,05	4	1,15
a2b1 R1	7,9	4	0,38
a2b1 R2	8,1	4	0,40
Promedio	8,00	4	0,39

Tabla D-4. Variación de Sólidos solubles durante la Fermentación

	Tiempo (Días)																
Tratamiento	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**
a0b0 R1	23	21,5	20,5	19,7	18,7	15,9	15,3	14,1	13,7	13,5	13	12,8	12,5	12,2	12	12	12
a0b0 R2	23	21,7	20,4	19,9	18,7	15,7	15,5	14,2	13,8	13,6	13	12,8	12,6	12,3	12	12	12
Promedio	23	21,6	20,45	19,8	18,7	15,8	15,4	14,15	13,75	13,55	13	12,8	12,55	12,25	12	12	12
a0b1 R1	23	21,6	19	18,1	17	15,2	14	13,3	12,8	12,3	11,8	11,5	11,3	11,1	10,9	10,7	10,7
a0b1 R2	23	21,7	19,3	18,3	17,2	15,3	14,1	13,4	12,9	12,4	11,9	11,6	11,4	11,2	11	10,8	10,8
Promedio	23	21,65	19,15	18,2	17,1	15,25	14,05	13,35	12,85	12,35	11,85	11,55	11,35	11,15	10,95	10,75	10,75
a1b0 R1	22,6	21,4	19,3	18	17	15,7	15,1	14,5	13,9	13,6	12,6	12,4	12,2	12,1	12	11,9	11,9
a1b0 R2	22,4	21,6	19,5	18,2	17,1	15,8	15,2	14,6	14	13,8	12,7	12,5	12,2	12,1	12	11,8	11,9
Promedio	22,5	21,5	19,4	18,1	17,05	15,75	15,15	14,55	13,95	13,7	12,65	12,45	12,2	12,1	12	11,85	11,9
a1b1 R1	23	22	21	20	19	17,1	16,5	15,9	15,3	14,7	13,5	13,1	12,8	12,6	12,4	12,2	12,2
a1b1 R2	23	22	21	20	19	17	16,4	15,8	15,2	14,6	13,4	13	12,7	12,5	12,3	12,2	12,2
Promedio	23	22	21	20	19	17,05	16,45	15,85	15,25	14,65	13,45	13,05	12,75	12,55	12,35	12,2	12,2
a2b0 R1	21,8	20,5	19,5	18,6	17,8	16,4	15,8	14,2	13,8	13,4	12,5	12,2	12	11,8	11,7	11,7	11,7
a2b0 R2	22	20	19	18,4	17,6	16,5	15,7	14,1	13,7	13,3	12,4	12,1	11,9	11,7	11,7	11,7	11,7
Promedio	21,9	20,25	19,25	18,5	17,7	16,45	15,75	14,15	13,75	13,35	12,45	12,5	11,95	11,75	11,7	11,7	11,7
a2b1 R1	22	21	20	19	18	16,4	15,7	15	14,3	14,1	13,5	13,3	13,1	12,9	12,7	12,4	12,4
a2b1 R2	21,8	20,8	19,8	18,7	17,9	16,3	15,6	14,9	14,2	13,9	13,4	13,2	13	12,8	12,6	12,3	12,3
Promedio	21,9	20,9	19,9	18,85	17,95	16,35	15,65	14,95	14,25	14	13,45	13,25	13,05	12,85	12,65	12,35	12,35

Tabla D-5. Variación de pH registrados durante la fermentación

	Tiempo (Horas)																
Tratamiento	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**
a0b0 R1	5,40	5,33	5,27	5,23	5,17	5,17	5,15	5,15	5,13	5,12	5,11	5,40	5,38	5,33	5,26	5,26	5,26
a0b0 R2	5,50	5,43	5,38	5,34	5,28	5,28	5,17	5,17	5,15	5,14	5,13	5,46	5,43	5,35	5,28	5,28	5,28
Promedio	5,45	5,38	5,33	5,29	5,23	5,23	5,16	5,16	5,14	5,13	5,12	5,43	5,41	5,34	5,27	5,27	5,27
a0b1 R1	5,00	4,92	4,88	4,83	4,77	4,73	4,71	4,71	4,68	4,71	4,71	4,67	4,70	4,68	4,67	4,67	4,67
a0b1 R2	4,90	4,81	4,77	4,71	4,65	4,62	4,60	4,60	4,65	4,60	4,60	4,65	4,70	4,68	4,67	4,67	4,67
Promedio	4,95	4,87	4,83	4,77	4,71	4,68	4,66	4,66	4,67	4,66	4,66	4,66	4,70	4,68	4,67	4,67	4,67
a1b0 R1	4,70	4,60	4,10	4,00	3,90	3,90	3,90	4,00	3,95	3,93	3,91	4,05	4,00	3,90	3,80	3,80	3,80
a1b0 R2	4,70	4,60	4,10	4,00	3,90	3,90	3,90	3,98	3,93	3,91	3,89	4,00	3,80	3,70	3,70	3,70	3,70
Promedio	4,70	4,60	4,10	4,00	3,90	3,90	3,90	3,99	3,94	3,92	3,90	4,03	3,90	3,80	3,75	3,75	3,75
a1b1 R1	3,57	3,57	3,46	3,43	3,41	3,36	3,36	3,36	3,34	3,57	3,57	3,55	3,54	3,90	3,87	3,87	3,87
a1b1 R2	3,57	3,57	4,45	3,42	3,40	3,35	3,35	3,35	3,33	3,57	3,57	3,55	3,55	3,91	3,86	3,86	3,86
Promedio	3,57	3,57	3,96	3,43	3,41	3,36	3,36	3,36	3,34	3,57	3,57	3,55	3,55	3,91	3,87	3,87	3,87
a2b0 R1	4,00	3,92	3,88	3,85	3,84	3,84	3,83	3,82	4,07	4,05	4,03	4,02	4,00	3,98	3,97	3,97	3,97
a2b0 R2	4,00	3,92	3,89	3,85	3,85	3,85	3,84	3,83	4,06	4,04	4,02	4,01	3,99	3.97	3.96	3.96	3.96
Promedio	4,00	3,92	3,89	3,85	3,85	3,85	3,84	3,83	4,07	4,05	4,03	4,02	4,00	3,98	3,97	3,97	3,97
a2b1 R1	4,00	3,94	3,90	3,85	3,82	3,80	3,80	3,80	3,78	3,74	3,73	3,72	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70
a2b1 R2	4,00	3,95	3,91	3,86	3,83	3,80	3,80	3,80	3,77	3,75	3,73	3,72	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70
Promedio	4,00	3,95	3,91	3,86	3,83	3,80	3,80	3,80	3,78	3,75	3,73	3,72	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70

Tabla D-6. Variación de la Acidez Total registrada durante la fermentación

	Tiempo (Horas)																
Tratamiento	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**
a0b0 R1	1,5	1,55	1,61	1,61	1,62	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63
a0b0 R2	1,7	1,75	1,78	1,8	1,81	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82
Promedio	1,60	1,65	1,70	1,71	1,72	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
a0b1 R1	1,38	1,44	1,46	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
a0b1 R2	1,36	1,43	1,45	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46
Promedio	1,37	1,44	1,46	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
a1b0 R1	1,3	1,33	1,34	1,35	1,37	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
a1b0 R2	1,3	1,33	1,34	1,35	1,35	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Promedio	1,30	1,33	1,34	1,35	1,36	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
a1b1 R1	0,99	1	1,03	1,04	1,05	1,08	1,1	1,12	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
a1b1 R2	0,98	1	1,02	1,03	1,04	1,07	1,09	1,1	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14
Promedio	0,99	1,00	1,03	1,04	1,05	1,08	1,10	1,11	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
a2b0 R1	1,2	1,24	1,26	1,28	1,3	1,32	1,34	1,36	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
a2b0 R2	1,10	1,24	1,26	1,26	1,28	1,33	1,35	1,36	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
Promedio	1,15	1,24	1,26	1,27	1,29	1,325	1,345	1,36	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
a2b1 R1	0,38	0,4	0,41	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
a2b1 R2	0,40	0,42	0,43	0,44	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Promedio	0,39	0,41	0,42	0,43	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44

Tabla D-7. Resultados de la Prueba sensorial de la Bebida alcohólica carbonatada a partir de cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

Catador	Tratamiento	Color	Aroma	Sabor	Aceptabilidad
1	**a0b0 R1**	2	3	4	4
1	**a0b0 R2**	1	2	5	4
1	**a0b1 R1**	4	2	6	5
1	**a0b1 R2**	3	2	5	3
1	**a1b0 R1**	4	3	4	4
1	**a1b0 R2**	3	3	5	4
1	**a1b1 R1**	6	4	5	7
1	**a1b1 R2**	6	6	4	5
1	**a2b0 R1**	4	6	4	7
1	**a2b0 R2**	4	6	5	6
1	**a2b1 R1**	5	6	4	6
1	**a2b1 R2**	6	7	4	7
2	**a0b0 R1**	1	4	3	5
2	**a0b0 R2**	3	4	4	3
2	**a0b1 R1**	5	4	5	4
2	**a0b1 R2**	5	3	4	4
2	**a1b0 R1**	3	6	5	5
2	**a1b0 R2**	6	4	5	6
2	**a1b1 R1**	5	6	3	6
2	**a1b1 R2**	6	6	3	6
2	**a2b0 R1**	5	5	5	5
2	**a2b0 R2**	5	6	5	4
2	**a2b1 R1**	4	6	5	5
2	**a2b1 R2**	5	6	5	6
3	**a0b0 R1**	3	4	5	2
3	**a0b0 R2**	3	4	4	5
3	**a0b1 R1**	4	4	5	3
3	**a0b1 R2**	4	4	3	5
3	**a1b0 R1**	4	4	5	4
3	**a1b0 R2**	5	5	4	5
3	**a1b1 R1**	6	5	4	6
3	**a1b1 R2**	5	5	2	7
3	**a2b0 R1**	7	7	5	6
3	**a2b0 R2**	7	6	4	4
3	**a2b1 R1**	5	7	6	4
3	**a2b1 R2**	6	6	6	5
4	**a0b0 R1**	4	2	5	5

4	**a0b0 R2**	2	4	4	4
4	**a0b1 R1**	3	5	5	5
4	**a0b1 R2**	4	2	4	4
4	**a1b0 R1**	3	5	3	4
4	**a1b0 R2**	6	5	5	6
4	**a1b1 R1**	6	6	4	5
4	**a1b1 R2**	5	5	4	6
4	**a2b0 R1**	6	6	4	4
4	**a2b0 R2**	6	6	4	5
4	**a2b1 R1**	5	6	5	6
4	**a2b1 R2**	7	6	4	6
5	**a0b0 R1**	1	4	4	4
5	**a0b0 R2**	4	3	5	4
5	**a0b1 R1**	2	3	4	2
5	**a0b1 R2**	3	4	4	3
5	**a1b0 R1**	6	4	5	6
5	**a1b0 R2**	4	5	4	4
5	**a1b1 R1**	4	6	5	5
5	**a1b1 R2**	6	6	4	5
5	**a2b0 R1**	5	5	5	5
5	**a2b0 R2**	4	6	5	7
5	**a2b1 R1**	7	7	4	5
5	**a2b1 R2**	7	6	5	7
6	**a0b0 R1**	2	2	4	3
6	**a0b0 R2**	3	4	5	5
6	**a0b1 R1**	4	4	4	5
6	**a0b1 R2**	3	3	5	4
6	**a1b0 R1**	6	4	2	4
6	**a1b0 R2**	6	5	3	6
6	**a1b1 R1**	4	5	5	6
6	**a1b1 R2**	3	4	5	4
6	**a2b0 R1**	4	6	3	6
6	**a2b0 R2**	4	7	4	6
6	**a2b1 R1**	5	7	5	4
6	**a2b1 R2**	6	7	5	6
7	**a0b0 R1**	2	3	4	2
7	**a0b0 R2**	1	4	6	4
7	**a0b1 R1**	4	5	3	4
7	**a0b1 R2**	2	4	3	2
7	**a1b0 R1**	6	5	4	5
7	**a1b0 R2**	3	6	5	4
7	**a1b1 R1**	4	6	4	4
7	**a1b1 R2**	4	4	3	6
7	**a2b0 R1**	5	7	3	7
7	**a2b0 R2**	4	5	5	7

7	**a2b1 R1**	5	6	4	7
7	**a2b1 R2**	6	6	6	7
8	**a0b0 R1**	2	3	5	3
8	**a0b0 R2**	4	3	4	3
8	**a0b1 R1**	3	5	3	5
8	**a0b1 R2**	2	4	4	5
8	**a1b0 R1**	5	5	5	4
8	**a1b0 R2**	4	5	5	4
8	**a1b1 R1**	5	4	4	4
8	**a1b1 R2**	5	6	5	4
8	**a2b0 R1**	6	6	5	6
8	**a2b0 R2**	5	6	5	5
8	**a2b1 R1**	7	7	4	6
8	**a2b1 R2**	7	5	4	6

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Tabla D-8. Resultados de los Análisis microbiológicos (ufc/ml) realizados al mejor tratamiento de la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

Tratamiento	**Recuento de aerobios totales (ufc/ml)**	**Recuento de mohos y levaduras (ufc/ml)**	**Recuento de coliformes totales (ufc/ml)**
a_2b_1 R1	$< 1.0*10^1$	$< 1.0*10^1$	$< 1.0*10^1$
a_2b_1 R2	$< 1.0*10^1$	$< 1.0*10^1$	$< 1.0*10^1$

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

GRADO ALCOHÓLICO

Tabla D-9. Resultados del grado alcohólico en el mejor tratamiento en la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

Tratamiento	°GL
a_2b_1 R1	9,1
a_2b_1 R2	9,7

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

Tabla D-10. Análisis de proteínas para el mejor tratamiento a_2b_1 en la bebida alcohólica carbonatada a partir de la degradación enzimática de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

Tratamiento	%Proteína
a_2b_1 R1	3,4

Elaborado por: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 2011

ANEXO E

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla E-1. Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para los resultados de Variación de grados Brix, durante el proceso de degradación enzimático de hemicelulosa presente en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), tomando en cuenta la interacción A*B (Porcentaje de enzima y Temperatura)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12,50	6	2,08	1515,20	<0,0001
Repetición	1,9E-03	1	1,9E-03	1,36	0,2956
Temperatura	8,06	2	4,03	2931,97	<0,0001**
%Enzima	1,44	1	1,44	1043,79	<0,0001**
Temperatura*%Enzima	3,00	2	1,50	1091,06	<0,0001**
Error	0,01	5	1,4E-03		
Total	12,51	11			

** Existe diferencia significativa al 5% para los tratamientos, por lo tanto se realiza la prueba de diferenciación de Tukey.

Tabla E-2. Resultados de la Prueba de Tukey aplicada a la variable A (Temperatura del medio acuoso)

Temperatura	Medias	n	E.E.			
40	7,78	4	0,02	A		
35	7,59	4	0,02		B	
30	5,95	4	0,02			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla E-3. Resultados de la Prueba de Tukey aplicada a la variable B (Porcentaje de enzima utilizada en la degradación)

%Enzima	Medias	n	E.E.		
1,00	7,45	6	0,02	A	
0,50	6,76	6	0,02		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla E-4 Resultados de la Prueba de Tukey aplicada a la interacción A*B (Porcentaje de enzima y Temperatura)

Temperatura	%Enzima	Medias	n	E.E.					
40,00	1,00	7,83	2	0,03	A				
40,00	0,50	7,73	2	0,03	A	B			
35,00	0,50	7,65	2	0,03		B	C		
35,00	1,00	7,53	2	0,03			C		
30,00	1,00	7,00	2	0,03				D	
30,00	0,50	4,90	2	0,03					E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla E-5. Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para los resultados del análisis sensorial (aceptabilidad) en bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,46	12	2,7	4,32	0,0003
Repeticiones	1,49	7	0,21	0,34	0,9293
TRATAMIENTOS	30,96	5	6,19	9,89	<0,0001**
Error	21,91	35	0,63		
Total	54,37	47			

** Existe diferencia significativa al 5% para los tratamientos, por lo tanto se realiza la prueba de diferenciación de Tukey.

Tabla E-6. Resultados de la Prueba de Tukey aplicada a los resultados del análisis sensorial en los 6 tratamientos

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
a2b1	5,81	8	0,28	A	
a2b0	5,63	8	0,28	A	
a1b1	5,38	8	0,28	A	
a1b0	4,69	8	0,28	A	B
a0b1	3,94	8	0,28		B
a0b0	3,75	8	0,28		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla E-7. Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para sabor en bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,58	12	0,30	0,58	0,8400

Repeticiones	0,98	7	0,14	0,27	0,9602 ns
TRATAMIENTOS	2,60	5	0,52	1,02	0,4216
Error	17,90	35	0,51		
Total	21,48	47			

No existe diferencia significativa entre los tratamientos (ns), por lo tanto no se realiza la prueba de Tukey.

Tabla E-8. Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para el aroma en bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	63,94	12	5,33	17,69	<0,0001
Repeticiones	3,65	7	0,52	1,73	0,1341
TRATAMIENTOS	60,29	5	12,06	40,04	<0,0001**
Error	10,54	35	0,30		
Total	74,48	47			

** Existe diferencia significativa al 5% para los tratamientos, por lo tanto se realiza la prueba de diferenciación de Tukey.

Tabla E-9. Resultados de la Prueba de Tukey aplicada para el aroma de la bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.				
a2b1	6,31	8	0,19	A			
a2b0	6,00	8	0,19	A	B		
a1b1	5,25	8	0,19		B	C	
a1b0	4,63	8	0,19			C	
a0b1	3,63	8	0,19				D
a0b0	3,31	8	0,19				D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla E-10. Análisis de Varianza para el color en la bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68,71	12	5,73	8,75	<0,0001
Repeticiones	5,74	7	0,82	1,25	0,3012
TRATAMIENTOS	62,96	5	12,59	19,24	<0,0001**
Error	22,91	35	0,65		
Total	91,62	47			

** Existe diferencia significativa al 5% para los tratamientos, por lo tanto se realiza la prueba de diferenciación de Tukey.

Tabla E-11. Resultados de la Prueba de Tukey aplicada para el color en bebida alcohólica a partir de la degradación de hemicelulosa presente en la

cascarilla de arroz (*Oryza sativa*)

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.			
a2b1	5,81	8	0,29	A		
a2b0	5,06	8	0,29	A		
a1b1	5,00	8	0,29	A		
a1b0	4,63	8	0,29	A	B	
a0b1	3,44	8	0,29		B	C
a0b0	2,38	8	0,29			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

ANEXO F

ANÁLISIS DE COSTOS DE PRODUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA BEBIDA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE HEMICELULOSA PRESENTE EN CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Tabla F-2. Materiales directos e indirectos

Material	Unidad	Cantidad	Valor Unit. ($)	Valor Total ($)
Cascarilla de arroz	qq	1	2	2
Enzima Granozyme PM2	kg	0,0001	325	0,03
Fosfato de amonio	Kg	0,005	94	0,47
Azúcar	Kg	8	1,2	9,60
Levadura liofilizada	Kg	0,0072		0
Hielo seco	Kg	3,5	1,15	4,03
Mora	Kg	1	3,6	3,60
Envases (500 ml)	u	15	0,25	3,75
			TOTAL ($)	**23,48**

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

Tabla F-2.Equipos y Utensillos

Equipo	Costo ($)	Costo anual ($)	Vida útil (años)	Costo diario($)	Costo Hora ($)	# Horas	Total
Balanza analítica	120	12	10	0,05	0,006	1	0,006
Balanza mecánica	65	6,5	10	0,03	0,003	1	0,00325
Licuadora industrial	250	25	10	0,10	0,013	1	0,0125
Estufa	1500	150	10	0,60	0,075	72	5,4
pH - metro	150	15	10	0,06	0,008	1	0,0075
Termómetro	70	14	5	0,06	0,007	1	0,007

Brixómetro	280	56	5	0,22	0,028	1	0,028
Recipiente y mangueras para fermentación	70	14	5	0,06	0,007	528	3,696
Utensillos varios	50	10	5	0,04	0,005	3	0,015
					TOTAL ($)		9,17525

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

Tabla F-3. Suministros

Servicios	Unidad	Costo unitario ($)	Consumo	Valor Total ($)
Agua	m^3	0,2	2,5	0,50
Gas	Kg	0,1	2	0,20
Energía	Kw/h	0,15	9	1,35
			TOTAL ($)	**2,05**

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

Tabla F-4. Personal

Personas	Sueldo	Costo día ($)	Costo Hora ($)	Horas utilizadas	Total ($)
1	264	13,2	1,65	8	0,83
				TOTAL ($)	**0,83**

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

Tabla F-5. Costos de Producción

1. Materiales directos e indirectos	23,48
2. Equipos	9,18
3. Suministros	2,05
4. Personal	0,83
TOTAL ($)	**35,53**

Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

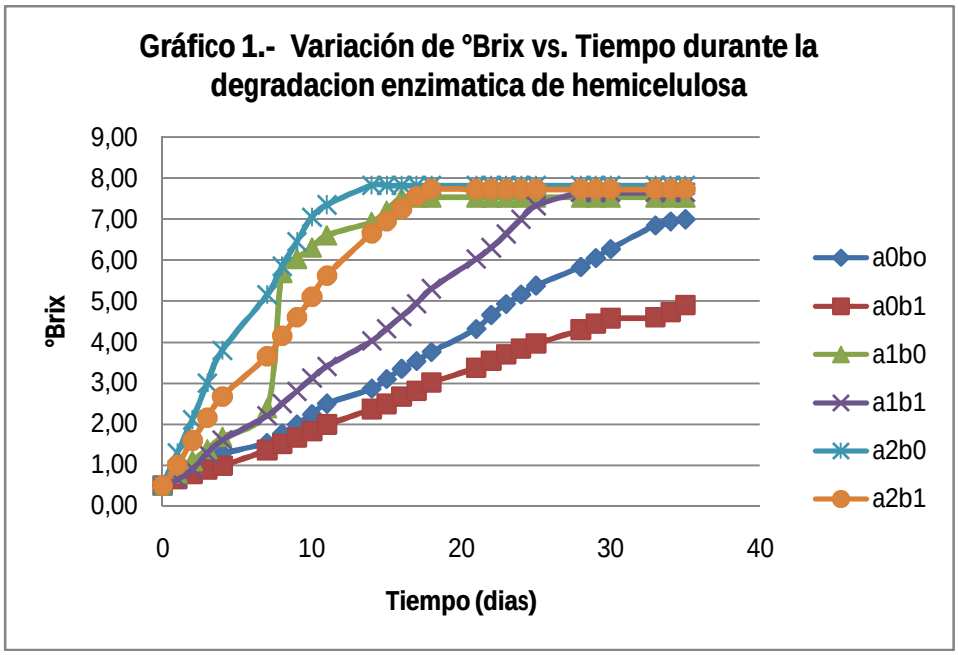
Tabla F-6. Costos de Venta

Capacidad de producción	35,53
Costo unitario	2,37
Costo de venta (30% utilidad)	2,84

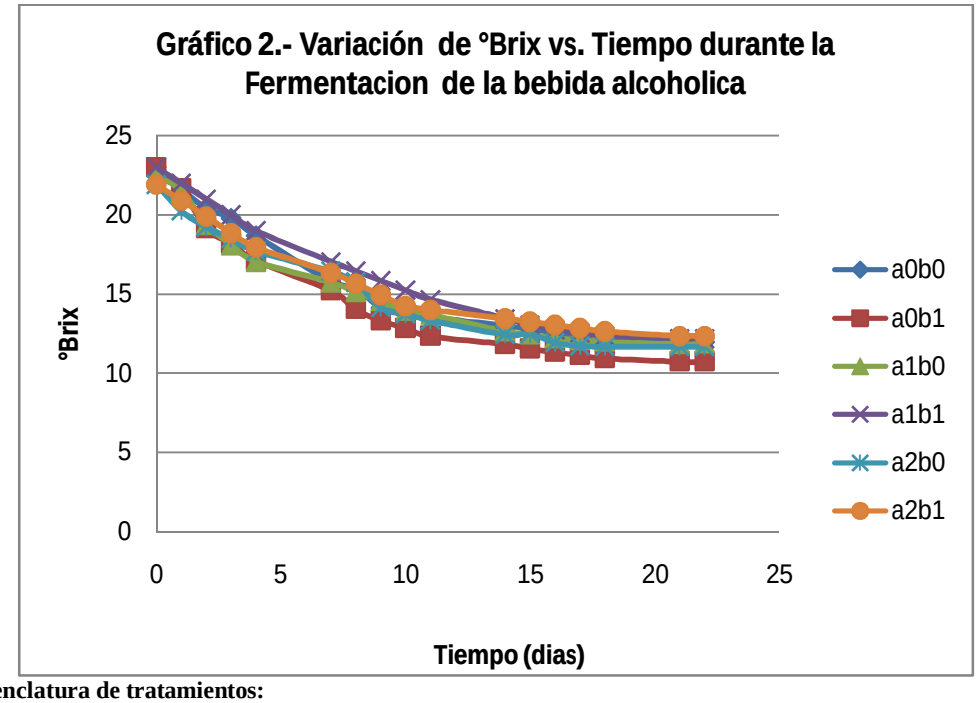
Elaborado por: Paulina Collaguazo, 2011

ANEXO G

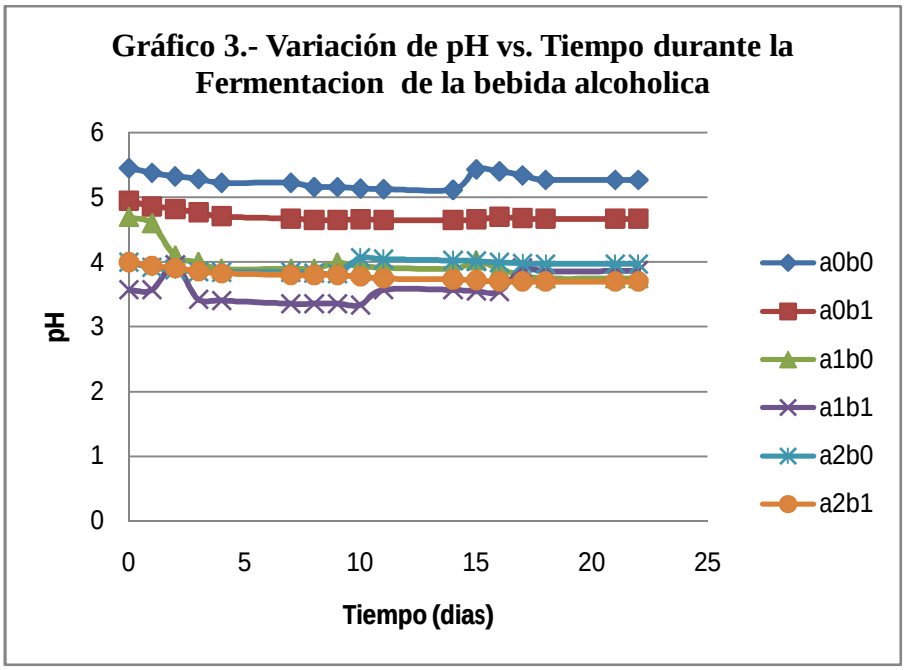
GRÁFICOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE ACUERDO A LOS ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS PARA LA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa*) TRATADA ENZIMATICAMENTE CON HEMICELULASA.



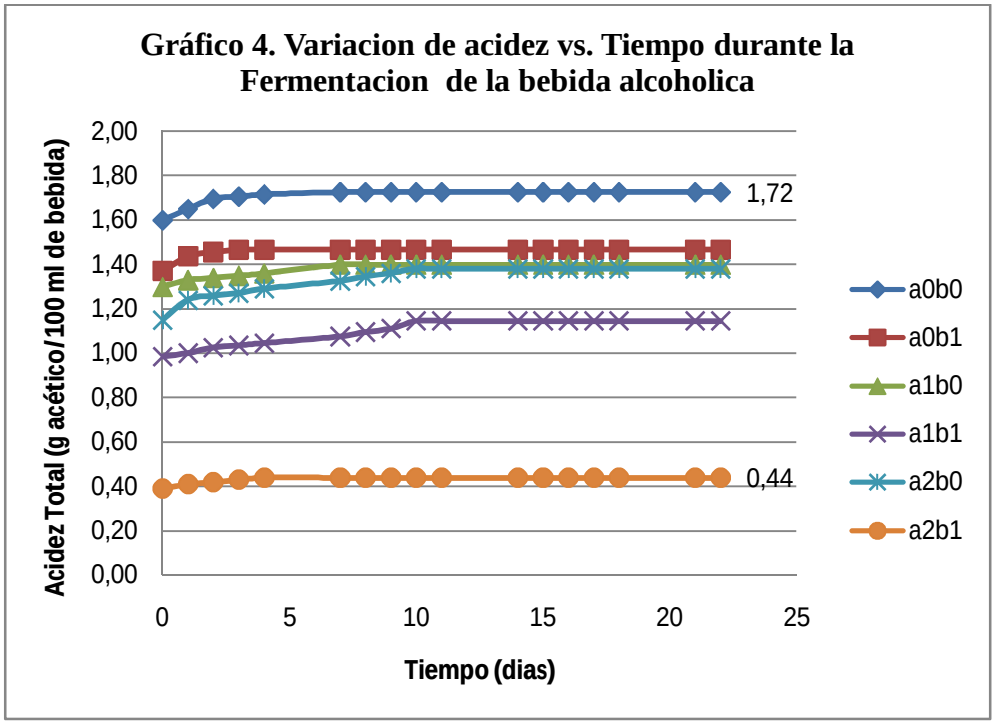
Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**



Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

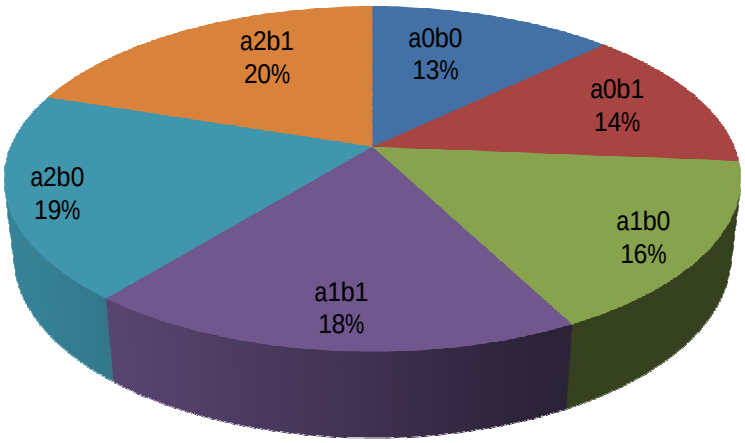


Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**



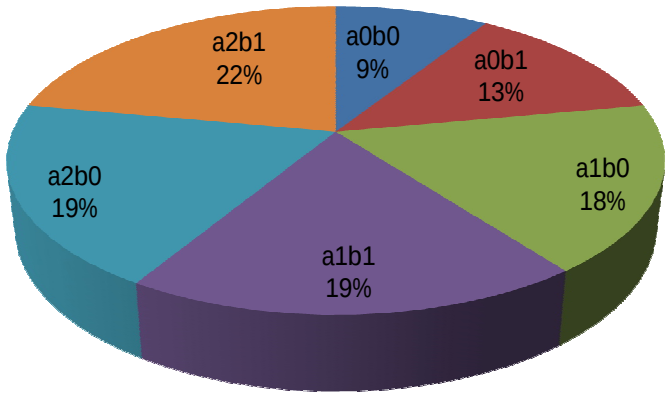
Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

Gráfico 5. Porcentaje de aceptación de los catadores en cuanto aceptabilidad para los diferentes tratamientos



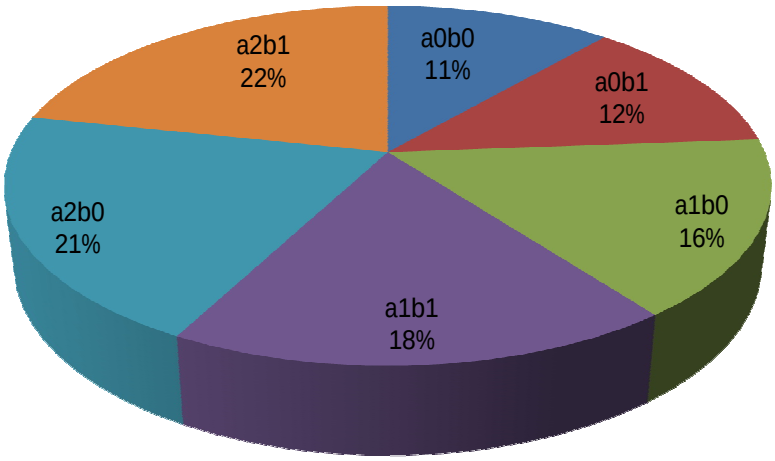
Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

Gráfico 6. Porcentaje de aceptación de los catadores en cuanto color para los diferentes tratamientos



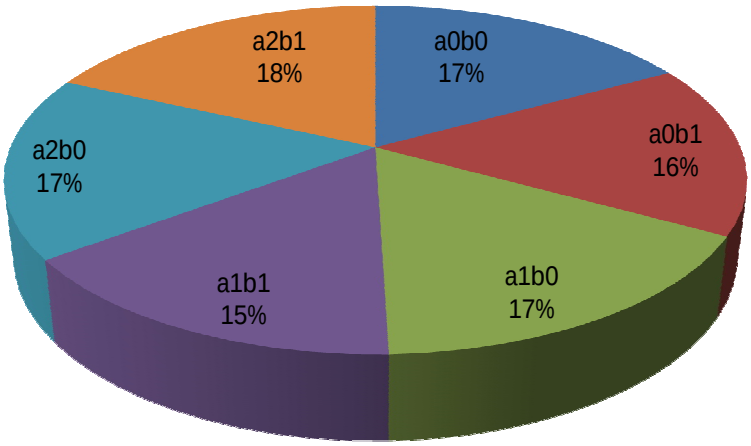
Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

Gráfico 7. Porcentaje de aceptación de los catadores en cuanto a aroma para los diferentes tratamientos



Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

Gráfico 8. Porcentaje de aceptación de los catadores en cuanto sabor para los diferentes tratamientos



Nomenclatura de tratamientos:
Factor A (Temperatura del medio acuoso): **a_0:** 30°C **a_1:**35°C **a_2:** 40°C
Factor B (Porcentaje de enzima GRANOZYME PM2 utilizada): **b_0 : 1%** **b_1 : 0,5%**

ANEXO H

FOTOGRAFÍAS DE LA ELABORACIÓN DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA CARBONATADA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE CASCARILLA DE ARROZ (*Oryza sativa)* TRATADA ENZIMATICAMENTE CON HEMICELULASA



Grafico 1. Recepción de materia prima



Grafico 2. Pre-tratamiento con NaOCl



Grafico 3. Secado de la cascarilla



Grafico 4. Molienda

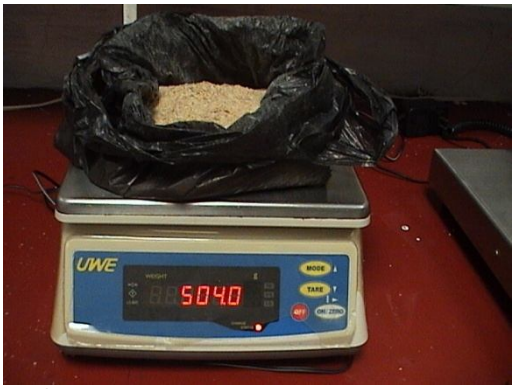


Grafico 5. Pesado



Grafico 6. Dosificación

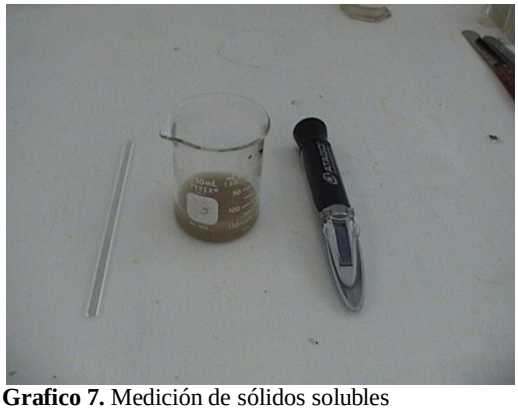


Grafico 7. Medición de sólidos solubles



Grafico 8. Medición de pH



Grafico 9. Inoculación de levaduras



Grafico 10. Fermentadores



Grafico 11. Bebida alcohólica