

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**"Producción de amilasas y proteasas de *Aspergillus oryzae* ATCC 20386 por fermentación en sustrato sólido, para la optimización de la elaboración de siyao de "tarwi"(*Lupinus mutabilis*)"**

**Tesis para optar el título profesional de Biólogo,  
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

**Bach. Ricardo Absalón Juscamaita Porras**

Asesor:

**Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua**

**Ayacucho - Perú**

**1993**

### AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional de "San Cristobal de Huamanga" y a todos los profesores que participaron y contribuyeron desde un inicio en mi formación como persona y profesional.
  
- Mi especial agradecimiento a mis asesores; Elgo.Mblgo. Fidel R. Mujica Lengua por su constante orientación y apoyo desinteresado, y Q.F. José Díez Macavilca por su colaboración y consejos; para la elaboración y culminación del presente trabajo de tesis.
  
- De la misma forma mi agradecimiento al Ing. Eduardo Robles García de la Facultad de Agronomía por su valioso aporte en la evaluación estadística de los resultados.
  
- Mi agradecimiento va también a los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, y personal de los laboratorios y todas las personas y familiares que me han brindado su generosa ayuda en la ejecución de este trabajo.

## SUMARIO

### INTRODUCCION.

### CAPITULO I.- REVISION DE LITERATURA

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.- Generalidades.....                                           | 01 |
| 1.2.- Materias Primas.....                                         | 03 |
| 1.2.1.- El Tarwi.....                                              | 03 |
| 1.2.2.- El Trigo y Salvado de Trigo.....                           | 04 |
| 1.3.- Fermentación en Sustrato Sólido.....                         | 05 |
| 1.3.1.- Naturaleza del Sustrato y su<br>Pretratamiento.....        | 07 |
| 1.3.2.- Condiciones de Fermentación y Evaluac.                     | 08 |
| 1.3.3.- Ventajas y Desventajas.....                                | 09 |
| 1.4.- Producción de Enzimas.....                                   | 11 |
| 1.4.1.- Aislamiento de Enzimas.....                                | 12 |
| 1.4.2.- Elaboración de Siyao con Preparaciones<br>Enzimáticas..... | 13 |

### CAPITULO II.- MATERIALES Y METODOS.

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.- Materiales.....                                                                        | 16 |
| 2.1.1.- Materia Prima.....                                                                   | 16 |
| 2.1.2.- Cepas Microbianas.....                                                               | 17 |
| 2.1.3.- Medios de Cultivo.....                                                               | 17 |
| 2.1.4.- Equipos, Reactivos y Otros Materiales..                                              | 17 |
| 2.2.- Métodos.....                                                                           | 18 |
| 2.2.1.- Diseño Experimental.....                                                             | 18 |
| 2.2.2.- Preparación del Inóculo.....                                                         | 18 |
| 2.2.3.- Optimización de las Condiciones de<br>Crecimiento de <u>Aspergillus Oryzae</u> ..... | 19 |
| A.- Tratamiento y Acondicionamiento de las<br>Materias Primas.....                           | 19 |
| B.- Condiciones de Cultivo de Sustrato<br>Sólido.....                                        | 20 |
| C.- Dosaje Enzimático.....                                                                   | 21 |
| 2.2.4.- Obtención de una Preparación Enzimática<br>de Amilasas y Proteasas.....              | 24 |
| A.- Medio de Producción.....                                                                 | 24 |
| B.- Condiciones Optimas de Producción.....                                                   | 24 |
| C.- Obtención del Extracto y Preparación                                                     |    |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Enzimática.....                                                                                      | 25 |
| 2.2.5.- Evaluación Estadística.....                                                                  | 27 |
| CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIONES                                                              |    |
| 3.1.- Preparación del Inóculo.....                                                                   | 29 |
| 3.2.- Optimización de las Condiciones de Crecimiento<br>de <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 20386..... | 30 |
| 3.3.- Obtención de una Preparación Enzimática.....                                                   | 34 |
| 3.4.- Fermentación del Moromi.....                                                                   | 37 |
| CONCLUSIONES                                                                                         |    |
| RECOMENDACIONES                                                                                      |    |
| RESUMEN                                                                                              |    |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS                                                                           |    |
| ANEXO                                                                                                |    |



## INTRODUCCION

La elaboración del siyao y su aceptación en todo el mundo, ha despertado en estos últimos años el interés de buscar nuevas alternativas que satisfagan la creciente demanda del mercado, como la sustitución de la materia prima tradicional, "la soya" por productos autóctonos como el tarwi en nuestro medio. Lógicamente para el logro de éstas metas, se hace necesario buscar las condiciones más adecuadas que nos permitan obtener un producto de calidad competitiva, con menores costos de producción. Es así que nace la idea de buscar dichas condiciones, realizando un estudio científico de las variables que influyen determinadamente en la fermentación del siyao.

El logro de altos niveles de proteasas y amilasas fúngicas en la primera fase de elaboración del siyao conocido como el "koji" es importante y casi determinante pues es fuente de enzimas que degradarán los constituyentes de las materias primas a componentes de bajo peso molecular que proporcionarán el sabor, aroma y valor nutritivo al producto final.

Por otro lado la mezcla o sustitución, que comunmente se realiza en el mercado; del siyao auténticamente fermentado con el hidrolizado químicamente, afecta grandemente la calidad, sabor y aroma del producto. Es aquí donde el uso de biocatalizadores demuestra sus reales ventajas en relación a los reactivos químicos convencionales en estos procesos de interés industrial, pues estos no producen toxinas y su gran especificidad de acción posibilita que los mismos pueden ser utilizados con materiales bioquímicos complejos como son aquellos que forman parte de los alimentos y sus restos, sin causar cambios indeseables, además de que ejercen su acción bajo condiciones moderadas de temperatura y pH. El desarrollo de métodos de fermentación para la producción de enzimas asegura una potencialidad ilimitada en cuanto a su disponibilidad; así tenemos al método de fermentación en sustrato sólido, una técnica relativamente sencilla y actualmente empleada con mayor énfasis para la producción de enzimas por mohos, como por ejemplo la tradicional técnica de elaboración del koji.

Se trata pues de obtener un koji con altos niveles de actividad amilásica y proteolítica conociendo las condiciones óptimas de crecimiento de Aspergillus oryzae; condiciones que serán usadas también para obtener una preparación enzimática por fermentación en sustrato sólido de salvado de trigo, de tal manera que su utilización en la subsecuente fermentación en salmuera se logre una intensa actividad enzimática que acorte el tiempo de fermentación.

Bajo este contexto los objetivos planteados fueron los siguientes:

- 1.- Evaluar las condiciones óptimas de; aireación, humedad relativa, actividad de agua inicial del sustrato y temperatura durante el cultivo de Aspergillus oryzae ATCC 20386, para la producción de amilasas y proteasas por

fermentación en sustrato sólido.

- 2.- Obtener una preparación cruda de amilasas y proteasas para suplementar la fermentación en salmuera, con la finalidad de aumentar los niveles de actividad de éstas dos enzimas y alcanzar valores más altos de rendimiento de nitrógeno en un de fermentación más corto.
- 3.- Hacer un seguimiento de las variables: nitrógeno total, aminonitrógeno libre, azúcares reductores, acidéz, pH, actividad amilásica y proteolítica durante la fermentación en salmuera, y establecer el rendimiento de nitrógeno.

## CAPITULO I

### REVISION DE LITERATURA

#### 1.1. GENERALIDADES

El siyao es un líquido pardo oscuro de diferente fragancia con gusto salado que es usado como agente sazonador en la preparación de comidas y como un condimento de mesa. Es producto de una fermentación muy activa de hongos, bacterias y levaduras sobre una mezcla de soya, trigo y sal (Kalisz, 1980). La vía química es el segundo método de obtención, donde el sustrato es inicialmente hidrolizado por la acción de un ácido fuerte, y en una segunda fase se procede a una fermentación en salmuera (ITINTEC, 1984). Actualmente la elaboración del siyao ha desarrollado a un estado altamente tecnológico y llevado a una gran escala comercial, sin variar lógicamente el fundamento de su elaboración que se remonta inclusive a 3,000 años atrás (Beuchat, 1983). Inicialmente los granos de soya enteros, humedecidos y cocidos son mezclados con el trigo tostado y partido e inoculados con el cultivo

iniciador de Aspergillus oryzae o A. soyae. La mezcla es incubada por 2-3 días; y la masa resultante llamada Koji, es puesta en salmuera al 18 % al cual se le denomina, masa Moromi; éste al ser incubado con Pediococcus halophilus y Zigosacharomices rouxii a temperatura controlada da inicio a una fermentación láctica y alcohólica permitiendo que los constituyentes de alto peso molecular de la masa se hidrolicen. La masa Moromi es prensada, para obtener una solución cruda de siyao, el cual es parteurizado, filtrado y embotellado (Kalisz, 1988). A este procedimiento de elaboración por vía fermentativa lo llamaremos procedimiento tradicional. La utilización de materias primas y sus proporciones podría variar de acuerdo a las zonas de producción, éstas diferencias son las que van a caracterizar a los diferentes siyaos. Han habido intentos para elaborar siyao usando como materia prima otros insumos como: maní, avena, cebada y centeno sin haber logrado mucho éxito comercial (Yong y Wood, 1974). Sin embargo Mujica (1987) aprovechando la conocida tecnología de la soya, realizó investigaciones con la finalidad de demostrar a escala de laboratorio la posibilidad de emplear el tarwi en lugar de la soya, por su mayor contenido protéico y constituir un recurso propio de la zona, obteniendo resultados satisfactorios y superiores en sus características físico-químicas con respecto a los siyaos producidos en nuestro país. Queda mucho por investigar, y es la biotecnología quien ofrece muchas alternativas que permitan reducir los costos de producción sin alterar la calidad del producto. Así por ejemplo la fermentación del siyao con células inmovilizadas (Osaki, et.al. 1985), la elaboración del Koji con adición de soluciones enzimáticas de peptidasas (Beuchat, 1984), aunque su información es aún insuficiente en la elaboración del siyao.

## 1.2. MATERIAS PRIMAS

### 1.2.1. EL TARWI

El tarwi; Lupinus mutabilis, es un recurso protéico de la sierra peruana, que constituyó una de las principales fuentes de proteína vegetal en la alimentación popular del Tahuantinsuyo, pero la modificación de patrones alimentacio-nutricionales en los diversos geo-sistemas altitudinales que se dió en la colonia conllevaron a la disminución de la producción de más de 300 sp vegetales (Hurtado, 1982). El tarwi tiene gran importancia en zonas andinas donde justamente: la soya y otros cultivos protéicos están limitadas por razones ecológicas. Esta dicotiledonea de la familia leguminosa, es conocido como "tarwi" por los Aymaras, en el sur del Perú y Bolivia, Altramuz en España, "Chocho" en Ecuador y el norte del Perú y "chuchusmuti" en Bolivia. Crece a los 2500 a 4000 msnm y es bastante resistente a las sequías y heladas, poco exigente en cuanto a la calidad del suelo y clima, llegándose a sembrar también en terrenos marginales sembrados con maíz, habas, papas, etc. donde sirve como cerco biológico.

Sin embargo el tarwi presenta algunas desventajas que en cierta medida hacen poco aceptable su consumo. Su principio amargo debe a la presencia de más de 2 % de alcaloides como: la esparteína, lupanina, 13-hidroxilupanina, 4-hidroxilupanina, alfa-isolupanina y otros. (Paredes, 1983). Entonces se hace necesario reducir los alcaloides a menos del 0.01 % para que su consumo no sea tóxico, lo cual puede conseguirse por un proceso sencillo de lavado por la propiedad hidrosoluble de sus alcaloides (Jimenes, 1987).

Se han realizado investigaciones aisladas sobre muchos aspectos de esta importante leguminosa, con la finalidad de incentivar su mayor aprovechamiento en forma directa o indirecta.

Ccoillo-(1983) y León (1983) estudiaron los ritmos

de acumulación de proteínas tanto en hojas y granos de varios ecotipos procedentes de la provincia de Huamanga. García Blásquez (1979) y Paredes (1983) mostraron interés por el potencial alimenticio de sus granos realizando análisis químico-bromatológicos de varios ecotipos con la finalidad de obtener un concentrado protéico el que podría ser transformado en harina y ser usado en la panificación y otros productos elaborados.

Finalmente podemos decir que el estudio de los procesos fermentativos donde ésta leguminosa interviene como fuente rica de nitrógeno protéico aumenta las posibilidades de su industrialización.

### 1.2.2. EL TRIGO Y EL SALVADO DE TRIGO

El trigo en la elaboración del siyao y producción de enzimas cumple un rol muy importante.

- En el Koji el trigo ajusta la humedad del sustrato a niveles óptimos, aproximadamente a 45 %, de manera que crea una condición adecuada para una intensa actividad fúngica que se refleja en un mayor actividad enzimática.

- El trigo sirve como mejor fuente de carbohidratos, a partir de los cuales se forman, los azúcares, alcohol y ácidos orgánicos durante la fermentación, que contribuyen con el sabor y aroma del siyao.

- Sirve como fuente de lignina y glucósidos que son los presensores del sabor vanilínico del siyao; y

- Sirve como fuente rica de ácido glutámico uno de los principales responsables del aroma del siyao.

El uso del salvado de trigo en la actualidad se incrementa en las industrias de la fermentación. Como materia prima juega un rol casi determinante en los costos de sus productos, por su bajo costo y sus bondades nutricionales, ricos en vitaminas, fibras y minerales. (ver Tabla I). Prácticamente las 3/4 partes del costo de operación de un proceso de fermentación procede del medio de crecimiento, por lo

TABLA I : COMPOSICION QUIMICA DEL TARNI, TRIGO Y SALVADO DE TRIGO  
 (Guzman Et.Al., 1970 ; Salinas, R. 1988)

|              | % N  | PROTEINAS | GRASAS    | CH        | FIBRA    | CENIZA   | Ca       | P         | Fe        | Na       | K         | ViL.A    | ViL.B1    | ViL.B2    | NIACINA   |
|--------------|------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| TARNI        | 9    | 40 gr.%   | 13.4 gr.% | 27.3 gr.% | 9.3 gr.% | -        | 133 mg.% | 360 mg.%  | 7.3 mg.%  | -        | -         | 180 ug.% | 0.7 mg.%  | 0.32 mg.% | 1.5 mg.%  |
| TRIGO ENTERO | 13   | 14 gr.%   | 2.2 gr.%  | 65.1 gr.% | 2.3 gr.% | 1.7 gr.% | 36 mg.%  | 383 mg.%  | 3.1 mg.%  | 3.0 mg.% | 370 mg.%  | -        | 0.57 mg.% | 0.12 mg.% | 4.3 mg.%  |
| SALVADO      | 11.5 | 16 gr.%   | 4.6 gr.%  | 61.9 gr.% | 5.1 gr.% | 6.0 gr.% | 117 mg.% | 1267 mg.% | 14.9 mg.% | 5.0 mg.% | 1121 mg.% | -        | 0.72 mg.% | 0.35 mg.% | 21.0 mg.% |

NOTA : Estos valores se refieren a promedios. Pueden existir diferencias entre otras variedades del mismo producto



que se investiga constantemente otras fuentes alternativas de nutrientes biológicos que permitan beneficiarse de las fluctuaciones del precio, al mismo tiempo que suministren todos los nutrientes requeridos en el proceso de la forma mas económica posible. (Wiseman, 1986).

El salvado de trigo, conocido también como cáscara, afrecho o afrenecillo constituye el residuo de la molienda de distintas variedades de trigo. Está integrado principalmente por el pericarpio y las porciones más superficiales del endospermo. Su uso en la alimentación tiende a generalizarse después de muchos años en el que se lo consideraba un desecho cuyo principal destino era para formar parte de los alimentos balanceados para la cria de aves de corral y otros de granja. Estas circunstancias se debe a que se trata de una de las porciones mas ricas en distintos tipos de fibra que posee el grano (Salinas, 1988).

### 1.3. FERMENTACION EN SUSTRATO SOLIDO

① La fermentación en sustrato sólido es una técnica recientemente retomada por sus reales ventajas y sus reales costos de inversión. Se usa ésta terminología para describir a la fermentación en que el microorganismo crece sobre un sustrato predominantemente insoluble sin una fase líquida libre, y es usado para obtener productos especiales como la enzimas (amilasas, proteasas, pectinasas, lactasas, amiloglucosidasas, reninas, celulasas, invertasas, etc.), antibióticos y otros metabolitos secundarios con aflatoxinas, ochratoxinas, etc. (Hesseltine, 1972).

El contenido de humedad en ésta técnica es de 30-80 %, y los microorganismos cuyo crecimiento se adapta mas a las condiciones de baja actividad de agua y la presencia de sustrato sólido casi intratables son los hongos; por ésta razón que todas las preparaciones

enzimáticas producidas por ésta técnica son provenientes de hongos. (Frost y Moss, 1987).

**TABLA II**  
**ALGUNAS ENZIMAS PRODUCIDAS POR FERMENTACION**  
**EN SUSTRATO SOLIDO** (Frost y Moss, 1987)

| <u>ENZIMA</u>                               | <u>ORGANISMO</u>             | <u>ALGUNOS MEDIOS</u><br><u>COMUNES-</u> |
|---------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|
| Celulasa                                    | <u>Trichoderma viride</u>    | Salvado de Trigo                         |
|                                             | <u>Trichoderma reesei</u>    | Salvado de trigo                         |
| de Trigo<br>Amyloglucosidasa<br>Glucosidasa | <u>Trichoderma harzianum</u> | Salvado de                               |
|                                             | <u>Aspergillus niger</u>     | Salvado                                  |
|                                             | <u>Aspergillus Phoenicis</u> |                                          |
| Galactosidasa                               | <u>Aspergillus awamori</u>   |                                          |
| Invertasa                                   | <u>Aspergillus awamori</u>   |                                          |
|                                             | <u>Aspergillus niger</u>     |                                          |
| Proteinasa                                  | <u>Aspergillus oryzae</u>    | Salvado de Trigo<br>+ urea               |
| Renina                                      | <u>Mucor pusillus</u>        | Salvado de Trigo                         |
| Pectinasa<br>Arroz,                         | <u>Coniothyrium diplo-</u>   | Salvado de                               |
|                                             | <u>diella</u>                | desgrasado                               |
| Amilasa                                     | <u>Aspergillus niger</u>     | Salvado de Trigo                         |
| Lactasa<br>Trigo,                           | <u>Scopulariopsis sp</u>     | Salvado de                               |
|                                             | <u>Aspergillus niger</u>     | + Zn, Fe, Cu                             |
|                                             | <u>Fusarium moniliforme</u>  |                                          |

La fermentación en sustrato sólido ha sido usada en el Oriente por muchos siglos, proceso que ahora se conoce como koji, que involucra el crecimiento de hongos filamentosos como el Aspergillus oryzae o Aspergillus soyae, sobre una mezcla húmeda de arroz, soya y trigo, para producir una mezcla de enzimas amilolíticas y proteolíticas extracelulares que pueden

ser usados en la hidrólisis de otros sustratos, y efectuar el cambio de sabores. (Hesseltine, 1972).

Frost y Moss (1987), ha descrito diferentes tipos de fermentadores para esta técnica de fermentación, de los cuales mencionaremos las más usuales:

- El fermentador de tambores rotativos, en este diseño se usan tambores cilíndricos, dispuestos horizontalmente y usualmente montados sobre un rodillo que proporciona soporte y a la vez actúa como un dispositivo de rotación y mezcla. Estos diseños son usados especialmente en la producción de celulasa por Trichoderma viride.

- Un segundo tipo de fermentador suple los rodillos, con paletas dispuestas en el interior y que efectúan la mezcla del sustrato en fermentación.

- El sistema estacionario constituye el diseño más simple, pues usa sistemas de camas o bandejas aireadas donde el sustrato es tendido donde se realiza la fermentación sin agitación. La producción de amilasas y proteasas se realiza por este sistema.

- Y por último el sistema que convina el sistema rotativo y el sistema estacionario; donde el sustrato parcialmente fermentado es transferido de una cámara superior estacionario a otra inferior rotativa, donde la fermentación se concluye.

### 1.3.1. NATURALEZA DEL SUSTRATO Y SU PRE-TRATAMIENTO

Las materias primas más usadas como sustrato son los cereales de mayor importancia agro-industrial, como el trigo, maíz, el arroz y otros como la soya, y el salvado de trigo ya sean enteras o procesadas.

El pre-tratamiento de la materia prima a usarse es uno de los factores más importantes de la fermentación. El tamaño de las partículas del sustrato deben estar dentro de un rango limitado, de ahí la necesidad del pre-tratamiento, realizando el partido

del grano hasta en 5-6 veces. Actualmente el sustrato empleado para la producción de enzimas, por su bajo costo de inversión es el salvado de trigo simplemente humedecido o suplementado con algunas pocas sales, aunque el uso de las sales se hace menos necesario en los actuales procesos comerciales de producción.

El sustrato sólido debe estar dispuesto de tal forma que permita; la libre circulación del aire (especialmente en el sistema estacionario) y la libre expansión del micelio, además de que el volumen del sustrato en relación con las medidas del envase que los contiene no debe ser muy estrecha, de otra manera no se aseguraría una buena aireación y consecuentemente el éxito del proceso.

La esterilización del sustrato o medio sólido puede llevarse a cabo por presión a vapor a menudo a pH bajo que en lo común; por métodos químicos o por combinación de ambos, aunque los altos niveles de esterilización no se logran como en los métodos de fermentación sumergida, sin embargo no son necesarios por su misma naturaleza, pues su baja actividad de agua que inhibe el desarrollo de microorganismos contaminantes; permite que los sofisticados sistemas de protección de contaminantes no sean necesarios para obtener una operación satisfactoria. (Frost y Moss, 1987).

### 3) 1.3.2. CONDICIONES DE FERMENTACION Y SU EVALUACION

Luego de la esterilización y cocción del medio, éste es inoculado con una suspensión de esporas o inóculo vegetativo de la cepa del hongo escogido. El crecimiento y la expansión del micelio requiere de un tiempo generalmente de 1-10 días, a temperatura controlada en un rango de 25- 40 °C y con un nivel de humedad del sustrato que puede oscilar entre los 30-80%.

El control de estas dos variables puede causar problemas, ya que la producción de metabolitos calienta el medio, y la pérdida de humedad puede ser alta, perjudicando el normal crecimiento del microorganismo. La adición de agua durante la fermentación ha dado soluciones satisfactorias, pero es preciso determinar mediante ensayos la cantidad y momento adecuado de adición de agua, para no afectar la producción enzimática. Se usan también de manera usual soluciones que regulan la humedad del ambiente dispuestos en las partes bajas del fermentador, para que la pérdida de la humedad del sustrato sea menor (Nishio et.al. 1981).

El control del pH es generalmente imposible, pero un grado de control se puede efectuar por una adición juiciosa de un suplemento de sales de nitrógeno al medio (Frost y Moss, 1987). Estos y otros aspectos biológicos, químicos y físicos proporcionan un ambiente favorable para que se desarrolle un determinado proceso biológico.

Hacer un seguimiento de las variables que se desarrollan en la fermentación es dificultoso pero no imposible, ya que la inhomogenización del cultivo representa una dificultad de muestreo. Actualmente se ha logrado realizar una medición aproximada de la biomasa fúngica por métodos indirectos. Uno de ellos involucra la medición de la glucosamida, que se presenta como un componente común de todas las células fúngicas. Otros métodos implican la medición de la evolución de la tasa de  $CO_2$ , el consumo de  $O_2$  y principalmente la medición de las actividades enzimáticas.

### **1.3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

#### **Ventajas**

- Generalmente se usan medios muy simples por ejemplo; cereales cocidos a vapor a los cuales pueden añadirse trazas de sales inorgánicas.

- Ya que la fermentación se realiza en condiciones de baja actividad de agua, el crecimiento de muchas bacterias contaminantes es inhibida, por esta razón disminuye la necesidad de un proceso de esterilización extensivo.
- Debido a que la humedad del sustrato es bajo, el volúmen de medio por unidad de peso es bajo y consecuentemente la actividad de las enzimas por unidad de sustrato puede ser más alto, lo que no ocurre en un sistema sumergido.
- La fase de inóculo es generalmente innecesario, ya que puede sembrarse directamente con esporas, e inclusive con esporas germinadas, que permiten acortar la fase de letargo (Nakadai y Nasuno, 1988).
- La recuperación enzimática por extracción del sustrato fermentado con pequeñas cantidades de agua, puede darnos soluciones enzimáticas con altas concentraciones.

#### Desventajas

- Frost y Moss (1987) han descrito las desventajas asociadas a la producción de enzimas por ésta técnica.
- El proceso es limitado a los hongos, que pueden tolerar condiciones bajas de humedad.
- La medición de los parámetros del proceso es dificultoso puesto que el cultivo es bastante inhomogéneo.
- El control de pH, la temperatura, transferencias de oxígenos y el contenido de humedad es dificultoso.
- Muchos de los sustratos a excepción del arroz necesitan de pre-tratamientos.
- La cantidad de esporas que se necesita como inóculo es bastante grande.
- La adición de agua esteril, necesaria para mantener la actividad de agua en el sustrato aumenta las posibilidades de contaminación, además de que ésta cantidad y el momento en que se adicionan deben ser cuidadosamente determinados y controlados.

(Hesseltine, 1972).

#### **1.4. PRODUCCION DE ENZIMAS**

La elaboración de alimentos fermentados de importancia industrial, es el resultado de una serie de reacciones enzimáticas complejas y coordinadas dentro y fuera de la célula que intervienen en la fermentación. La industria aprovecha ésta propiedad de realizar ciertas transformaciones que resultan costosas, difíciles y requieren de mucho tiempo según las técnicas convencionales. (Mazza y Balatti, 1970).

Una posibilidad que actualmente toma mayor importancia es el uso de preparados enzimáticos en las fermentaciones industriales por presentar ventajas con respecto al uso de reactivos químicos convencionales.

Las enzimas localizadas dentro de la célula, presentan algunas dificultades para su extracción, a diferencia de las enzimas extracelulares que son recuperadas muy fácilmente, pues éstas enzimas que generalmente son hidrolíticas se secretan al medio de cultivo, y son solubles en soluciones acuosas.

En estos últimos años se venden anualmente en todo el mundo 1500 tn de enzima, no obstante 1250 tn de toda esta cantidad lo constituyen solamente 4 enzimas; las proteasas, glucoamilasas, alfa-amilasas y glucosa-isomerasas; el resto de otros cientos de enzimas que se venden en todo el mundo se purifican hasta la homogeneidad por lo que son muy caros y se venden solamente en miligramos por año y su aplicación está en su uso en las investigaciones más o menos sofisticadas. (Wiseman, 1986).

La primera etapa en la producción comercial de la enzima comienza con la selección del microorganismo que posee la capacidad de producción de la enzima deseada y con buenos rendimientos, además de presentar otras características como no ser patógeno, no producir sustancias tóxicas, ser estable

genéticamente, etc. En general las cepas que producen altos rendimientos de alfa-amilasa y proteasa se encuentran comprendidas dentro del género de *Aspergillus* y *Bacillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *B. subtilis*).

La mayor parte de las cepas con alta capacidad productora que actualmente se utilizan en las industrias provienen de mutantes que han sido obtenidos aplicando distintas técnicas de mutación genética, tales como métodos físicos, químicos y de recombinación genética.

Una segunda etapa consiste en escoger el sistema de fermentación adecuada, ya sea sumergido, semisólido o sólido. En cuanto al medio es importante tener presente que la composición del mismo puede decidir el éxito del proceso. Un medio de producción debe contener: fuentes de energía, de nitrógeno, factores de crecimiento, inductores, y sales minerales. El balance de estos componentes y la relación fuente de carbono-nitrógeno es fundamental en la producción de la enzima.

#### **1.4.1. AISLAMIENTO DE LAS ENZIMAS PRODUCIDAS**

Muchas de las enzimas producidas a partir de distintos organismos pueden tener uso comercial por lo que deben ser separados de las células que los producen y del medio de producción. Existen métodos físicos y químicos de extracción de estas enzimas.

Los métodos físicos son relativamente violentos y pueden ocasionar problemas ya que dañan las propias enzimas. La extracción química permite la liberación muy delicada de las enzimas, lo que necesita solamente una suave agitación para dispersar el agente químico de extracción utilizado durante el proceso. Las enzimas solubles y los producidos extracelularmente estarán siempre mezclados con las células que los producen, ácidos nucleicos, sales componentes del medio; que son



necesarios eliminar. Uno de los métodos más comunes de concentración es la precipitación con muchas variedades que se resumen en la Tabla III. (Wiseman, 1986).

En la precipitación con solventes orgánicos, éstas reducen la constante dieléctrica del medio acuoso disminuyendo la solubilidad de las proteínas permitiendo a las moléculas de proteína interactuar más fácilmente entre sí que con el agua. Las moléculas de disolvente también pueden intercambiarse con el agua que está unida a las proteínas lo que provoca la precipitación por deshidratación de la proteína. Estos tres efectos tienen lugar probablemente en la precipitación de proteínas. Las proteínas se precipitan satisfactoriamente con disolventes orgánicos siempre que la temperatura permanezca por debajo de 50°C. Por encima de esta temperatura puede tener lugar la desnaturalización de la proteína. Los disolventes deben ser miscibles con el agua y no deben ser fácilmente inflamables, como por ejemplo el isopropanol se ha utilizado para precipitar la amilaglicosidasa. También se han utilizado metanol, etanol, y acetona aunque su uso industrial es limitado debido a que son inflamables y relativamente caros.

Las enzimas se pueden precipitar y fraccionar con la técnica "salado" para lo que se utiliza sulfato amónico que es un compuesto económico, muy soluble, que se enfría al disolverse y es inocuo para la mayor parte de enzimas.

#### 1.4.2. ELABORACION DEL SIYAO CON PREPARACIONES ENZIMATICAS.

La producción eficiente de las enzimas de interés especialmente las amilasas y proteasas es muy importante en la economía de la fabricación del siyao elaborado con preparaciones enzimáticas, de Aspergillus oryzae. Generalmente la fuente de producción lo

constituye el salvado de trigo por constituir un desecho agrícola de bajo costo. La figura No.1 muestra el procedimiento de la elaboración del siyao con preparaciones enzimáticas, en éste procedimiento practicamente se obia la fase de

**TABLA III**

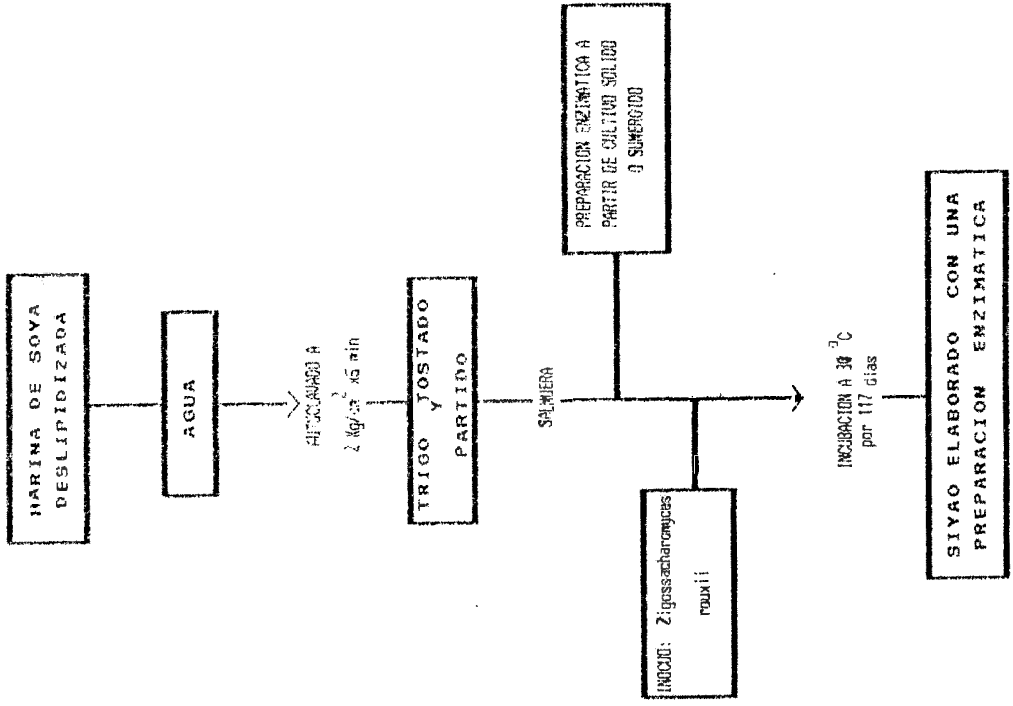
**ALGUNAS FORMAS DE CONCENTRAR ENZIMAS (Wiseman, 1986)**

| PRECIPITAC.           | AGENTE ESPEC.         | EFFECTIVIDAD | INCONVENIENTE.   |
|-----------------------|-----------------------|--------------|------------------|
| Sales inorg.          | Sulfato Amónico       | Muy Bueno    |                  |
|                       | Cloruro Sodio         | Regular      |                  |
|                       | Sulfato Sódico        | Bueno        |                  |
|                       | Acetato Cálcico       | Regular      |                  |
| Disolventes orgánicos | Acetona               | Bueno        | Peligro Incendio |
|                       | Etanol                | Bueno        | Peligro Incendio |
|                       | Isopropanol           | Bueno        | Peligro Incendio |
| Polímeros cargados    | Cetavión              | Bueno        | Costo            |
|                       | Sulfato de Protamina. | Bueno        | Costo            |
|                       | Polietylén-imina      | Bueno        | Costo            |
|                       | DEAE-Destrano         | Regular      | Costo            |

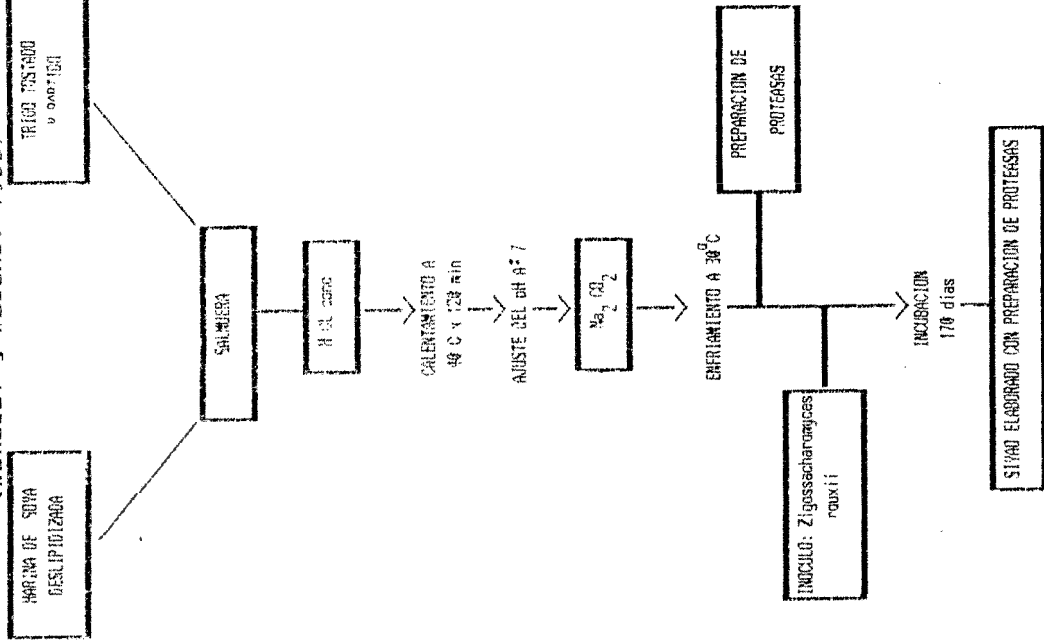
preparación del koji, fuente de enzimas, y se inicia directamente con la fermentación en salmuera de las materias primas ya tratadas (Nakadai y Nasuno, 1988). Los valores de pH, cantidad de alcohol, azúcares reductores y rendimiento de nitrógeno son superiores mediante este procedimiento que con aquel elaborado tradicionalmente. Aunque, ésta superioridad es relativa por una razón importante : Los preparados enzimáticos usados constan de enzimas extracelulares, pero no sólo éstos se encargan de realizar todo el trabajo, se han detectado algunas enzimas intracelulares del hongo que cumplen roles importantes y que favorecen el aroma y sabor del producto, es el caso de las glutaminasas y demás peptidasas. La presencia del primero va a aumentar la formación de ácido glutámico y otros aminoácidos responsables del aroma.

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE SIYAO CON UNA PREPARACION DE PROTEASAS, USANDO UN TRATAMIENTO ACTIVO

FIGURA No.1  
PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE SIYAO CON PREPARACIONES ENZIMATICAS (Nakadai y Nasumo, 1982)



(Nakadai y Nasumo, 1988)



PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE SIYAO CON UNA PREPARACION DE PROTEASAS, USANDO UN TRATAMIENTO ACTIVO

Actualmente se estudian métodos que permitan incrementar la presencia de éstos aminoácidos importantes. El tratamiento ácido del sustrato protéico es una de las alternativas que presenta Nakadai y Nasuno (1988), en este método el sustrato protéico (harina de soya desgrasada) es tratado con ácido clorhídrico para hidrolizar las proteínas a sus componentes simples (aminoácidos),seguidamente la mezcla ácida es neutralizada antes de proceder a la fermentación en salmuera a la cual se le adiciona recién la preparación enzimática (Ver figura N° 2)

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en los ambientes de los laboratorios de Bioquímica (para los aspectos físicos, bioquímicos) y Microbiología (para los aspectos microbiológicos) del presente trabajo de investigación.

#### 2.1. MATERIALES

##### 2.1.1. MATERIA PRIMA

Se utilizaron 20 Kg. de tarwi (Lupinus mutabilis) variedad "Oscar Blanco" procedentes del distrito de Acocro, 20 Kg de trigo (Triticum vulgare), variedad "Gavilán" y 12 Kg de salvado de trigo, adquirido en los molinos particulares de la localidad, que procesan diferentes variedades de trigo a harina de panadería. Se utilizó además 10 Kg de sal comercial a granel, no yodada.

### 2.1.2. CEPAS MICROBIANAS

Se utilizaron cepas industriales de:

- Aspergillus oryzae ATCC 20386
- Pediococcus halophilus ATCC 21786
- Zygosaccharomyces rouxii ATCC 34518

### 2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Papa Dextrosa
- Agar Malta
- Caldo extracto de Malta
- Medio Harold's M40Y
- Medio Acetato de Sodio
- Agar Glucosa Oxitetraciclina (OGA)

### 2.1.4. EQUIPOS REACTIVOS Y OTROS MATERIALES.

- Fermentador de vidrio para fermentaciones en Sustrato Sólido.
  - Bandeja de madera de 45 x 28.5 x 8 cm.
  - 03 Recipientes de vidrio de 10 Ltrs de capacidad.
  - Fotocolorímetro marca Fek 60
  - Estufa marca GANZ.
  - Baño Maria agitada, VIBROTHERM
  - Centrífuga marca ELZETT. Cap. 6000 rpm
  - pH-metro marca RADELQUIS tipo DP-205
  - Balanza analítica marca GANZ cap. 100 g.
  - Agitador magnético marca ASISTENT
  - Homogenizador marca BIOMIX
  - Agitador de paleta marca ER-10
  - Bomba de aire marca JUNIOR .
  - Proteasa alcalina de Aspergillus oryzae, Sigma, Chem.Co.USA.
  - Azocaseína, Fluka
  - Almidón soluble de papa, Fluka
  - Materiales de vidrio marca PYREX y RIMAX
  - Reactivos según métodos.
  - Otros equipos según métodos.

## 2.2 METODOS

### 2.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

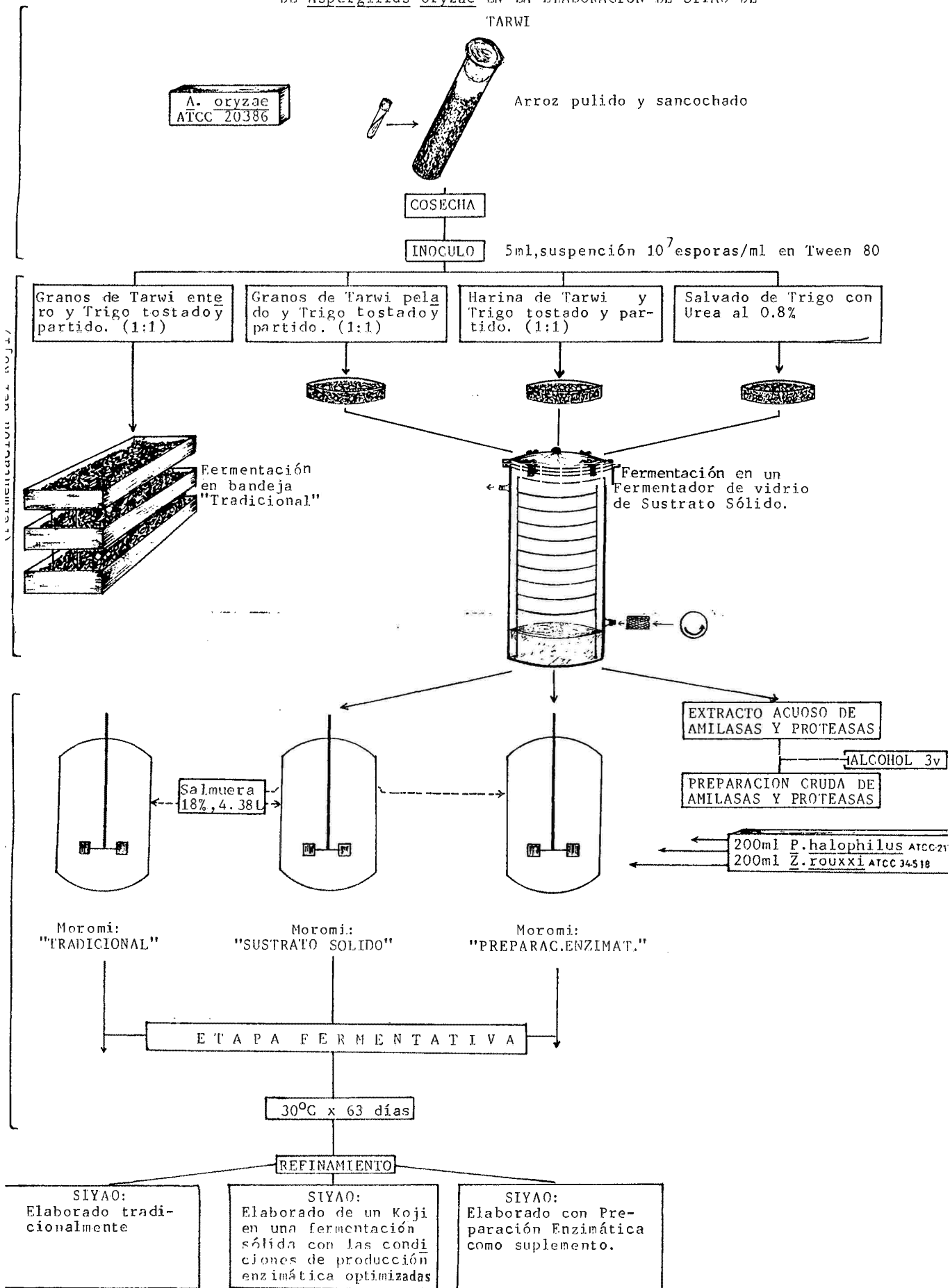
El presente estudio ha sido dividido en tres etapas. La primera etapa referido únicamente a la optimización de las condiciones de crecimiento de Aspergillus oryzae ATCC 20386 en una fermentación en sustrato sólido de una mezcla de tarwi y trigo en un fermentador de vidrio especialmente diseñado para este estudio, con la finalidad de lograr altos niveles de actividad enzimática. La segunda etapa se refiere a la obtención de un preparado crudo enzimático por fermentación sólida de salvado de trigo, con las condiciones anteriormente optimizadas y que será usado como suplemento en la fermentación en salmuera.

La última etapa constituye fermentación en salmuera o Moromi; para lo cual se ha considerado tres tratamientos, el primero de los cuales constituyó el testigo o patrón, que está referido al moromi que procede de un koji elaborado tradicionalmente. En el segundo y tercer tratamiento el koji es fermentado en el fermentador de vidrio, con la diferencia que el tercero es suplementado con la preparación enzimática. La fermentación en salmuera en sus tres tratamientos duró el tiempo en que alcanzaron más del 50% de rendimiento de nitrógeno.(ver figura No:4)

### 2.2.2. PREPARACION DEL INOCULO

El inóculo que posteriormente se utilizó para el cultivo del koji tanto en bandeja como en el fermentador de Sustrato Sólido, consistió en una suspensión de esporas de Aspergillus oryzae ATCC 20386 en solución Tween 80 al 1 % donde se alcanzó la mayor y mejor concentración determinado en un ensayo previo (La mejor concentración está determinada en función de la mejor actividad amilásica y proteásica alcanzada a un tiempo de fermentación con diferentes concentraciones de inóculo).

FIGURA No 4 : PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS DE *Aspergillus oryzae* EN LA ELABORACION DE SIYAO DE TARWI





Para ello se utilizaron tubos de ensayo de 36 x 210 mm en cuyas paredes se acondicionaron cuidadosamente arroz pulido y sancochado, para luego de ser esterilizado a 15 psi. x 15 min. inocularse con 2 ml de una suspensión de esporas en solución salina fisiológica, cuidando que la humedad del arroz resulte por niveles inferiores al 40 % de manera que se logre una buena esporulación, luego de una incubación por 10 días a 30°C. Pasado este tiempo se realizó la cosecha con 10 ml de solución Tween 80 al 1 %, agitando cuidadosamente el tubo para los granos de arroz no se desprendan junto con las esporas.

### 2.2.3. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE ASPERGILLUS ORYZAE ATCC 20386 EN LA ELABORACION DEL KOJI DE TARWI Y TRIGO

#### A. Tratamiento y acondicionamiento de las materias primas

Los granos secos de tarwi se remojaron con 0.7 lt. de agua (por cada Kg. de peso) a temperatura ambiente por 3.5 horas. Luego de escurrir el agua se cocinaron por 40 min., en solución de NaCl al 2 % en una proporción de 3 lt. por cada kg de grano amargo inicial. Seguidamente los granos cocidos completaron su desamargado en un recipiente con flujo constante de agua de río durante 72 hrs, tiempo en el cual se asume un 99 % de desamargado.(Zevallos, 1980). Los granos ahora desamargados, se pelaron manualmente, y fueron secados al sol,(a excepción de una porción que fue destinada a la elaboración del koji tradicional). La harina de tarwi se obtuvo después de la molienda del tarwi desamargado, pelado y seco.

El tiempo de cocción para el tarwi en el autoclave a 15 psi fue de 60 minutos, tiempo en el cual los granos adquieren un consistencia pastosa, al ser aplastados por las yemas de los dedos.(Beuchat,

1983).

El trigo fue tostado en una tostadora artesanal hasta tomar un color pardo-dorado y una textura crocante. Seguidamente se partieron los granos hasta en 4-5 partes en una moledora común de granos.

La proporción del tarwi y trigo se calculó de la siguiente manera: Para cada 100 gr. de koji (con 45-50% de humedad) se tomaron 27 gr. de tarwi y 27 gr. de trigo, que equivalen a tomar 75.7 gr. de tarwi humedecido y 24.3 gr. de trigo tostado. Puesto en el remojo el tarwi su peso aumenta en un orden de 180% y el trigo en el tostado disminuye por pérdida de humedad en un orden del 10 %.

#### **B. CONDICIONES DE CULTIVO EN SUSTRATO SOLIDO**

La mezcla de tarwi y trigo fue dispuesta en 10 placas de Petri de 150 mm con 150 gr. cada uno, dos de las cuales fueron usadas para determinar la actividad del agua inicial del sustrato,  $a_w$ ; y el porcentaje de humedad del sustrato, %HS; con que se inicia la fermentación. La  $a_w$  y %HS son dos magnitudes directamente proporcionales relacionadas por la siguiente ecuación:

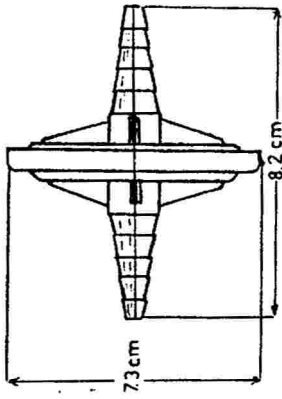
$$\% HS = w_m / 100$$

El resto de las placas fueron inoculados con 5 ml de la suspensión de esporas de Aspegillus oryzae, para luego ser incubados en un fermentador de vidrio, especialmente diseñado para fermentaciones sólidas, cuyas dimensiones se muestran en la figura N° 3, donde se buscó optimizar los parámetros tales como: tasa de aireación, humedad relativa, actividad del agua, y temperatura, a fin de alcanzar la máxima producción enzimática, en función a las actividades amilásica y proteásica.

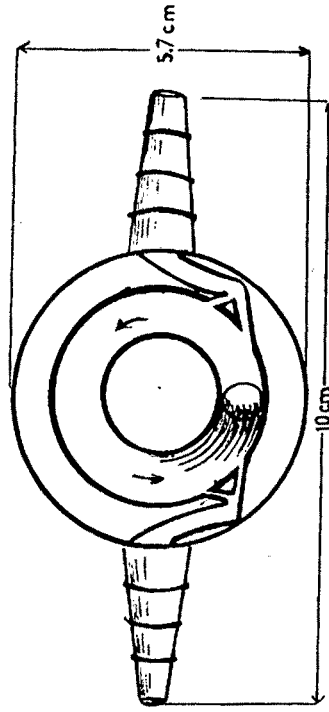
La tasa de aireación estuvo determinado por el

FIGURA N° 3 FERMENTADOR DE VIDRIO DE SUSTRATO SOLIDO Y SUS ACCESORIOS

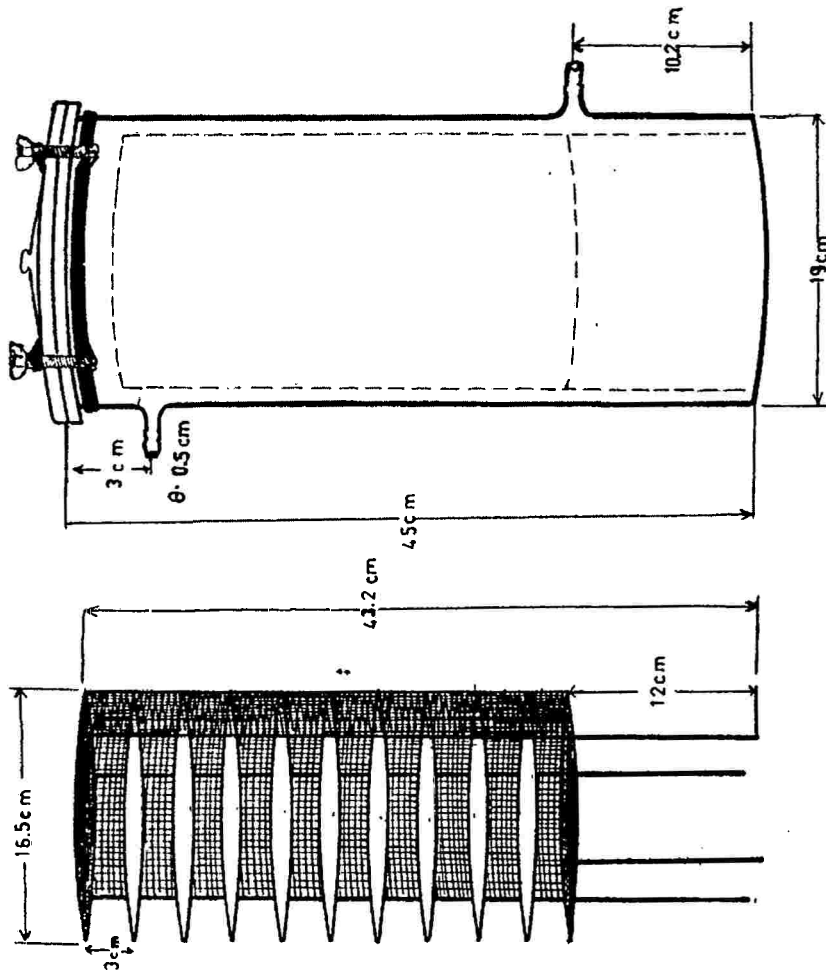
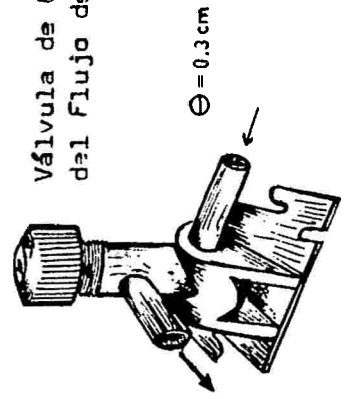
Filtro GELMAN Acro 50, 0.2  $\mu$ m



Medidor de Flujo de Aire, KATTELL-538



Válvula de Control del Flujo de Aire.



volúmen del aire esteril que ingresaba al fermentador en 1 lt/min. Se dispusieron para este fin 4 bombas de aire (tipo acuario) y una válvula que reguló el flujo de aire, además de un filtro de membrana de 0.2um, Gerlman, Acro 50.

El porcentaje de humedad reltiva, %HR; fue regulada por 1 lt de una solución de NaCl. a diferentes concentraciones molales a excepción del %HR = 75, que fue regulado por una solución de glicerina (Tabla IV)

La actividad de agua inicial deseada del sustrato, esterilizado se ajustó: por desecación hasta llegar a valores de 0.45 y 0.40 y adicionando agua esteril para los valores de 0.50 y 0.55.

La temperatura se reguló a 25, 30 y 37 °C. al introducir todo el fermentador en una estufa marca GANZ calibrada a las temperaturas respectivas.

### C. DOSAJE ENZIMATICO

5 El muestreo se realizó con intervalos de 12 hrs. (a excepción del primero que se realizó a las 24 hrs.) tomando una placa de sustrato fermentado, para ser suspendido a razón de 1:10 en función a su peso seco, con agua desionizada y luego sometido a agitación por 3 hrs. a 5 °C. El filtrado de la suspensión con papel Watman Nº 02, constituyó el extracto crudo de enzimas en donde se determinó las actividad de las enzimas solubles.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE AMILASAS

La determinación se realizó por un método modificado utilizando una solución de ácido picrico basado en Bergman, et.al. (1980).

#### Fundamento:

La acción de las amilasas sobre los carbohidratos, resulta en la liberación de moléculas más simples como la maltosa. La presencia de la maltosa

TABLA IV MOLALIDAD DE DIVERSOS SOLUTOS PARA DIFERENTES % DE  
 HUMEDAD RELATIVO Y ACTIVIDAD DEL AGUA (Aw) A 25 C

CHEFTEL Y CHEFTEL 1982

| %HR           | Aw             | MOLAL IDEAL     | NaCl            | CaCl2           | SACAROSA        | GLICERINA       |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 99.5          | 0.995          | 0.281           | 0.15            | 0.101           | 0.272           | 0.277           |
| 99            | 0.99           | 0.566           | 0.3             | 0.215           | 0.534           | 0.554           |
| 98            | 0.98           | 1.13            | 0.607           | 0.418           | 1.03            | 1.11            |
| 96            | 0.96           | 2.31            | 1.2             | 0.87            | 1.92            | 2.21            |
| 94            | 0.94           | 3.54            | 1.77            | 1.08            | 2.72            | 3.32            |
| 92            | 0.92           | 4.83            | 2.31            | 1.34            | 3.48            | 4.44            |
| <del>90</del> | <del>0.9</del> | <del>6.17</del> | <del>2.83</del> | <del>1.58</del> | <del>4.11</del> | <del>5.57</del> |
| 85            | 0.85           | 9.8             | 4.03            | 2.12            | 5.98            | 8.47            |
| 80            | 0.8            | 13.9            | 5.15            | 2.58            |                 | 11.5            |
| 75            | 0.75           | 18.2            |                 | 3               |                 | 14.8            |
| 70            | 0.7            | 23.8            |                 | 3.4             |                 | 18.3            |
| 65            | 0.65           | 30              |                 | 3.8             |                 | 22              |

puede cuantificarse indirectamente al tratarlas con el ácido, pícrico con el cual se forma un complejo coloreado (rojo), y su intensidad es directamente proporcional con la cantidad de maltosa presente. La actividad viene expresada como Unidades (U)/0.5ml de extracto enzimático. Los valores de actividad fueron calculados en base a una curva standard obtenida ploteando diferentes concentraciones de maltosa versus absorbancia. (ver Gráfica Nº 1) de donde : 1U= 1mg de maltosa liberada bajo las condiciones dadas.

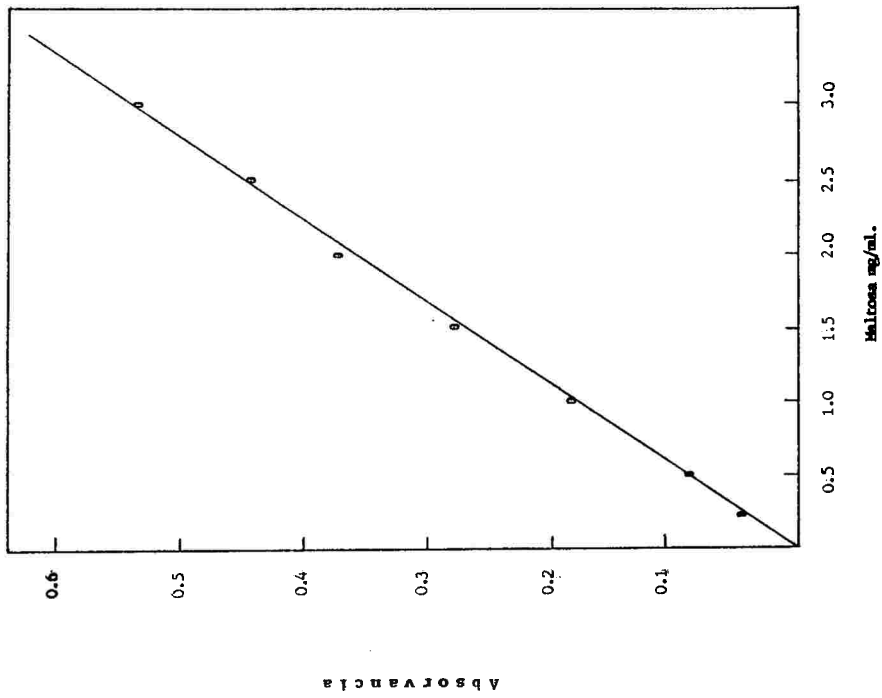
#### **Reactivos:**

- Buffer Acetato 0.1 M. Se preparó disolviendo 8.203 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . y 8.768g de NaCl en agua destilada, para 1 Lt de solución.
- Carbonato de sodio al 20% (p/v).
- Solución de Maltosa, 3mg/ml. Se preparo disolviendo 0,3g de maltosa monohidratada para 100ml de solución.
- Ac. Pícrico, 1.2%. este reactivo es altamente tóxico y en estado sólido es explosivo, por lo que se trabajó en campana de tiro y si pipetear directamente.
- Solución de almidón, 1.67%. Se pesaron 1.67g de amidón de papa y se colocaron en un matraz de 250 ml para completar a 100ml con agua y calentar a ebullición por 3 min. de tal forma que la temperatura aumente en forma progresiva.

#### **Procedimiento:**

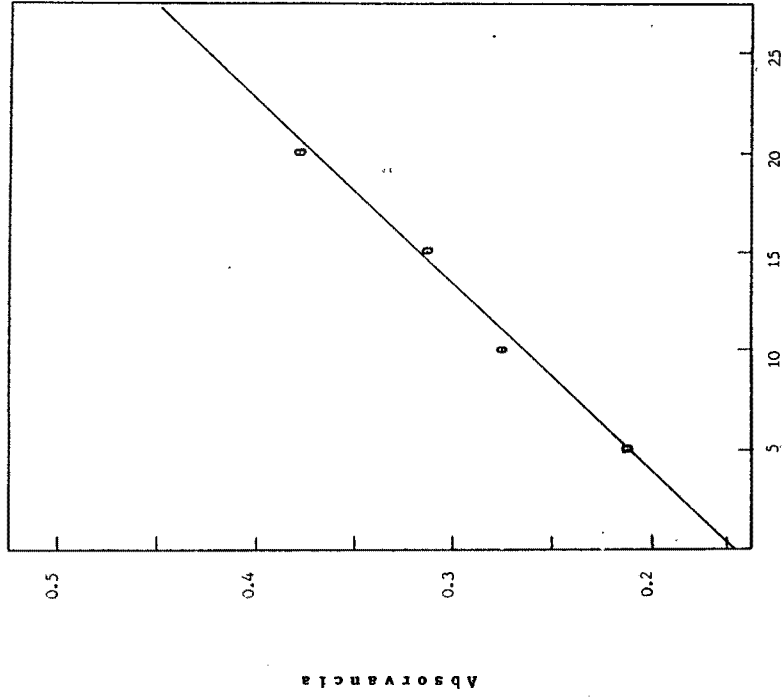
- Se colocó en un tubo de ensayo 3 ml de almidón 1.67%, con 1.5 ml de buffer acetato 0.1 M y NaCl 0.15 M para termostatarlo a 37°C por 15 min.
- Seguidamente se añadió 0.5 ml de extracto crudo, que da inicio a la reacción. Luego de tres min. se tomó una alícuota de 0.5 ml y se mezcló con 0.5 ml de carbonato de sodio para bloquear la reacción.
- Inmediatamente se añadió 1.5 ml de ác. pícrico y se llevo a Baño María en ebullición por 10 min.
- La solución coloreada resultante se diluyó con agua a razón de 1:3 y se determinó su absorbancia en un

**GRAFICA NO. 1** : CURVA ESTANDARD CON MALTOSA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILASICA



Fotocolorímetro: FEK-60  
Filtro verde  
1.0 cm de paso  
Laboratorio de Bioquímica  
1992

**GRAFICA No.2** : CURVA STANDARD CON PROTEASA ALCALINA DE *Aspergillus oryzae* PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA



Proteasa Alcalina mg/ml x 10<sup>3</sup>  
Fotocolorímetro: FEK-60  
Filtro azul  
1.0 cm de paso  
Laboratorio de Bioquímica  
1,992

fotocolorímetro Fek 60, filtro verde (530nm)

- El blanco del sustrato estuvo constituido de 0.5 ml de almidón, 0.5 ml de agua destilada, 0.5 ml de carbonato de sodio y 1.5 ml de ác. pícrico.
- El blanco de reactivos consistió en 0.5 ml de agua destilada, 0.5 ml de carbonato de sodio y 1.5 de ác. pícrico.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Se determinó por el método de la azocaseína reportado por Manoj, et.al. (1988).

##### Fundamento:

- La acción de las proteasas sobre la azocaseína resulta en la liberación de grupos peptídicos que determinan la producción de color y que son útiles en la detección y estimación cuantitativa de la proteasa. es así que la azocaseína tiene ventajas con respecto a la caseína normal. Este nuevo compuesto presenta una reacción coloreada, una reacción específica, y es soluble en agua. La actividad viene expresada en U/0.1 ml de extracto enzimático, a partir de una curva standard obtenida ploteando diferentes concentraciones de Proteasa Alcalina de Aspergillus oryzae versus absorvancia (ver gráfica Nº 2) de donde: 1U = 1mg de proteasa bajo las condiciones dadas.

##### Reactivos:

- Buffer Borato, 0.2M, pH 7.5. Se pesó 12.078g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y se disolvieron en 1 Lt.
- NaOH 2M Se disuelven 39.977g de NaOH en 0.5 Lt de solución.
- Azocaseína 4,5mg/ml. Se disolvieron 0.45g de azocaseína en buffer borato 0.2M hasta completar 100ml.
- Enzima. Se disolvieron cuidadosamente 175mg de proteasa de Aspergillus oryzae, Sigma, Type XXIII en agua destilada hasta completar 100ml, a partir del cual se realizaron las respectivas diluciones para obtener la curva standard.



**Procedimiento:**

- En un tubo de ensayo se colocaron 1.8ml de la solución de azocaseína tamponada y se termostataron a 37°C por 15 min.
- Se añadió seguidamente 0.2ml de extracto enzimático y se incubó a 37°C por 60 min. y al cabo de éste tiempo se detuvo la reacción por adición de 2ml de ATA.
- El blanco de sustrato estuvo constituido de 1.8ml de azocaseína, 2ml de ATA y 0.2ml de extracto, y el blanco de reactivos de 2ml de agua destilada y 2 ml de ATA.
- Los tres tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y a una alícuota de 3 ml de sobrenadante se le añadió 1.5 ml de NaOH 2N para estabilizar la reacción.
- Las lecturas de absorvancia se realizaron en un fotocolorímetro Fek 60 ,filtro azul(445nm) en cubetas de 1 cm. de paso.

**2.2.4. OBTENCION DE UNA PREPARACION ENZIMATICA DE AMILASAS Y PROTEASAS.**

**A. MEDIO DE PRODUCCION**

Para la obtención de una preparación enzimática en donde la mayor parte está constituido de amilasas y proteasas extracelulares se ha utilizado el salvado de trigo o afrecho.

Se humedecieron 860 grs. de salvado con 640 ml de agua corriente y se esterilizaron en un autoclave a 15 psi por 15 min.

**B. CONDICIONES OPTIMAS DE PRODUCCION**

El proceso fermentativo de producción de amilasas y proteasas se llevó a cabo en el fermentador de sustrato sólido, donde se colocaron 10 placas de 150 mm con 150 grs de medio cada uno. Los parámetros de: tasa de aireación, humedad relativa, actividad de agua y temperatura fueron ajustados a los valores obtenidos anteriormente (sección 2.2.3.8) determinándose además la necesidad o no de adicionar sales nitrogenadas al

medio.

### C.OBTENCION DEL EXTRACTO Y PREPARACION ENZIMATICA

La extracción de las enzimas extracelulares y solubles en agua, se realizó por remojo en agua del sustrato fermentado, inicialmente en una proporción de 1:10 en función a su peso seco, determinándose el tiempo temperatura y agitación óptima que favorece una buena extracción, todos en función a sus actividades enzimáticas de amilasas y proteasas.

La solución resultante luego de un filtrado constituyó el extracto crudo enzimático, el cual fue sometido a un proceso de concentración, usando los métodos de precipitación protéica con alcohol etílico y sales de sulfato de amonio indistintamente.

A un volumen de extracto se le adicionó alcohol 96º o sulfato de amonio, en diferentes proporciones, para determinar la concentración final en que las moléculas protéicas se insolubilizan y precipitan luego de permanecer almacenado a 5 ºC por 18 hrs. Los precipitados resultantes fueron colectados por centrifugación, desecados en una estufa aireada a 25 ºC desecados y finalmente pulverizados, constituyendo este polvo, el preparado enzimático. (Nakadai y Nasuno, 1988) (Di Jeso, 1968).

Para efectos de determinar la efectividad del proceso en términos de porcentaje de recuperación de la enzima; los precipitados de un volumen conocido de extracto, fueron resuspendidos nuevamente en agua desionizada al volumen inicial del extracto, al cual se determinó su actividad enzimática, relacionándolo luego con la actividad del extracto sin ser sometida a precipitación (que constituye el 100 % de actividad).

#### 2.2.4. FERMENTACION DEL MOROMI

El moromi constituyó para los tres tratamientos la fermentación en salmuera del koji de

tarwi y trigo elaborados con las siguientes particularidades.

El primer tratamiento "TRADICIONAL": el moromi procedía del koji elaborado en bandejas de 45 x 28.5 x 8 cm usando tarwi entero desamargado, y trigo partido.

El segundo tratamiento "SUSTRATO SOLIDO": EL koji fue elaborado en el fermentador de sustrato sólido y con las condiciones de crecimiento óptimas, usando tarwi pelado desamargado y trigo partido.

El tercer tratamiento "PREPARACION ENZIMATICA": el koji fue igual al segundo con la diferencia que el tarwi estaba en forma de harina, además, en la fermentación del moromi se adiciona 49.2 grs. de un preparado enzimático para agilizar la fermentación.

Teniendo en cuenta estas particularidades, 1.5 kg de koji fue transferido a un recipiente 10 lt de capacidad, conteniendo 4.38 lt de solución salina al 18% que equivalen al 140% del volumen que ocupa 1.5 kg de koji.

Los tres fermentadores dispuestos de cucharones que facilitaron la homogenización periódica y el muestreo; fueron llevados a una estufa calibrada a 30 °C. por espacio de 2 meses. El contenido de los fermentadores fue agitado diariamente por el primer mes y luego 3 veces por semana.

Los inóculos de *Pediococcus halophilus* ATCC 21786 y *zigosacchamomyces rouxii* ATCC 34518 correspondieron al 5 % del volumen del moromi. 200 ml de cada uno se inocularon al tercer día de iniciada la fermentación en salmuera, luego de realizar estudios previos de crecimiento tanto de la bacteria como de la levadura a diferentes y crecientes concentraciones de sal, para determinar el tiempo y la concentración de sal óptimas en el momento de inoculación (fig.Nº 05 Anexo).

La concentración del inóculo de la bacteria fue  $15 \times 10^5$  en el medio Acetato de Sodio modificado por

Taniguchi et. al. (1988), y de la levadura fue  $22 \times 10^4$  en un medio YM modificado por Watanabe y Takakuwa, (1987).

Se realizaron los controles quincenales de las variables: nitrógeno total, nitrógeno amínico, acidez, pH y azúcares reductores durante 2.5 meses tiempo en el cual el rendimiento de nitrógeno en los tres tratamientos superó el 50 %.

El muestreo quincenal consistió en la toma de 70 ml de moromi luego de realizar una vigorosa agitación en el fermentador. Esta muestra fue prensada manualmente con una doble tela de nanzú, y luego filtrada en papel Watman Nº 2 para ser sometido a los diferentes análisis inmediatamente. Los métodos de los análisis fisico-químicos fueron los recomendados por la ITINTEC (1984), usando reactivos de las marcas: Fluka, Merk, Sigma, Aldrich, etc.

- Nitrógeno total:  
Método Micro-Kjeldahl
- Amino-nitrógeno:  
Método de Wort para Amino Nitrógeno libre
- Azúcares Reductores:  
Método del Reactivo de Muller
- pH :  
Método del pHmetro.
- Acidez :  
Método de titulación ácido-base
- Además se realizó la determinación de la actividad amilásica y proteásica durante la fermentación del moromi.

#### 2.2.5. EVALUACION ESTADISTICA

Todos los datos de los parámetros estudiados en el fermentador de sustrato sólido para optimizar las condiciones de crecimiento del hongo, fueron sometidos a un diseño experimental de dos vías, según las siguientes especificaciones:

- 1ra. Vía: 07 tiempo de fermentación: 24 horas; 36 horas; 48 horas; 60 horas; 72 horas; 84 horas; y 96 horas.

- 2da. Vía : (Parámetros de fermentación)

- a) 03 tasas de aireación; baja, media, alta.
- b) 04 % de humedad relativa: 75, 85, 90 y 96.5%
- c) 04 actividades de agua: 0.40, 0.45, 0.50 y 0.55
- d) 03 temperatura de fermentación: 25, 30 y 37.5 °C.
- e) 02 fermentaciones de salvado: con Urea y sin urea

Todos los datos de las variables físico-químicas obtenidas durante los dos meses de fermentación del moromi fueron sometidos a un diseño completamente randomizado en arreglo factorial de 3 x 5 con dos repeticiones:

- 1er. Factor: Naturaleza del Moromi (M) con tres niveles:

|     |                          |   |
|-----|--------------------------|---|
| M.1 | = Tradicional            | 1 |
| M.2 | = Sustrato Sólido        | 2 |
| M.3 | = Preparación enzimática | 3 |

- 2do. Factor: Tiempo de fermentación (F) con cinco niveles:

|     |                           |   |
|-----|---------------------------|---|
| F.1 | = 03 días de fermentación | 1 |
| F.2 | = 18 días de fermentación | 2 |
| F.3 | = 33 días de fermentación | 3 |
| F.4 | = 48 días de fermentación | 4 |
| F.5 | = 63 días de fermentación | 5 |

## CAPITULO III

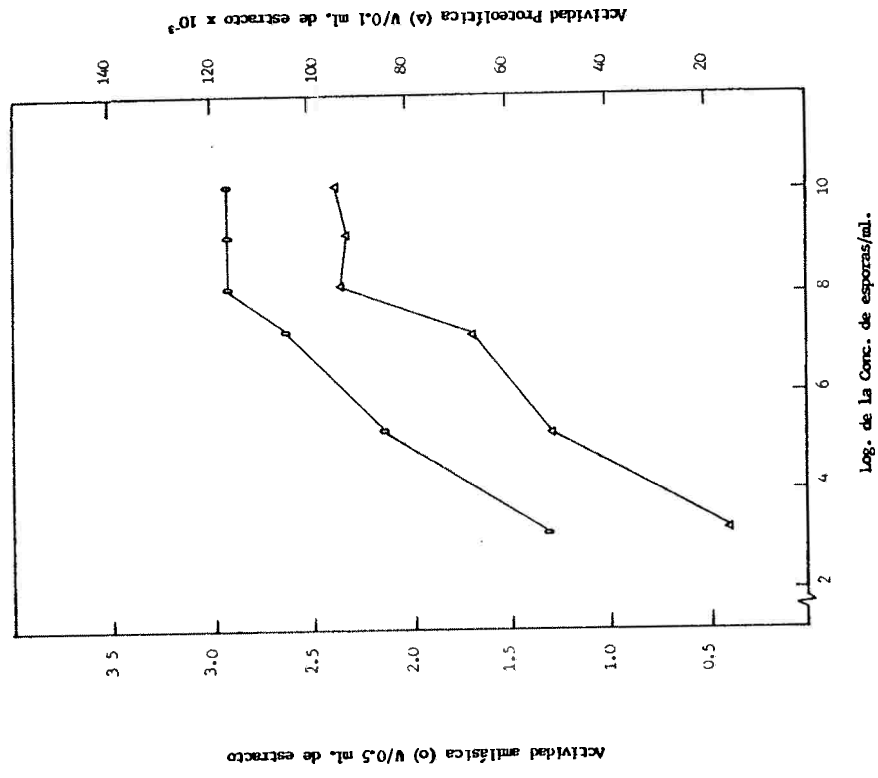
### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 2.1. PREPARACION DEL INOCULO

Para obtener un buen siyao no solo hace falta una buena materia prima, también es necesario una cepa con altos niveles de producción amilásica y especialmente proteolítica. Por esta razón se adquirió una cepa industrial de Aspergillus oryzae a la American Type Culture Collection recomendada para la elaboración del siyao por el Instituto para la Investigación Científica del Japón-NODA.

Luego de reactivar la cepa liofilizada en caldo y Agar Malta, se procedió a multiplicar el hongo en 5 tubos de 26 x 210 cm con arroz pulido y sancochado, de los cuales se cosecharon con 400 ml de Tween 80 las esporas formadas al cabo de 10 días de incubación. La concentración de ésta suspensión fue de  $10^6$  esporas/ml, y luego reconcentraciones sucesivas por centrifugación, la concentración fue de  $10^7$  esporas/ml.

**GRAFICA No. 3 : VARIACION DE LA ACTIVIDAD AMILASICA Y PROTEOLITICA SEGUN LA CONCENTRACION DE ESPORAS EN EL INOCULO.**



**TABLA V : EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ESPORAS DEL INOCULO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS**

| CONCENTRA DEL. INOCU | Log esporas m/l | ACTIVIDAD AMILASICA | ACTIVIDAD PROTEOLIT. |
|----------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| $14 \times 10^2$     | 3.145           | 1.534               | 15.162               |
| $14 \times 10^4$     | 5.145           | 2.112               | 51.598               |
| $14 \times 10^6$     | 7.145           | 2.612               | 67.586               |
| $14 \times 10^7$     | 8.145           | 2.89                | 93.728               |
| $14 \times 10^8$     | 9.145           | 2.945               | 92.842               |
| $14 \times 10^9$     | 10.145          | 2.934               | 93.627               |

ACTIVIDADES DE UN CULTIVO DE 72 HRS. e  
 10 CC. Aireación moderada y 20% de HF

La figura Nº 3 muestra la actividad amilásica y proteolítica en un koji de tarwi y trigo de 72 horas de fermentación usando 5 ml de inóculo a diferentes concentraciones. Se puede apreciar claramente que ambas actividades se hacen máximas y constantes desde una concentración de  $10^7$  esporas/ml y sus valores (ver Tabla V, Anexo) nos permitieron elegir la concentración de inóculo óptimo y que fue usada en todas las fermentaciones sucesivas. Entonces la menor concentración que arrojó la mayor actividad fue  $10^7$  esporas/ml.

## **2.2.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *Aspergillus oryzae* ATCC 20386**

La primera parte del estudio consistió en optimizar las condiciones de crecimiento en un fermentador de sustrato sólido teniendo en cuenta 4 parámetros.

El medio de fermentación para todos los casos fue la mezcla de tarwi y trigo (1.1) e inoculados 5 ml. de una suspensión de  $10^7$  esporas/ml. para cada placa con 150 gr de medio.

El tiempo de cultivo del koji normalmente se realiza por 72 hrs para no permitir una excesiva esporulación que podría dar un sabor indeseable al siyao (Yong y Wood, 1974). Nosotros hemos tratado de prolongar este tiempo con la finalidad de incrementar la actividad enzimática sin promover una mayor esporulación.

### **2.2.1. TASA DE AIREACION**

El metabolismo aerobio del hongo hace necesario el suministro de oxígeno en la fermentación sólida. La gráfica Nº 4 muestra los cursos de producción de amilasas y proteasas en cultivos con tres diferentes tasas de aireación: baja, media y alta que equivalen a 60, 140 y 280 lt/hr respectivamente. Encontrándose con un nivel de confianza de 1%



diferencias altamente significativas entre las tasas de aireación para la producción de proteasas, mas no así para la producción de amilasas. Con respecto al tiempo de fermentación en horas, hay diferencias significativas entre los 7 tiempos para la producción de las mismas enzimas, esto debido fundamentalmente a que el contenido de humedad del sustrato que está menos o mas aireado tiende a mantener o disminuirse respectivamente a niveles no óptimos y consecuentemente afectar la producción enzimática. La tabla VI (Anexo) nos dá una idea más clara de esta afirmación; el contenido de humedad disminuye de 50.9 % a 36.7 cuando la aireación es baja, y disminuye a 21.1% cuando la aireación es alta.

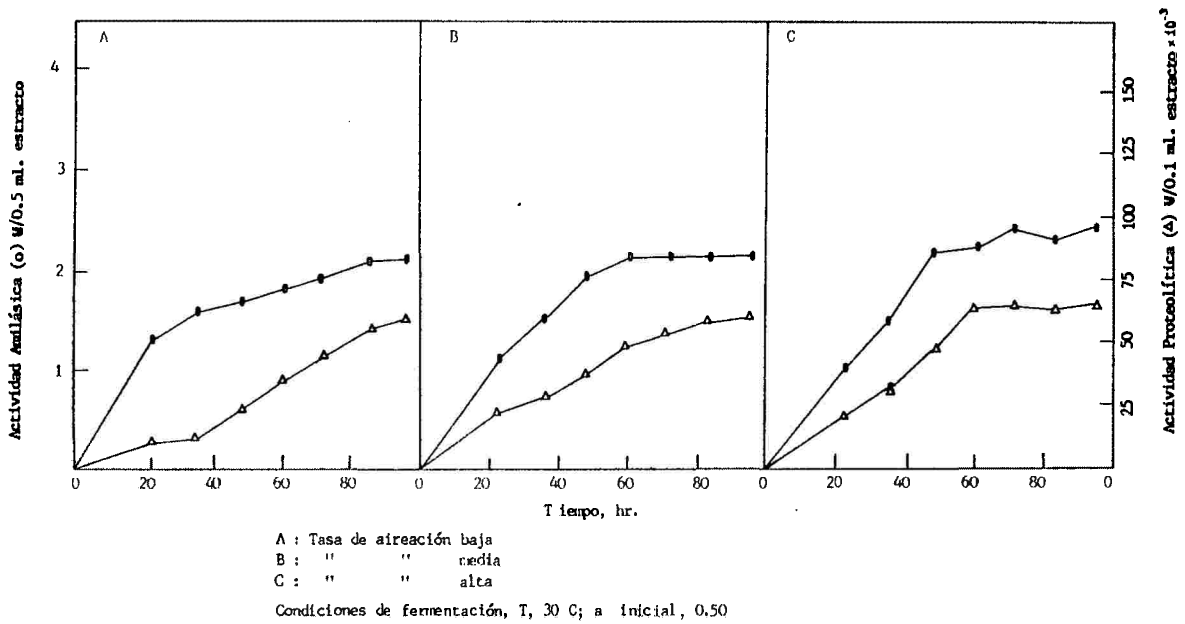
Al respecto Nakadai y Nasuno (1988) reportan que en una fermentación sólida de salvado de trigo con aireación forzada los niveles del contenido de humedad decrecen a menos de 30% en solo 35 hr, hecho que ocasionó el cese de la producción enzimática a partir de éstos momentos.

### 2.2.2 HUMEDAD RELATIVA(%)

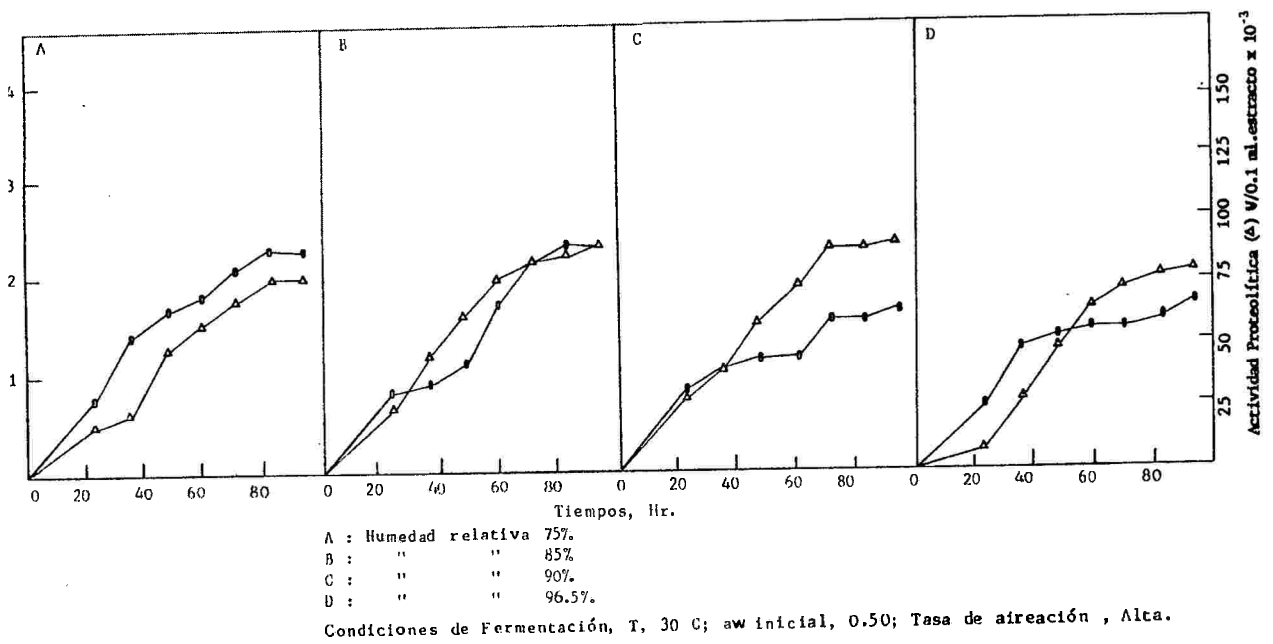
Con la finalidad de disminuir el efecto deshidratante del aire seco que circula como se vió en el ensayo anterior, se colocó una solución de NaCl o glicerina que reguló la humedad del aire que circula en el interior del fermentador a valores de 75 a 96.5% de humedad.

La Gráfica Nº 5 muestra el efecto de la humedad relativa en los cursos de producción de amilasas y proteasas, encontrándose diferencias altamente significativas en todos los casos, es así que para la producción de amilasas los valores más altos corresponden a la fermentación con 85% de humedad relativa, mientras que para la producción de proteasas los niveles óptimos se encuentran a los 85 y 90%. Las diferencias podrían deberse fundamentalmente al

GRAFICA No. 4 : EFECTO DE LA TASA DE AIREACION, EN LOS CURSOS DE PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS.



GRAFICA No. 5 : EFECTO DE LA HUMEDAD RELATIVA (%) EN LOS CURSOS DE PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS



mayor o menor tiempo en que la actividad del agua del sustrato que permanece próximo a sus niveles óptimos de producción. La tendencia siempre al equilibrio en todo sistema es aplicable también al contenido de humedad dentro del fermentador, es así que el sustrato tiende a perder humedad hasta llegar al equilibrio con la humedad de su medio ambiente, y este efecto se ven acentuados con la presencia del flujo de aire. Entonces la cantidad de agua disponible o actividad de agua del sustrato ( indispensable para el metabolismo del hongo) se reduce considerablemente. ( Cheftel y Cheftel 1982).

Cabe mencionar que cuanto más próxima esté la humedad relativa a saturación surgen problemas como: las partículas de agua suelen condensarse obstruyendo los poros del filtro de membrana, e inclusive crean trampas de agua en los tubos que conducen el aire ocasionando una aireación insuficiente.

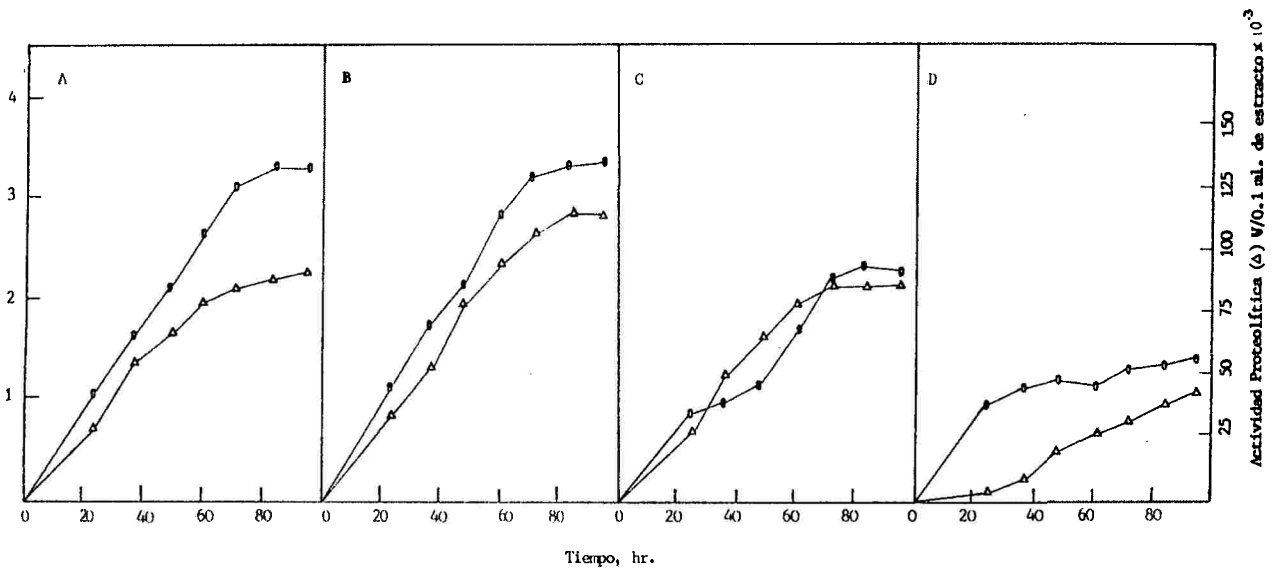
### 2.2.3. ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ )

Quizá uno de los parámetros que determina el éxito de una fermentación sólida es el contenido de humedad del sustrato, expresado en actividad del agua, dentro de ello la actividad del agua al inicio de la fermentación es determinante, para la germinación de esporas y su adaptación, que son precursores de una buena y posterior producción enzimática.

La fermentación que muestra una alta producción enzimática es aquella iniciado con 0.45 de  $a_w$ . Estadísticamente se encontraron diferencias altamente significativas en todos los casos (ver Gráfica Nº 6 y Tabla VIII, anexo).

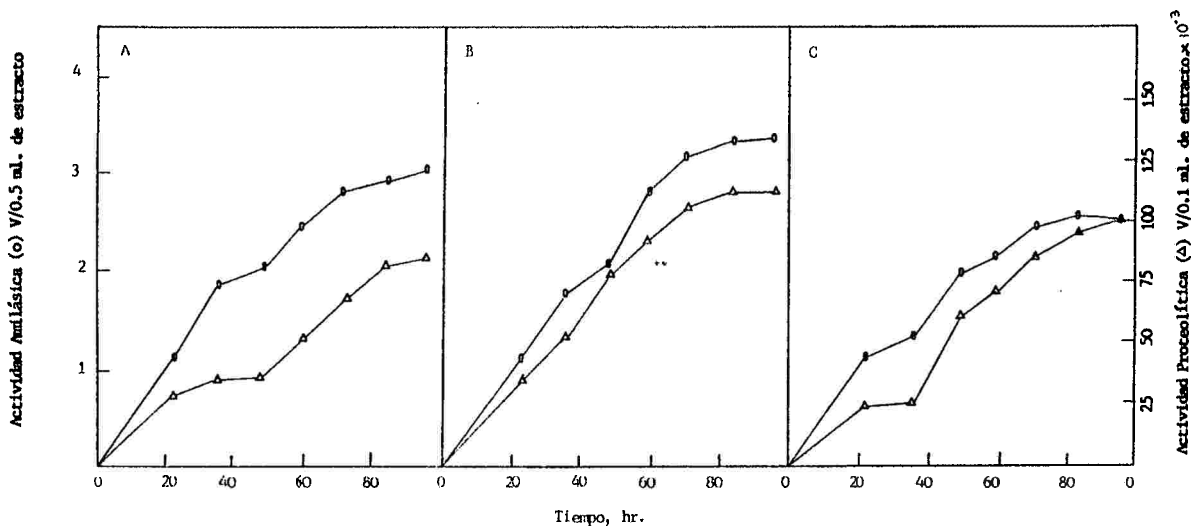
Frost y Moss (1987) considera a la  $a_w$  como una de las variables más importantes que se deben tener en cuenta, además de la temperatura del sustrato, y nosotros estamos de acuerdo; de la tabla Nº IX (anexo) podemos deducir que: una fermentación iniciada a 0.45

**GRAFICA No. 6** : EFECTO DEL ACTIVIDAD DEL AGUA ( $a_w$ ) INICIAL DEL SUSTRATO EN LOS CURSOS DE PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS.



Condiciones de fermentación; T, 30°C; Tasa de Aireación, Alta; HR, 85%.

**GRAFICA No. 7** : EFECTO DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACION EN LOS CURSOS DE PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS.



Condiciones de fermentación: Tasa de aireación, alta; HR, 85%;  $a_w$  inicial, 0.45.

de agua produce 163% y 241% más de proteasa y amilasa respectivamente, que una fermentación iniciada a 0.55. Gervais, et al. (1987) afirma que una leve variación del contenido de humedad del sustrato conduce a un decrecimiento drástico en el crecimiento y esporulación de los hongos. Por su parte Beuchat, (1983) recomienda iniciar con 45% de humedad y se mantenga durante la fermentación entre 37 y 27% para garantizar una alta actividad del koji. Mujica (1987) inició la fermentación del koji en bandeja con 38% decreciendo al final hasta 21%. Las pérdidas excesivas de humedad pueden ser contrarrestadas con la adición de agua esteril en cantidad y tiempo determinado cuidadosamente para no influir perjudicialmente en el crecimiento. Nakadai y Nasuno (1988) siguieron este procedimiento, añadiendo agua esteril a las 20 hrs de incubación logrando así que la humedad no disminuya a menos del 25%.

#### 2.2.4. TEMPERATURA

La Gráfica Nº 7 muestra la tendencia de los diferentes valores de actividad amilásica y proteásica a 25, 30 y 37 °C, encontrándose diferencias altamente significativas entre las temperaturas solo para la producción de proteasas, de igual manera las diferencias entre los tiempos de fermentación fueron altamente significativas tanto para la producción de amilasas y proteasas. Los nos hace suponer que la temperatura óptima de producción de proteasas está al rededor del 30%, mientras que la producción de amilasas no fue afectada significativamente a los 37 °C.

Al respecto Yokotsuca (1972) menciona que temperaturas alrededor de 35 °C son las adecuadas para una buena producción de proteasas por Aspergillus oryzae. Beuchat (1984), por su parte aconseja mantener la temperatura del koji de 25-35°C con una temperatura

óptima de 30 °C.

En una fermentación en sustrato sólido el control estricto de la temperatura es muy difícil, pues al calibrar la temperatura de la estufa a 30°C por ejemplo, no se asegura con esto que el sustrato en fermentación se encuentre a la misma temperatura, generalmente un koji cultivado con aireación insuficiente llegará a tener temperaturas mayores de 40°C, lo cual no es recomendable para una eficiente producción enzimática. (Yong y Wood, 1974). Entonces la importancia de una buena aireación, implica también mantener la temperatura a valores próximos a lo deseado. Frost y Moss, 1987 afirman que el incremento de la temperatura en el sustrato es reflejo de una intensa producción de metabolitos.

### 3.3. OBTENCIÓN DE UNA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA

La segunda parte del estudio estuvo dirigido a obtener una preparación que servirá posteriormente como suplemento en la fermentación del moromi.

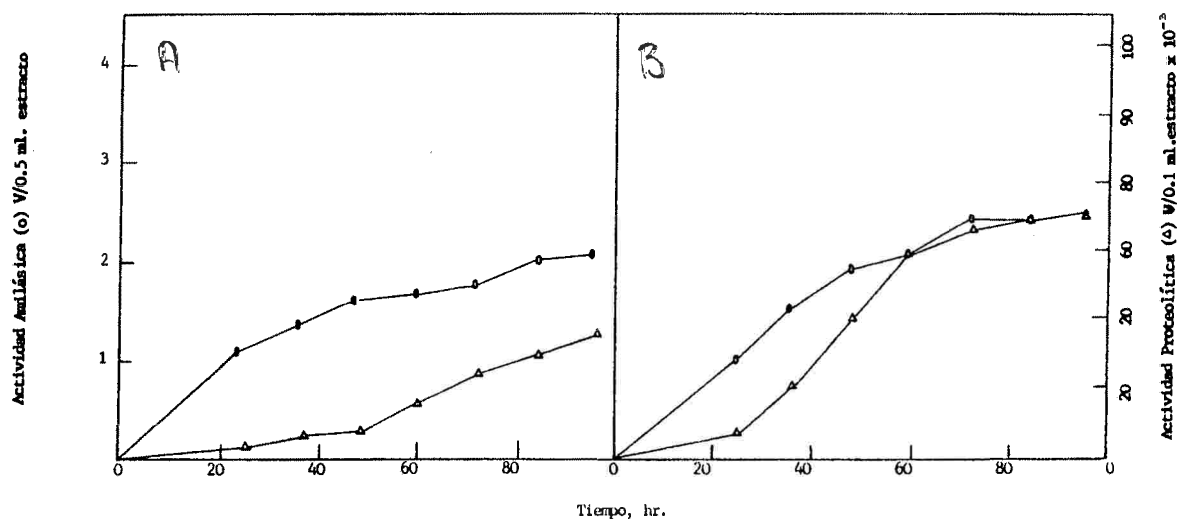
La Figura Nº 8 muestra los cursos de producción de amilasas y proteasas en una fermentación de salvado de trigo, con/sin adición de urea. Los valores de actividad enzimática en la fermentación del salvado fueron bastante bajos por lo que hubo la necesidad de adicionar urea en un 0.8% (del peso del salvado) como lo recomienda para este caso Nakadai y Nasuno (1988). Las diferencias obtenidas entre estos dos tratamientos fueron altamente significativas, lo que nos indica que la fermentación con adición de urea fue mejor.

Las condiciones de crecimiento para éstas fermentaciones fueron: alta tasa de aireación 85% de HR, 0.45 de  $a_w$  y 37 °C.

La alta relación C:N del medio natural puede no haber satisfecho los requerimientos nutricionales del hongo en cuanto a fuentes de nitrógeno de manera que su mayor disponibilidad y la utilización de compuestos

**GRAFICA No. 8 : EFECTO DE LA ADICION DE UREA EN LA FERMENTACION DE SALVADO DE TRIGO PARA LA PRODUCCION DE AMILASAS Y**

**PROTEASAS, POR *Aspergillus oryzae* ATCC 20386**



A : Medio de Fermentación: Salgado de trigo  
 B : Medio de fermentación " " más úrea de 0.8%  
 Condiciones de fermentación: T, 30°C; Tasa de Aireación, Alta; awinicial, 0.45.

**TABLA X : PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS POR FERMENTACION SOLIDA Y SALVADO DE TRIGO DE *Aspergillus Oryzae* ATCC 20386**

| TIEMPO<br>Hrs | SALVADO DE TRIGO |                               |                              | SALVADO DE TRIGO 0.8% UREA |                               |                              |
|---------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|               | %<br>H           | ACTIVID.<br>AMILASIC.<br>x 10 | ACTIVID.<br>PROTEOL.<br>x 10 | %<br>H                     | ACTIVID.<br>AMILASIC.<br>x 10 | ACTIVID.<br>PROTEOL.<br>x 10 |
| 0             | 45.9             |                               |                              | 45.9                       |                               |                              |
| 24            | 40.5             | 1.112                         | 1.821                        | 40.5                       | 1.012                         | 7.479                        |
| 39            | 38.5             | 1.39                          | 4.553                        | 38.5                       | 1.49                          | 21.138                       |
| 46            | 37.6             | 1.556                         | 7.479                        | 37.6                       | 1.89                          | 39.87                        |
| 63            | 33.3             | 1.69                          | 16.382                       | 33.3                       | 1.995                         | 56.797                       |
| 72            | 32.1             | 1.823                         | 24.187                       | 32.1                       | 2.404                         | 64.958                       |
| 84            | 31.3             | 1.951                         | 28.285                       | 31.3                       | 2.49                          | 67.967                       |
| 96            | 29.7             | 2.066                         | 35.041                       | 29.7                       | 2.501                         | 68.163                       |

nitrogenados inorgánicos y orgánicos como la urea permite un mayor desarrollo del microorganismo y un alto rendimiento de productos primarios y secundarios (Pérez y Gamarra, 1979).

La mayor disponibilidad de fuentes nitrogenadas se logró con la adición de urea, que promovió la multiplicación celular y consecuentemente la mayor producción enzimática. La producción de amilasas fue incrementada considerablemente, al igual que la producción de proteasas, que incrementó casi el doble de su producción inicial las 72 horas de fermentación momento en el cual la producción enzimática parece hacerse máximo. (Ver Tabla X, Anexo). Al respecto Nakadai y Nasuno (1988) por la misma técnica de fermentación lograron obtener altas producciones de amilasas, peptidasas y proteasas a las 50 a 60 horas de fermentación de salvado de trigo con 0.8% de urea y aireación forzada, e inclusive este tiempo es acortado a 30 a 40 horas cuando usa en el inóculo esporas germinadas.

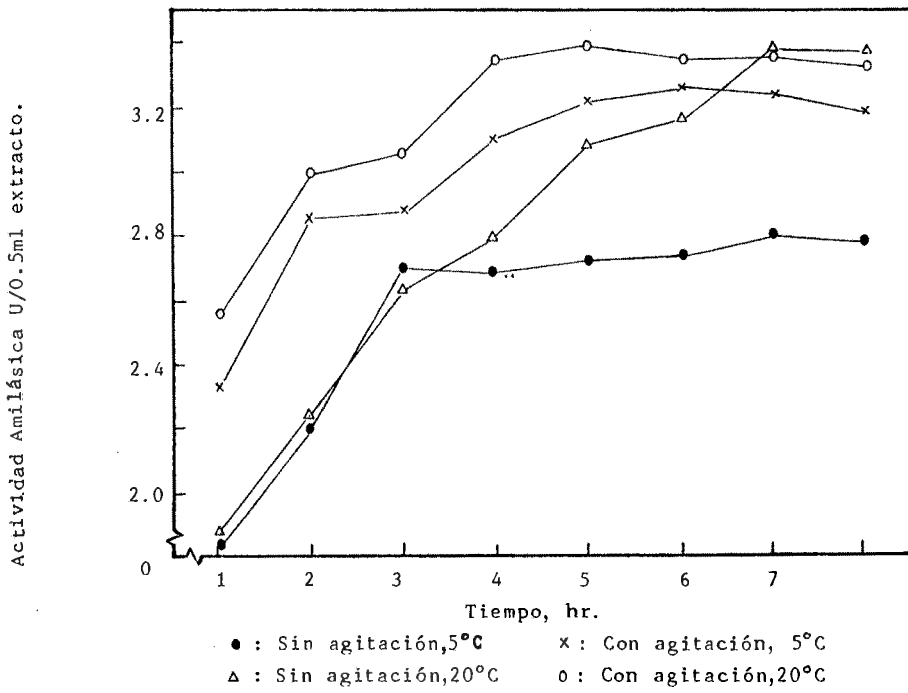
La extracción de enzimas de salvado de trigo fermentado se realizó tomando una placa de 72 hr con aprox. 29.30% de humedad y se le añadió 10 veces de su peso seco (este volumen fue de 825 ml). En la gráfica Nº 9,10 muestra el estudio realizado para determinar las condiciones adecuadas de extracción como: el tiempo en horas, temperatura y agitación de la mezcla.

El ensayo de extracción de amilasas tuvo como resultados (Gráfica nº 9). El extracto agitado (200 rpm aprox.) llegó a un valor de actividad máximo a las 4 horas siendo la extracción a 20 °C superior al de 50°C. Cuando la mezcla no es agitada es necesario más tiempo de extracción pues la cantidad de amilasas en el extracto a 20°C se hace máximo a las 7 hrs, siendo este, también superior al realizado a 5 °C.

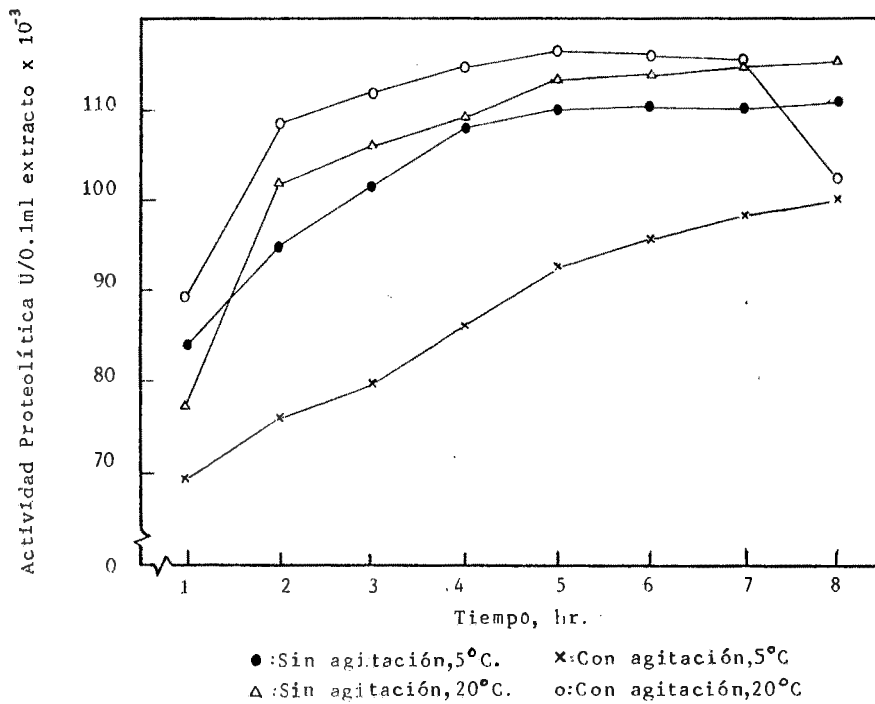
En cuanto a las proteasas (Gráfica Nº 10) las tendencias son similares. Se extrae la mayor



GRAFICA No 9 : EXTRACCION DE AMILASAS DE UN CULTIVO SOLIDO DE SALVADO DE TRIGO



GRAFICA No 10 : EXTRACCION DE PROTEASAS DE UN CULTIVO SOLIDO DE SALVADO DE TRIGO



cantidad posible de proteasas al agitar la mezcla por 4 horas a 20°C o por 7 horas a 20°C cuando no es agitado y cuando la temperatura de la mezcla es 5°C las extracciones no son efectivas.

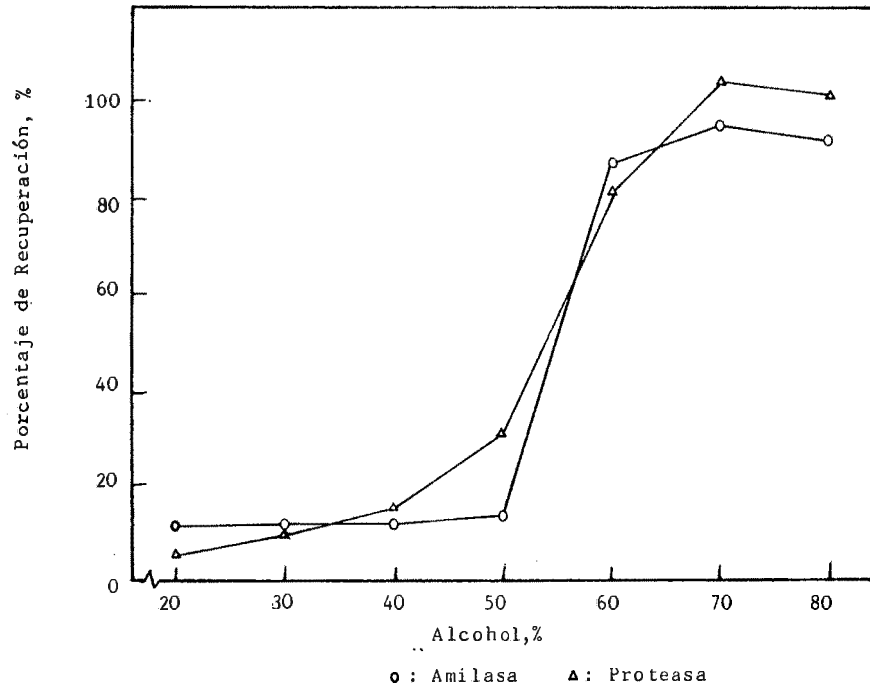
Con estos datos podemos afirmar que las extracciones realizadas a temperatura ambiente, sin agitación durante 7 horas son efectivas, y nos dan la posibilidad de reducir al máximo el volumen de agua ya que no es necesario agitar la mezcla, de manera que el extracto resultante, sea en menor volumen pero más concentrado en enzimas. Este aporte representa una ventaja cuando se consideran volúmenes mayores de fermentación, pues el uso de agitadores, cámaras refrigeradas, grandes volúmenes de agua y sobre todo alcohol, representaría una desventaja de extracción.

Alan.(1986), hace referencia del efecto inactivante de la agitación excesiva sobre algunas proteasas por oxidación. La agitación y algunos oxidantes como la fenol oxidasa presente en los hongos es una desventaja en la extracción de enzimas fúngicas, por lo que es necesario contrarrestar estos efectos, evitando la agitación o adicionando agentes reductores. Además menciona que algunas enzimas fúngicas son lábiles al frío, efecto que puede explicar de alguna manera la baja actividad enzimática en los ensayos a 5°C.

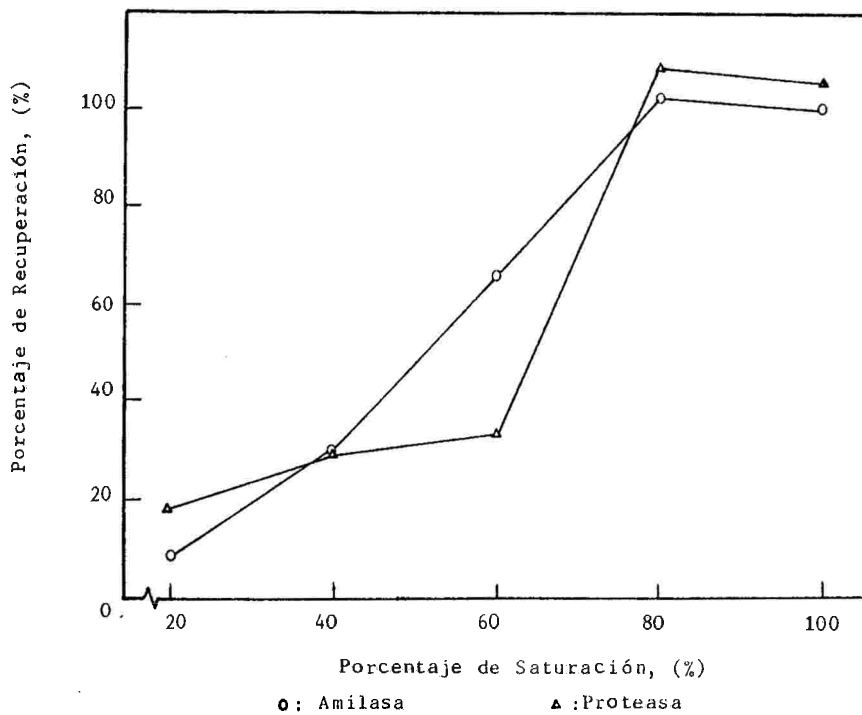
El paso final para la obtención de una preparación cruda de amilasas y proteasas, consistió en la concentración de las proteínas enzimáticas de la solución del extracto crudo enzimático obtenido en 7 horas de extracción, por precipitación con alcohol y sulfato de amonio (Nakadai y Nasuno,1989),(Di Jeso, 1968).

Se encontró que en una solución alcohólica al 70% pueden recuperarse las amilasas en mas de 90% y las proteasas más del 100% (ver Gráfica Nº 11). Aunque este último resultado pareciera ilógico, no lo es si

GRAFICA No 11 : EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ETANOL EN LA PRECIPITACION DE AMILASAS Y PROTEASAS



GRAFICA No 12: EFECTO DEL PORCENTAJE DE SATURACION DE SULFATO DE AMONIO EN LA PRECIPITACION DE AMILASAS Y PROTEASAS.



tomamos en cuenta que muchas moléculas enzimáticas en el extracto crudo pueden estar enmascaradas (especialmente su centro activo) por otras diferentes moléculas pudiendo obstaculizar su función catalizadora, de modo que al precipitar estas proteínas, estemos liberando indirectamente en cierto grado las impurezas; razón por la cual la actividad de estas enzimas tratadas resulte ser mayor que las iniciales, es decir con un porcentaje de recuperación mayor (Ver Tabla Nº XII, Anexo).

Al respecto Nakadai y Nasuno (1989) han reportado resultados similares, logrando un 93% de recuperación de una alfa-amilasa y más de 130% de una peptidasa en soluciones alcohólicas al 70%.

En la Gráfica Nº 12 muestra que la adición de 56 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de extracto (equivalente al 80% de saturación) recuperó las amilasas y proteasas en mas de 100%.

Si bien es cierto que los resultados para los dos tratamientos fueron similares, al finalizar este estudio se eligió el acohól para la obtención de un preparado crudo enzimático, por su disponibilidad en mayores cantidades. Es así que al final de este proceso, se puede obtener por cada 860 g de salvado de trigo, 24.6 g de una preparación cruda de amilasas y proteasas. Según Beuchat (1984), las proteasas que produce el Aspergillus oryzae son ácidas, neutras y alcalinas siendo las dos últimas las mas activas y el sistema amilásico está constituido por alfa-amilasas (en mayor proporción), beta-amilasas y gluco-amilasas (Abe, et.al. 1983; Wiseman, 1986).

#### 3.4. FERMENTACION DEL MOROMI

Esta tercera parte del trabajo es prácticamente la evaluación de la efectividad de cada uno de los estudios realizados. Para ello se tomaron en cuenta 7 variables a analizar, seis de ellos recomendador por

la ITINTEC importantes por estar relacionados con los objetivos trazados.

En el moromi del primer y segundo tratamiento no fue una masa homogénea durante las primeras semanas, por que los granos tendían a resuspenderse en la superficie de la salmuera aún después de agitarlos. Esta figura cambió en el tercer tratamiento, pues las partículas de la harina de tarwi fueron mas fáciles de solubilizarse. La adición de la preparación cruda de amilasas y proteasas se realizó al inicio de la fermentación y fue de 49.2 g (sólo al tercer tratamiento).

La inoculación de Pediococcus halophilus ATCC 21786 y Zigoscharomyces ruoxii ATCC 34518 se realizó al tercer día como lo recomienda Mujica (1987) y constituyó el 5% del moromi.

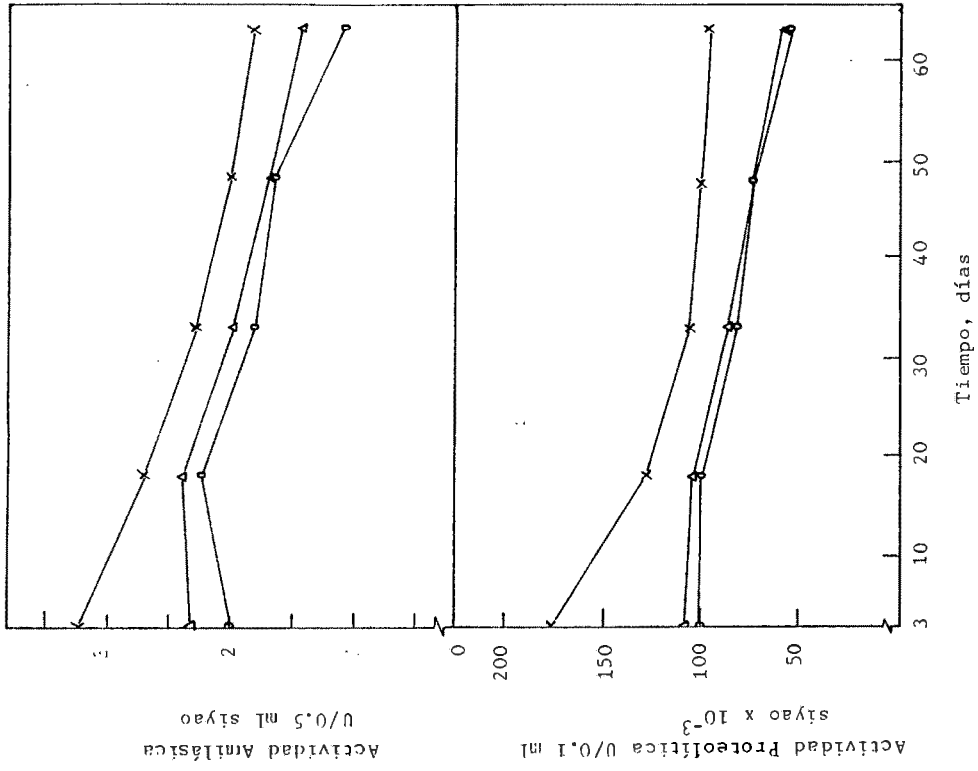
#### 3.4.1. ACTIVIDAD AMILASICA Y PROTEOLITICA

Estas variables dependen directamente de la cantidad de enzima presente en cada fermentador, los valores de actividad amilásica y proteolítica más altos corresponde al moromi suplementado con preparación enzimática, y es a su vez 45% más que el moromi de sustrato sólido y 51% más que el moromi tradicional con respecto a las actividades amilásicas, y para proteasas es 60% y 74% mas considerando las mismas comparaciones (ver Gráfica Nº 13).

Estas diferencias en un análisis estadístico resultaron altamente significativos con un nivel de confianza del 1%, diferencias que debieron deberse a las siguientes razones:

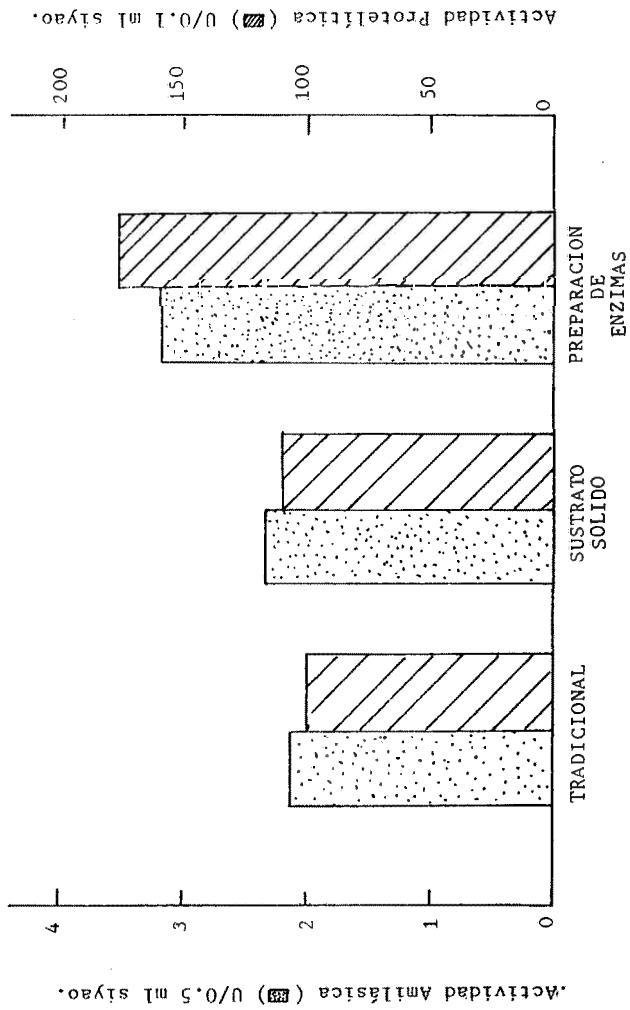
- En un proceso tradicional (fermentación del koji en bandeja) la producción de enzimas puede o no ser buena.
- Usando fermentadores acondicionados para este fin, donde las condiciones de crecimiento del hongo son reguladas se asegura una buena producción enzimática

GRAFICA No. 14 : ACTIVIDAD AMILASICA Y PROTEOLITICA DURANTE EL TIEMPO DE FERMENTACION DEL MORONI.



(o) : TRADICIONAL  
 ( ) : SUSTRATO SOLIDO  
 (X) : PREPARACION ENZIMATICA

Gráfica No. 13 : ACTIVIDAD AMILASICA Y PROTEOLITICA AL 3er DIA DE LA FERMENTACION DEL MORONI



luego una buena actividad en la fermentación del moromi.

- Finalmente la adición de preparaciones de amilasas y proteasas incrementa la actividad en el moromi de acuerdo a la proporción que se use.

Es necesario mencionar el notable decrecimiento (aprox. 40%) de la actividad enzimática en los 63 días de fermentación, posiblemente debido a la inactivación de las enzimas por las condiciones extremas de salinidad (ver Gráfica Nº 14).

### 3.4.2. NITROGENO TOTAL; AMINO-NITROGENO Y RENDIMIENTO DE NITROGENO:

Estas tres variables son las más importantes en la fermentación del moromi, y dependen directamente de la cantidad de enzimas producidas en el koji y activas en la fermentación del moromi. La Gráfica Nº 15 muestra las tendencias crecientes de estas variables.

Estadísticamente se han encontrado diferencias altamente significativas entre los tres tratamientos, para las tres variables con un nivel de confianza del 1% (ver Tablas Nºs. XIII, XIV, XV, Anexo). Los valores superiores de nitrógeno total en el moromi con preparación enzimática pudieron deberse fundamentalmente a dos razones:

- La harina de tarwi usado como materia prima fue más soluble en la salmuera desde los primeros días de fermentación de manera que al realizar el muestreo y filtrado, el siyao crudo debió contener mas partículas de tarwi que cuando se usa tarwi entero, y por consiguiente mas proteínas.
- La actividad proteolítica incrementada por adición de la preparación enzimática ocasiona una mayor hidrólisis de las proteínas y la consecuente solubilización de sus productos. Este último influye más directamente a los valores de amino-nitrógeno.

,En cuanto al rendimiento del nitrógeno, el siyao con preparación enzimática llegó a un 50% antes del primer mes de fermentación, y a los 63 días el rendimiento alcanzó el 72%, mientras que el siyao tradicional 62.3% y el siyao de sustrato sólido 65.85%. Al respecto Mujica (1987) logra rendimientos del orden del 65.87% en dos meses usando tarwi entero y desamergado.

### 3.4.3. AZÚCARES REDUCTORES, ACIDEZ Y pH

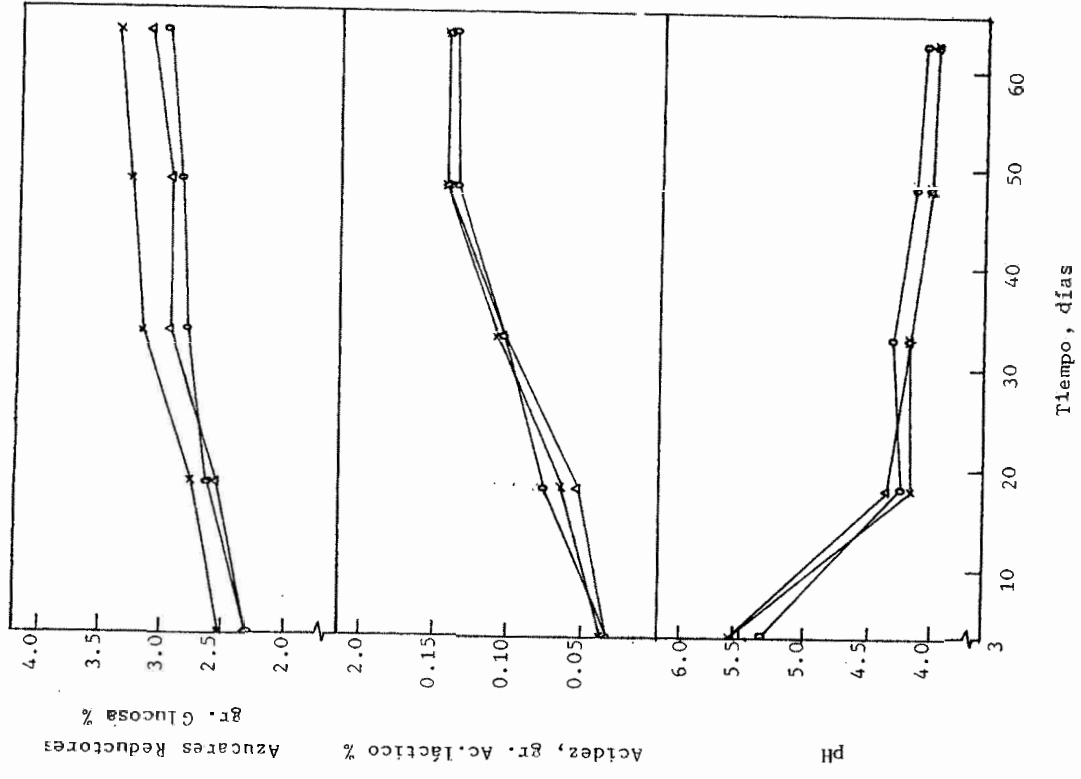
Estas tres variables dependen de las amilasas de las bacterias, levaduras y hongos.

En la Gráfica Nº 16 se observa la variación en la producción de azúcares reductores, ácido láctico y su influencia en el pH durante la fermentación del moromi. La tendencia de las dos primeras variables en los tres tratamientos es siempre ascendente y mas marcada durante las primeras semanas, pudiendo deberse a la acción en un inicio de las amilasas fúngicas, hasta el momento en que el número de células de Pediococcus halophilus incrementa de manera que la cantidad de azúcares reductores liberados se ve afectado al ingresar al metabolismo fermentativo y convertirse en ácido láctico, por esta razón, también que los valores de acidez expresados en gramos de ácido láctico aumenta con respecto al tiempo. Indirectamente el incremento del ácido láctico confirma un buen crecimiento bacteriano, a su vez este incremento, determina que el pH de la fermentación disminuya a 4.0 creando una limitación en el crecimiento bacteriano, y posibilitando el predominio de las levaduras, Mujica (1987).

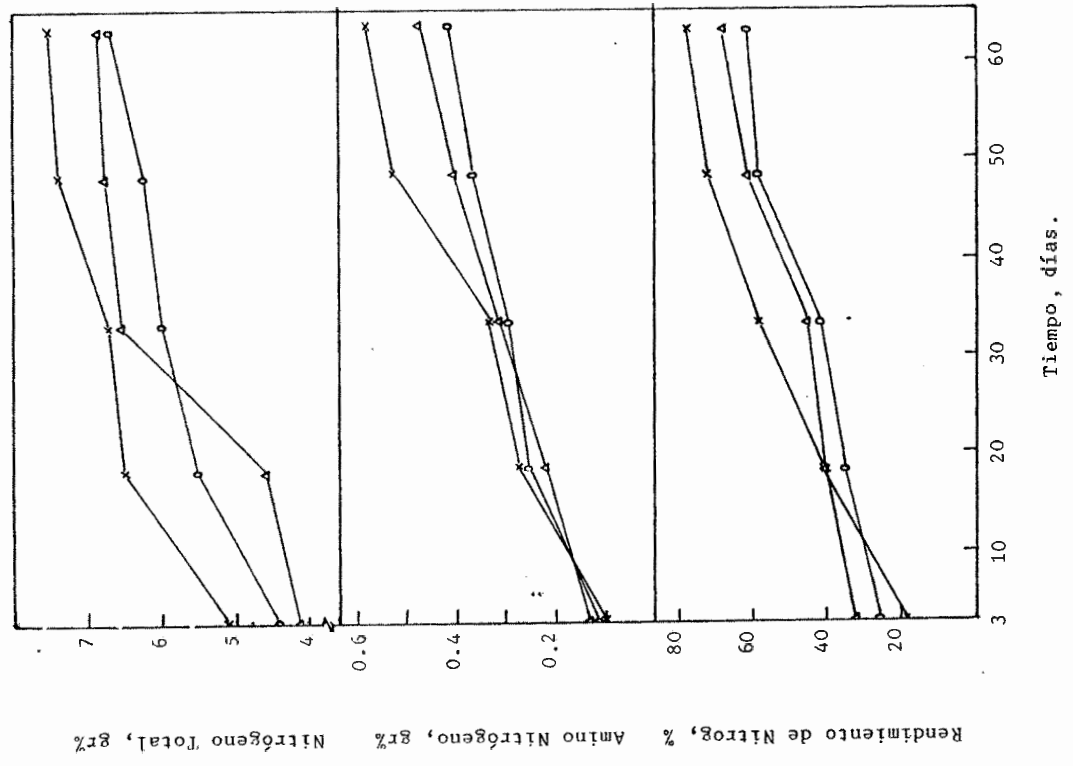
Estadísticamente se han encontrado diferencias altamente significativas. En azúcares reductores entre tratamientos y tiempo de fermentación. En el caso del pH las diferencias estadísticas fueron en todos los casos (entre tratamientos, tiempos de fermentación y



GRAFICA No 16 : AZUCARES REDUCTORES, ACIDEZ, Y pH DURANTE EL TIEMPO DE FERMENTACION DEL MORONI



GRAFICA No 15 : NITROGENO TOTAL, AMINO NITROGENO, Y RENDIMIENTO DE NITROGENO DURANTE EL TIEMPO DE FERMENTACION DEL MORONI



sus interacciones)(ver Tabla XVI y XVII,anexo) mientras que en la variable acidéz las diferencias resultaron no significativas entre tratamiento y su interacción.

## CONCLUSIONES

1. Se ha logrado optimizar las condiciones de crecimiento de Aspergillus oryzae ATCC 20386 en un Fermentador de Sustrato Sólido, lográndose los más altos niveles de actividad amilásica y proteolítica, en kojis de tarwi y trigo bajo las siguientes condiciones: tasa de aireación alta (280 Lt/hr), humedad relativa 85%, actividad de agua inicial en el sustrato 0.45 y temperatura 30°C.
2. Se ha obtenido un preparado crudo de amilasas y proteasas (en polvo) por fermentación en Sustrato Sólido con salvado de trigo enriquecido de urea (0.8% del peso) el rendimiento alcanzado fue de 24.6g de preparación cruda por cada 860g de salvado de trigo la extracción se realizó en medio acuoso utilizando un volumen de salvado fermentado por 72 h y 10 volúmenes de agua desionizada a temperatura ambiental (20 °C) por espacio de 7 h sin agitación. Para concentrar las enzimas por precipitación se usó etanol al 70% (1v de extracto y 3v de etanol absoluto), procedimiento que

permitió recuperar la actividad de amilasas en 92.9% y la actividad de proteasas en 102.1%.

3. De los tres tratamientos experimentados (tradicional, sustrato sólido y preparación enzimática) el que dio un valor mas alto de rendimiento de nitrógeno fue aquel realizado por fermentación en sustrato sólido utilizando harina de tarwi y suplementado con 49.2g de preparación enzimática (en polvo) por cada 7.5 lt. de moromi.,habiéndose obtenido un 50% de rendimiento de nitrógeno antes del primer mes de fermentación lo que no sucedió con los demás tratamientos. Al cabo de 63 ddías de fermentación los rendimientos de nitrógeno alcanzados en los tres tratamientos fueron: "tradicional", 62.03%, "sustrato sólido" 68.21", y"preparación enzimática" 77.09%.
- 4.- Por otro lado la acción por éste procedimiento de elaboración de siyao puede reducir significativamente el costo del producto final,si tenemos en cuenta que la elaboración tradicional necesita no menos de 6-8 meses de fermentación. Logicamente los costos de operación pueden ser menores en dos o menos meses de fermentación.
5. Si bien es cierto que se ha logrado un alto rendimiento de nitrógeno en menor tiempo de fermentación, no podemos afirmar definitivamente el logro de un siyao de alta calidad y competencia por la tecnología de las preparaciones enzimáticas, debido a que es necesario también tener en cuenta otras variables de fermentación, que aunque no determinan, influyen significativamente en la calidad del siyao pero pensamos éste estudio crea una alternativa prometedora de uso de desechos agro-industriales para producir enzimas involucradas en la futura industrialización del tarwi con fines de elaboración de siyao en nuestro medio.

### RECOMENDACIONES

1. Se ha observado durante el estudio, que en la fermentación del salvado de trigo hay un buen crecimiento y considerable esporulación, por lo que se recomienda el uso de éste sustrato apropiado y económico para la obtención de un inóculo de esporas en sustitución del arroz pulido.
2. Con respecto a los accesorios del fermentador de vidrio se recomienda usar pequeñas compresoras de aire para substituir las bombas de aire tipo acuario usadas para lograr mayores tasas de aireación, inclusive por encima de sus valores óptimos y estudiar su efecto en las fermentación sólida.
3. Se recomienda estudiar el efecto del pH y temperatura del extracto enzimático acuoso en la recuperación de las amilasas y proteasas con alcohol y sulfato de amonio, con la finalidad de conocer los puntos críticos durante éste procedimiento y proteger a las enzimas al máximo contra cualquier alteración de naturaleza física

y/o química.

4. Se recomienda hacer el estudio cinético enzimático de la preparación cruda de amilasas y proteasas para su caracterización, y poder ser usado con mayor base científica en las fermentaciones en salmuera. Así mismo se recomienda determinar la proporción de preparaciones enzimáticas a adicionar más convenientes en función de la actividad proteolítica del moromi tradicional, con la finalidad de estandarizar el procedimiento de elaboración del siyao con preparaciones enzimáticas.
5. Se recomienda realizar un panel de preferencias y diferencias con personas experimentadas en el uso del siyao comparando aquellos que se comercializan en nuestro medio con el siyao de tarwi elaborado tradicionalmente o con la ayuda de preparaciones enzimáticas.
6. Repetir el ensayo por duplicado, considerando también la fase final de refinamiento y estandarización con las normas técnicas que exige la ITINTEC para obtener un producto terminado el cual podrá ser sometido a pruebas de degustación.

## RESUMEN

La fermentación del siyao comprende; una fermentación en Sustrato Sólido o Koji y una fermentación sumergida en salmuera o Moromi. Bajo este contexto el presente estudio se realizó con la finalidad de optimizar las condiciones de crecimiento de Aspergillus oryzae ATCC 20386 en una fermentación en Sustrato Sólido de una mezcla de tarwi y trigo y otra de salvado de trigo; y lograr altos niveles de actividad amilásica y proteolítica en la fermentación del moromi, que permitan acortar al máximo el tiempo de fermentación con un alto rendimiento de nitrógeno.

Se pesaron 1.5 Kg de koji, de tarwi y trigo (1:1) de tres diferentes maneras: El primero constituido de granos de tarwi desamargados y trigo. El segundo constituido de granos de tarwi pelado y desamargado y trigo. El tercero constituido por harina de tarwi desamargado y trigo.

Estas mezclas se inocularon con 5 ml de una suspensión de 10 esporas/ml de Aspergillus oryzae en Tween 80 al 1% por cada 150g de koji. El primer koji fue incubado tradicionalmente en bandejas de 45 x 28.5

x 8 cm, y los dos últimos fueron incubados en placas de 150 mm dispuestos en un fermentador de vidrio de sustrato sólido donde se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento, que fueron: alta tasa de aireación, 85% de HR, 0.45 de Aw inicial, 30°C de temperatura, por 72 hrs, tiempo en el cual se observó la mayor producción de amilasas y proteasas.

Posteriormente los tres kojis fueron transferidos a recipientes de vidrio de 10 lt de capacidad conteniendo 4.38 lt de salmuera al 18% que equivalen al 120% del volumen que ocupa 1.5 kg. de koji con 45% de humedad, habiéndose trabajado con un volumen útil de 7.5 Lt.

Paralelamente se procedió a elaborar una preparación cruda de amilasas y proteasas. Para ello se realizó una fermentación sólida de salvado de trigo por 72 hrs a partir del cual se extrajo las proteínas solubles en una solución acuosa, constituyendo éste el extracto crudo enzimático que luego fue sometido a una concentración por precipitación con alcohol etílico. El precipitado resultante con un rendimiento de 24.6 g por cada 860 de salvado de trigo denominado preparación cruda de enzimas, fue añadido al tercer fermentador del moromi.

Al tercer día los fermentadores fueron inoculados con 200 ml de *Pediococcus halophilus* ATCC 21786 Y 200 ml de *Zigosacharomices rouxii* ATCC 34518 que sumados equivalen al 5% del volumen del moromi. Los muestreos se realizaron cada 15 días hasta los 63 días, tiempo en el cual superaron los tres fermentadores el 50% de rendimiento. Específicamente se logró en el moromi tradicional un 62.5%; en el moromi de sustrato sólido 60.2% y en el moromi de preparación enzimática 77.09% de rendimiento.

Estadísticamente se han logrado diferencias altamente significativas entre los tres tratamientos para todas las variables estudiadas.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-ABE, J. et.al. 1988. Production of the Raw-Starch Digesting Amylase of Aspergillus sp K-27. Applied Microbiology and Biotechnology, 27: 447-450.
- 2.-A.T.C.C. 1982. American Type Culture Collection. I Catalogue of Strains. 15va. Edic. USA.
- 3.-BERGMANN, F. et.al. 1988. Selection of Microorganism which Produce Raw-Starch degrading Enzymes Applied Microbiology and Biotechnology. 27:443-446
- 4.-BEUCHAT, L. 1983. Indigenous Fermented Foods in Biotechnology Vol.V. Edit.Verlag ,Chemic. Weinheim FRG. Pp:479-490.
- 5.-BEUCHAT, L. 1984. Fermented Soybean Foods in Biotechnology. 38(6):64-70.
- 6.-CARHUAZ, R. 1985. Capacidad Amilásica de dos Cepas de Bacillus spp. en Diferentes Materiales Amiláceos. Tesis UNSCH. Prog.Acad.Cs. Bs. Ayacucho-Perú.
- 7.-CCOILLO, R. 1983. Ritmo de Acumulación de Almidón y Proteínas en Hojas y granos de dos Ecotipos de de Tarwi (Lupinus mutabilis): Precoz y Tardío bajo. Condiciones de Allpachaka(350msnm). Tesis UNCH. Prog. Acad. Cs. Bs. Ayacucho-Perú.
- 8.-CHEFTEL, C. y CHEFTEL, H. 1982. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos. Vol 1. Edit. Acribia. España. Pp: 19-29.
- 9.-Di JESO, F. 1968. Ammonium Sulfate Concentration Conversion Nomograph for O . The J. of Biological Chemistry. 213(8):2022-2025.
- 10.-FLORES, J. y GUTIERREZ, M. 1989. Producción de Acido Cítrico por Fermentación en Sustrato Sólido a partir de Residuos de Opuntia ficus indica (L.) Mill "Tuna", en: XVI Congreso Peruano de Química. Lima. Pp. 54.
- 11.-FROST, G. y MOSS, D. 1987. Production of

Enzymes by Fermentation en Biotechnology. Vol VII. (Ed. John F. Kennedy). Edit VCH Publishers. Weinheim-RFG. Pp. 86-91.

- 12.-FUKUSHIMA, Y. et.al. 1989. Continuous Protease Production in a Carbon-Limited Chemostat Culture by Salt Tolerant (Aspergillus oryzae). Appl. Microbiol. 30:604-608.
- 13.-GRACIAS-BLASQUEZ, J. 1979. Estudio del Potencial Alimenticio de Ecotipos de "tarwi" (Lupinus mutabilis) en Ayacucho y su Prefactibilidad de Industrialización. Tesis UNSCH. Prog. Acad. Ing. Quim. Ayacucho-Perú.
- 14.-GERVAIS, P. et.al. 1987. Influence of the Water Activity of a Solid Substrate on the Growth Rate and Sporogenesis of Filamentous Fungi. Biotechnology and Bioengineering. 31:475-463.
- 15.-HESSELTINE, C. 1972. Solid State Fermentation Biotechnology and Bioengineering. 14:517-532.
- 16.-HURTADO, C. 1982. La Alimentación Popular Tradicional. Anales del III Congreso Ibero-Americano de Medicina Rural. Lima. Pp. 255-261.
- 17.-ITINTEC. 1984. Sillao, Siyau, o Siyao. Requisitos Norma Técnica Nacional 209-227.
- 18.-JIMENEZ, S. 1982. Informe Final del Proyecto: Pesticidas del Lupinus mutabilis. Convenio UNSAAC-NUFFIC Cusco-Perú.
- 19.-KALISZ, H. 1988. Microbio Proteinasas in Advances in Biochemical. Engineering y Biotechnology. A. Fischter. (ed). Berlin-RDA. Pp. 38-40.
- 20.-KUNZ, B. 1986. Cultivo de Microorganismos Para la Producción de Alimentos. Edit. Acribia S.A. España. Pp. 45-47.
- 21.-LEON, E. 1983. Ritmo de Acumulación de Almidón y Proteínas en Hojas y Granos de Tres Ecotipos de Lupinus mutabilis SWEET "tarwi" Procedentes del Fundo Allpachaka (3500 msnm.) Campaña 1981-1983. Tesis UNSCH. Prog. Acad. Cs. Bs. Ayacucho-Perú.

- 22.-MANDOJ, M. et.al. 1988. Protease Production by *Bacillus Subtilis* in Oxygen-Controlled Glucose Fed-Batch Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28:404-408.
- 23.-MAZZA, L. y BALLATTI, A. 1970. Enzimas Amilolíticas Fúngicas. *Rev. Lat.amer. Microbiol.* 12:181-187.
- 24.-MIZUNUMA, T. 1965. Effect of Water level of Culture Medium on Mycelial Compositions and Enzyme Production. *Agric. Biol. Chem.* 29(8):703-713.
- 25.-MUJICA, F. 1987. Obtención de Salsa Tipo Siyao por Fermentación de Tarwi (*lupinus mutabilis*) en Ayacucho. Tesis UNSCH. Prog. Acad. Cs. Bs. Ayacucho-Perú.
- 26.-NAKADAI, T. y NASUNO, S. 1988. Culture Conditions of *Aspergillus oryzae*, for Production of Enzyme Preparation. *J. Ferment. Technol.* 66(5):525-533.
- 27.-NAKADAI, T. y NASUNO, S. 1989. Enzyme Preparation From Extrac of Wheat Bran Koji by Alcohol Presipitation. *J. of Ferment. Technol.* 67(4):253-257.
- 28.-NAKADAI, T. y NASUNO, S. 1988. Hydrolysis of Acid Treated by a Preparation of Proteases. *J. Ferment. Technol.* 66(5):535-544.
- 29.-NAKADAI, T. et.al. 1973. Purification and Properties of Neutral Proteinase I From *Aspergillus oryzae*. *J. Agric. Biol. Chem.* 37(12):2695-2701
- 30.-NASUNO, S. y OHARA, T. 1971. Hyperproduction of Proteinase and some Hydrolytic Enzymes by Mutants of *Aspergillus soyae*. *Agric. Biol. Chem.* 35(6):829-835.
- 31.-NISHIO, N. et.al. 1981. Thermophilic Cellulase Production by *Taralomyces sp* in Solid-State Cultivation. *J. ferment. Technol.* 59(5):407-410.
- 32.-OSAKI, K. et.al. 1985. Fermentation of Soy Sauce With Immobilized Whole Cels. *J. of Foods*

- Science. 50(5):1289-1292.
- 33.-PAREDES, H. 1983. Estudio Técnico Económico para la Obtención de Proteínas Comestibles a partir de Semillas de "tarwi" (Lupinus mutabilis). Tesis UNSCH. Prog. Acad. Ing. Quim. Ayacucho-Perú.
- 34.-PATIL, M. y SHASTRI, N. 1981. Extracelular Production of Proteases by Alternaria alternata. J. Ferment. Technol. 59(5): 403-406.
- 35.-PEREZ, S. y GAMARRA, G. 1979. Fermentaciones Industriales. Tópicos Selectos. I. UNMSM. Lima-Perú. Pp. 38-41.
- 36.-SALINAS, R. 1988. Alimentos y Nutrición. Bromatología Aplicada a la Salud. Edit. El Ateneo. Argentina. Pp. 98, 111-113.
- 37.-SMITH, A. y CIRCLE. 1978, Soybean. Chemistry and technology, Vol I. 2da. Edic. Avi.Pub.Co. USA. Pp. 389-419.
- 38.-TAIPE, F. 1982. Aislamiento de Bacillus spp del Suelo y Evaluación de su Capacidad Amilásica. Tesis UNSCH. Prog. Acad. Cs. Bs. Ayacucho-Perú.
- 39.-TANIGUCHI, M. et.al. 1988. Rapid Production of Pediococcus halophilus Salt-Tolerant Cell by a Cultivation Method Employing Gradual Increase in NaCl Concentration Using a Fermentor with Microfiltration Module. J. Ferment. Technol. 66(6):633-641.
- 40.-WATANABE, Y. y TAKAKUWA, M. 1987. Change of Lipid Composition of Zigosaccharomyces rouxii after Transfer to High Sodium Chloride Culture Medium. J. Ferment. Technol. 65(4):365-369.
- 41.-WISEMAN, A. 1986. Principios de Biotecnología. Edit. Acribia S.A. España. Pp. 171-173.
- 42.-YOKOTSUKA, T. 1972. Some Recent Technological Problems Related to the Quality of Japanese Shoyu. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today.

650-662.

- 43.-YONG, F. y WOOD, B. 1974. Microbiology and Biochemistry of Soy-Sauce fermentation. Advances in Applied Microbiology. 17, 157-193.
- 44.-ZEVALLOS, L. 1980. Estudio Técnico Económico del desamargado de Lupinus mutabilis (tarwi o chocho) para el Consumo Humano. Proyecto Lupino. Inf. No 5. Lima. Pp. 73-86.

A N E X O

TABLE VI : PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS CON DIFERENTES TASAS DE AIREACION

| TIEMPO DE FERMENTACION | TASA DE AERACION 1/hr |          |          |      |          |          |
|------------------------|-----------------------|----------|----------|------|----------|----------|
|                        | BAJA                  |          |          | ALTA |          |          |
| Días                   | ZH                    | ACT.AMIL | ACT.PROT | ZH   | ACT.AMIL | ACT.PROT |
| 0                      | 50.9                  |          |          | 51.4 |          |          |
| 24                     | 46                    | 1.312    | 10.211   | 46.7 | 1.056    | 21.919   |
| 36                     | 44.5                  | 1.631    | 14.114   | 43.2 | 1.499    | 29.138   |
| 48                     | 42.2                  | 1.719    | 25.87    | 40.1 | 1.919    | 37.919   |
| 60                     | 39.7                  | 1.867    | 35.577   | 37.3 | 2.119    | 48.846   |
| 72                     | 38.2                  | 1.901    | 44.553   | 33.8 | 2.139    | 56.065   |
| 84                     | 37.9                  | 2.079    | 56.226   | 29   | 2.135    | 58.797   |
| 96                     | 36.7                  | 2.111    | 58.992   | 26.5 | 2.153    | 58.992   |
|                        |                       |          |          | 21.1 | 2.393    | 65.041   |

ANVA del tiempo de fermentación (1) y tasa de Aireación (2) para:

PRODUCCION DE AMILASAS

| FUENTE | G.L. | S.C. | C.M.  | F.    | Prob. |
|--------|------|------|-------|-------|-------|
| 1      | 6    | 2.76 | 0.46  | 11.62 | 44    |
| 2      | 2    | 0.03 | 0.014 | 0.34  | 4     |
| Error  | 12   | 0.48 | 0.04  |       |       |
| TOTAL  | 20   | 3.26 |       |       |       |

C.V. 10.76

PRODUCCION DE PROTEASAS

| FUENTE | G.L. | S.C.  | C.M.  | F.    | Prob. |
|--------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1      | 6    | 5.454 | 0.909 | 38.3  | 44    |
| 2      | 2    | 0.945 | 0.473 | 19.91 | 44    |
| Error  | 12   | 0.283 | 0.024 |       |       |
| TOTAL  | 20   | 6.684 |       |       |       |

C.V. 11.20

TABLA VIII

PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS CON DIFERENTES HUMEDADES RELATIVAS

| TIEMPO DE FERMENT. | % HUMEDAD RELATIVA                       |                                          |      |                                          |        |                                          |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------|------------------------------------------|--------|------------------------------------------|
|                    | 75                                       | 80                                       | 85   | 90                                       | 96.5   |                                          |
| ZH                 | ACT. AMILASICA: PROT. x 10 <sup>-3</sup> | ACT. AMILASICA: PROT. x 10 <sup>-3</sup> | ZH   | ACT. AMILASICA: PROT. x 10 <sup>-3</sup> | ZH     | ACT. AMILASICA: PROT. x 10 <sup>-3</sup> |
| 70                 | 53.1                                     | 51.2                                     | 52.4 | 50.4                                     |        |                                          |
| 24                 | 42.9                                     | 42.3                                     | 42.3 | 44.0                                     | 24.065 | 43.2                                     |
| 36                 | 37.2                                     | 39.9                                     | 39.9 | 41.8                                     | 40.455 | 40.7                                     |
| 48                 | 34.3                                     | 36.6                                     | 36.6 | 37.2                                     | 40.358 | 38.6                                     |
| 60                 | 30.1                                     | 33.8                                     | 33.8 | 34.6                                     | 37.919 | 37.0                                     |
| 72                 | 27.3                                     | 31.4                                     | 31.4 | 32.3                                     | 34.543 | 36.1                                     |
| 84                 | 26.1                                     | 29.9                                     | 29.9 | 31.2                                     | 33.455 | 35.4                                     |
| 96                 | 25.4                                     | 28.1                                     | 28.1 | 30.0                                     | 31.821 | 35.0                                     |
|                    |                                          |                                          |      |                                          | 91.382 | 1.651                                    |
|                    |                                          |                                          |      |                                          |        | 1.390                                    |
|                    |                                          |                                          |      |                                          |        | 1.495                                    |
|                    |                                          |                                          |      |                                          |        | 71.870                                   |
|                    |                                          |                                          |      |                                          |        | 78.114                                   |
|                    |                                          |                                          |      |                                          |        | 79.870                                   |

A N A DEL TIEMPO DE FERMENTACION (1) Y % DE HUMEDAD RELATIVA (2) PARA PRODUCCION DE AMILASAS

PRODUCCION DE AMILASAS

| FUENTE | S.L. | S.C.  | C.M.  | Fe    | Prob |
|--------|------|-------|-------|-------|------|
| 1      | 6    | 4.880 | 0.781 | 16.77 | **   |
| 2      | 3    | 3.250 | 0.417 | 8.95  | **   |
| ERROR  | 38   | 0.840 | 0.047 |       |      |
| TOTAL  | 27   | 6.770 |       |       |      |

C.V. = 14.712

PRODUCCION DE PROTEASAS

| FUENTE | S.L. | S.C.   | C.M.  | Fe     | Prob |
|--------|------|--------|-------|--------|------|
| 1      | 6    | 15.589 | 2.598 | 180.30 | **   |
| 2      | 3    | 1.048  | 0.149 | 24.25  | **   |
| ERROR  | 18   | 0.259  | 0.014 |        |      |
| TOTAL  | 27   | 16.896 |       |        |      |

C.V. = 6.162



**TABLA VIII : PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS CON DIFERENTES  
 ACTIVIDADES DE AGUA INICIAL**

| TIEMPO DE FERMENT. DIAS | ACTIVIDAD DEL AGUA (Aw) INICIAL |                |                 |        |                |                 |        |                |                 |      |                |                 |
|-------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|--------|----------------|-----------------|--------|----------------|-----------------|------|----------------|-----------------|
|                         | 0.40                            | 0.45           | 0.50            | 0.55   | 0.60           | 0.65            | 0.70   | 0.75           | 0.80            | 0.85 |                |                 |
|                         | ZMS                             | ACT. AMILASICA | ACT. PROT. x 10 | ZMS    | ACT. AMILASICA | ACT. PROT. x 10 | ZMS    | ACT. AMILASICA | ACT. PROT. x 10 | ZMS  | ACT. AMILASICA | ACT. PROT. x 10 |
| 0                       | 40.0                            |                |                 | 51.200 |                |                 | 55.9   |                |                 |      |                |                 |
| 24                      | 34.2                            | 1.112          | 28.943          | 40.7   | 1.112          | 32.846          | 42.300 | 0.787          | 25.041          | 47.8 | 0.945          | 2.602           |
| 36                      | 31.3                            | 1.556          | 54.309          | 38.4   | 1.667          | 51.382          | 39.900 | 0.900          | 48.260          | 43.8 | 1.089          | 7.480           |
| 48                      | 29.4                            | 2.112          | 66.992          | 35.0   | 2.056          | 76.748          | 36.600 | 1.134          | 62.699          | 40.1 | 1.105          | 17.626          |
| 60                      | 28.0                            | 2.834          | 76.748          | 32.3   | 2.779          | 90.738          | 33.800 | 1.667          | 77.939          | 38.6 | 1.132          | 26.016          |
| 72                      | 26.2                            | 3.373          | 84.349          | 29.2   | 3.153          | 103.641         | 31.400 | 2.133          | 84.553          | 35.0 | 1.278          | 31.870          |
| 84                      | 24.3                            | 3.309          | 87.480          | 27.3   | 3.299          | 111.870         | 29.900 | 2.284          | 83.455          | 32.2 | 1.345          | 39.870          |
| 96                      | 24.0                            | 3.334          | 89.431          | 26.8   | 3.356          | 110.894         | 28.100 | 2.230          | 83.821          | 31.2 | 1.390          | 47.016          |

**A N V A DE TIEMPO DE FERMENTACION (1) Y LA Aw INICIAL (2) PARA**

**PRODUCCION DE AMILASAS**

| FUENTE | S.L. | S.E.  | C.M.  | Fe    | Prob. |
|--------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1      | 6    | 10.05 | 1.675 | 12.93 | **    |
| 2      | 3    | 9.21  | 3.069 | 23.66 | **    |
| ERROR  | 18   | 2.33  | 0.130 |       |       |
| TOTAL  | 27   | 25.59 |       |       |       |

C.V. = 18.582

**PRODUCCION DE PROTEASAS**

| FUENTE | S.L. | S.E.   | C.M.  | Fe    | Prob. |
|--------|------|--------|-------|-------|-------|
| 1      | 6    | 12.570 | 2.095 | 41.94 | **    |
| 2      | 3    | 13.773 | 4.591 | 91.90 | **    |
| ERROR  | 18   | 0.899  | 0.049 |       |       |
| TOTAL  | 27   | 27.242 |       |       |       |

C.V. = 11.571

TABLA IX  
 PRODUCCION DE AMILASAS Y PROTEASAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

| TIEMPO DE FERMENT. DIAS | TEMPERATURA, °C |                                         |      |                                         |      |                                         |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|-----------------------------------------|
|                         | 25°C            |                                         | 30°C |                                         | 37°C |                                         |
|                         | ZH              | ACT. AMILASICA, PROT. x 10 <sup>3</sup> | ZH   | ACT. AMILASICA, PROT. x 10 <sup>3</sup> | ZH   | ACT. AMILASICA, PROT. x 10 <sup>3</sup> |
| 0                       | 45.0            |                                         | 45.2 |                                         | 45.0 |                                         |
| 24                      | 37.5            | 1.112                                   | 40.7 | 1.112                                   | 38.2 | 1.056                                   |
| 36                      | 36.3            | 1.778                                   | 38.4 | 1.667                                   | 35.5 | 1.334                                   |
| 48                      | 36.2            | 2.012                                   | 35.0 | 2.056                                   | 32.1 | 1.945                                   |
| 60                      | 34.9            | 2.418                                   | 32.3 | 2.779                                   | 24.7 | 2.118                                   |
| 72                      | 33.2            | 2.779                                   | 29.2 | 3.151                                   | 28.8 | 2.376                                   |
| 84                      | 32.9            | 2.901                                   | 27.2 | 3.299                                   | 27.8 | 2.546                                   |
| 96                      | 31.4            | 3.023                                   | 30.8 | 3.356                                   | 27.3 | 2.501                                   |

H N V A DEL TIEMPO DE FERMENTACION (1) Y LA TEMPERATURA (2) PARA:

PRODUCCION DE AMILASAS

| FUENTE  | S.L. | S.C.  | S.M.  | Fe   | Prot |
|---------|------|-------|-------|------|------|
| 1       | 6    | 8.69  | 1.448 | 9.89 | 11   |
| 2       | 2    | 1.16  | 6.875 | 5.30 | 11   |
| ERRORES | 12   | 1.81  | 0.161 |      |      |
| TOTAL   | 20   | 11.66 |       |      |      |

PRODUCCION DE PROTEASAS

| FUENTE  | S.L. | S.C.   | S.M.  | Fe    | Prot |
|---------|------|--------|-------|-------|------|
| 1       | 6    | 14.198 | 2.266 | 38.52 | 11   |
| 2       | 2    | 2.923  | 1.466 | 20.62 | 11   |
| ERRORES | 12   | 0.737  | 0.061 |       |      |
| TOTAL   | 20   | 17.868 |       |       |      |

**TABLA XI : OBTENCION DEL ESTRACIO ACUOSO CRUDO DE AMILASAS Y PROTEASAS DE UN CULTIVO DE  
 SALVADO DE TRIGO A DIFERENTES CONDICIONES DE EXTRACCION**

| TIEMPO<br>DIAS | ACTIVIDAD AMILASICA |       |       |       | ACTIVIDAD PROTEOLITICA |         |        |        |
|----------------|---------------------|-------|-------|-------|------------------------|---------|--------|--------|
|                | :CON AGITACION      |       | :20 C |       | :CON AGITACION         |         | :20 C  |        |
|                | 5 C                 | 20 C  | 5 C   | 20 C  | 5 C                    | 20 C    | 5 C    | 20 C   |
| 1              | 1.834               | 1.879 | 2.334 | 2.568 | 83.967                 | 77.333  | 69.53  | 89.63  |
| 2              | 2.201               | 2.245 | 2.857 | 3.001 | 95.089                 | 107.114 | 75.97  | 108.75 |
| 3              | 2.701               | 2.834 | 2.868 | 3.057 | 101.598                | 106.016 | 79.67  | 11.87  |
| 4              | 2.89                | 2.79  | 3.112 | 3.346 | 107.967                | 109.333 | 85.92  | 114.79 |
| 5              | 2.712               | 3.09  | 3.212 | 3.39  | 109.919                | 113.431 | 92.75  | 116.36 |
| 6              | 2.725               | 3.166 | 3.246 | 3.334 | 110.504                | 114.797 | 95.75  | 115.8  |
| 7              | 2.801               | 3.379 | 3.234 | 3.359 | 110.041                | 115.187 | 98.41  | 114.79 |
| 8              | 2.789               | 3.38  | 3.125 | 3.328 | 110.702                | 115.091 | 100.02 | 102.81 |

\* LA ACTIVIDAD AMILASICA Y PROTEASICA SE EXPRESAN EN "U" POR CADA 0.5 ml Y 0.1 ml Y 0.1 ml  
 DE ESTRACIO EN UNITARIO RESPECTIVAMENTE EN EL TIEMPO DADO

TABLA XII : CONCENTRACION DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMATICO  
 POR EL METODO DE PRECIPITACION PROTEICA  
 A.- PRECIPITACION CON ALCOHOL

| CONCENTRACION<br>DE ALCOHOL<br>VOLUMEN.FINAL | AMILASAS  |              | PROTEASAS |              |
|----------------------------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
|                                              | ACTIVIDAD | % RECUPERAC. | ACTIVIDAD | % RECUPERAC. |
| 20                                           | 0.032     | 11.9         | 6.78      | 5.9          |
| 30                                           | 0.033     | 12.2         | 11.61     | 10.1         |
| 40                                           | 0.033     | 12.2         | 17.59     | 15.3         |
| 50                                           | 0.033     | 13.7         | 35.65     | 31           |
| 60                                           | 0.237     | 87.7         | 94.29     | 82           |
| 70                                           | 0.258     | 95.6         | 120.85    | 105.1        |
| 80                                           | 0.251     | 92.9         | 117.29    | 102.1        |

Actividad del extracto crudo de amilasas = 0.270 (100%)

Actividad del extracto crudo de proteasas =  $114.99 \times 10^{-3}$  (100%)

B.- PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

| % SATURACION<br>DE SULFATO EN LA<br>SOLUCION FINAL | AMILASAS  |              | PROTEASAS |              |
|----------------------------------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
|                                                    | ACTIVIDAD | % RECUPERAC. | ACTIVIDAD | % RECUPERAC. |
| 20                                                 | 0.025     | 8.7          | 21.09     | 18.0         |
| 40                                                 | 0.086     | 30.4         | 34.44     | 29.4         |
| 60                                                 | 0.186     | 66.1         | 39.01     | 33.3         |
| 80                                                 | 0.289     | 102.6        | 127.21    | 108.6        |
| 100                                                | 0.283     | 100.2        | 124.05    | 105.9        |

Actividad del extracto crudo de amilasas = 0.282 (100%)

Actividad del extracto crudo de proteasas =  $117.14 \times 10^{-3}$  (100%)

\* Los precipitados resultantes, fueron colectados, secados pulverizados y resuspendidos en agua desionizada, al volumen inicial del extracto usado para medir sus actividades enzimáticas.

TABLA XIII : VARIACION DEL NITROGENO TOTAL (gr %) DURANTE LA FERMENTACION DEL MURROMI

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |       |       | SUSTRATO SOLIDO |       |       | PREPARACION ENZIMATICA |       |       |
|----------------|-------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|------------------------|-------|-------|
|                | 1           | 2     | x     | 1               | 2     | x     | 1                      | 2     | x     |
| 3              | 0.436       | 0.445 | 0.441 | 0.409           | 0.418 | 0.414 | 0.526                  | 0.5   | 0.513 |
| 18             | 0.509       | 0.598 | 0.563 | 0.457           | 0.484 | 0.471 | 0.641                  | 0.675 | 0.657 |
| 33             | 0.61        | 0.628 | 0.619 | 0.628           | 0.708 | 0.668 | 0.551                  | 0.601 | 0.576 |
| 48             | 0.631       | 0.638 | 0.635 | 0.671           | 0.59  | 0.681 | 0.739                  | 0.758 | 0.749 |
| 63             | 0.665       | 0.702 | 0.634 | 0.689           | 0.708 | 0.699 | 0.739                  | 0.782 | 0.761 |

ANVA

| Fuente               | S.L. | S.C. | C.M.  | Fc    | Prob. |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 0.03 | 0.014 | 19.32 | **    |
| Tiempo de Fermentac. | 4    | 0.26 | 0.064 | 91.5  | **    |
| Tratamiento x Tiempo | 8    | 0.05 | 0.006 | 8.29  | **    |
| Error                | 15   | 0.01 | 0.001 |       |       |
| TOTAL                | 29   | 0.35 |       |       |       |

C.V = 4.362

TABLA XIV : VARIACION DEL NITROGENO AMINICO LIBRE ( g/ ANL 2) DURANTE LA FERMENTACION DEL MORONI

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |        | SUSTRATO SOLIDO |        |        |        | PREPARACION ENZIMATICA |        |        |        |
|----------------|-------------|--------|-----------------|--------|--------|--------|------------------------|--------|--------|--------|
|                | 1           | 2      | 1               | 2      | 1      | 2      | 1                      | 2      | 1      | 2      |
| 3              | 0.1128      | 0.1143 | 0.1135          | 0.1263 | 0.1353 | 0.1308 | 0.0992                 | 0.1038 | 0.097  | 0.097  |
| 38             | 0.2565      | 0.2674 | 0.262           | 0.2375 | 0.1703 | 0.2239 | 0.2701                 | 0.2755 | 0.2728 | 0.2728 |
| 33             | 0.3016      | 0.2951 | 0.2984          | 0.3213 | 0.3049 | 0.3131 | 0.3295                 | 0.3361 | 0.3328 | 0.3328 |
| 48             | 0.3652      | 0.3737 | 0.3744          | 0.4135 | 0.418  | 0.4158 | 0.5376                 | 0.5406 | 0.5391 | 0.5391 |
| 63             | 0.4321      | 0.4245 | 0.4238          | 0.4706 | 0.4832 | 0.4769 | 0.5867                 | 0.5853 | 0.586  | 0.586  |

ANVA

| Fuente               | S.L. | S.C.  | C.M.  | Fc      | Prob. |
|----------------------|------|-------|-------|---------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 0.03  | 0.014 | 221.79  | ***   |
| Tiempo de Fermentac. | 4    | 0.56  | 0.14  | 2748.01 | ***   |
| Tratamiento x tiempo | 8    | 0.03  | 0.004 | 68.94   | ***   |
| Error                | 15   | 0.945 | 0.63  |         |       |
| TOTAL                | 29   | 0.621 |       |         |       |

C.V = 2.43 %

TABLA XV : VARIACION DEL RENDIMIENTO DE NITROGENO (2) DURANTE LA FERMENTACION DEL MORDOMI

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |       | SUSTRAID SOBRIJO |       |       |       | PREPARACION ENZIMATICA |       |       |   |
|----------------|-------------|-------|------------------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|---|
|                | 1           | 2     | 1                | 2     | 3     | 4     | 1                      | 2     | 3     | 4 |
| 3              | 25.88       | 25.67 | 28.14            | 30.82 | 32.38 | 31.6  | 17.15                  | 20.76 | 18.96 |   |
| 18             | 46.48       | 44.75 | 35.47            | 51.92 | 43.47 | 40.71 | 42.16                  | 40.85 | 41.51 |   |
| 33             | 48.95       | 46.97 | 42.46            | 51.14 | 43.04 | 45.09 | 59.77                  | 55.96 | 57.86 |   |
| 48             | 56.47       | 59.55 | 59.01            | 61.16 | 60.59 | 61.09 | 72.73                  | 71.35 | 72.04 |   |
| 63             | 63.6        | 60.45 | 62.03            | 68.21 | 68.21 | 68.21 | 79.37                  | 74.62 | 77.09 |   |

A N N A

| Fuente               | S.L. | S.C.    | C.M.     | Fr     | Prob. |
|----------------------|------|---------|----------|--------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 130.99  | 65.493   | 8.71   | **    |
| Tiempo de Fermentar. | 4    | 7093.79 | 1773.437 | 235.86 | **    |
| Tratamiento x Tiempo | 8    | 638.74  | 79.842   | 10.62  | **    |
| Error                | 15   | 112.78  | 7.519    |        |       |
| TOTAL                | 29   | 7976.3  |          |        |       |

C.V = 5.382

TABLA XVI : VARIACION DE AZUCARES REDUCTORES (gr Glucosa l) DURANTE LA FERMENTACION  
 DEL MORONI

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |      | SUSTRATO SOLIDO |       |       |       | PREPARACION ENZIMATICA |      |
|----------------|-------------|------|-----------------|-------|-------|-------|------------------------|------|
|                | 1           | 2    | 1               | 2     | 1     | 2     | 1                      | 2    |
| 3              | 2.38        | 2.32 | 2.35            | 2.38  | 2.26  | 2.32  | 2.32                   | 2.54 |
| 18             | 2.58        | 2.64 | 2.6             | 2.48  | 2.64  | 2.56  | 2.82                   | 2.7  |
| 33             | 2.78        | 2.86 | 2.82            | 2.84  | 3.12  | 2.98  | 3.26                   | 3.16 |
| 48             | 2.76        | 2.89 | 2.875           | 2.94  | 2.99  | 2.965 | 3.3                    | 3.23 |
| 63             | 2.98        | 2.99 | 2.985           | 3.143 | 3.163 | 3.151 | 3.408                  | 3.38 |

A N V A

| Fuente               | 6.L. | S.C. | C.M.  | Fc    | Prob. |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 0.48 | 0.239 | 28.59 | **    |
| Tiempo de Fermentar. | 4    | 2.44 | 0.809 | 32.77 | **    |
| Tratamiento * tiempo | 8    | 0.07 | 0.009 | 1.04  | NS    |
| Error                | 15   | 0.13 | 0.008 |       |       |
| TOTAL                | 29   | 3.12 |       |       |       |

C.V = 3.21



-----  
 TABLA VIII: VARIACION DE LA ACIDEZ ( gr ac. lático %) DURANTE LA FERMENTACION  
 DEL MORONI  
 -----

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |       | SUSTRATO SOLIDO |       | PREPARACION ENZIMATICA |       |
|----------------|-------------|-------|-----------------|-------|------------------------|-------|
|                | 1           | 2     | 1               | 2     | 1                      | 2     |
| 3              | 0.34        | 0.352 | 0.346           | 0.354 | 0.344                  | 0.349 |
| 18             | 0.704       | 0.873 | 0.798           | 0.807 | 0.485                  | 0.546 |
| 33             | 1.008       | 1.184 | 1.086           | 1.07  | 1.098                  | 1.084 |
| 48             | 1.351       | 1.445 | 1.398           | 1.399 | 1.425                  | 1.412 |
| 63             | 1.41        | 1.414 | 1.412           | 1.45  | 1.392                  | 1.421 |
|                |             |       |                 |       | 1.415                  | 1.415 |
|                |             |       |                 |       | 1.415                  | 1.403 |

A R V A

| Fuente               | S.L. | S.E.  | C.M.  | Fr     | Prob. |
|----------------------|------|-------|-------|--------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 0.81  | 0.005 | 1.76   | NS    |
| Tiempo de Fermentac. | 4    | 5.33  | 1.332 | 487.13 | **    |
| Tratamiento x Tiempo | 8    | 0.65  | 0.086 | 2.15   | NS    |
| Error                | 15   | 0.04  | 0.003 |        |       |
| TOTAL                | 29   | 50.73 |       |        |       |

C.V = 55.4 %

TABLA XVIII VARIACION DEL PH DURANTE LA FERMENTACION DEL MORDOMI

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |      | SUSTRATO SOLIDO |      | PREPARACION ENZIMATICA |      |
|----------------|-------------|------|-----------------|------|------------------------|------|
|                | 1           | 2    | 1               | 2    | 1                      | 2    |
| 3              | 5.38        | 5.36 | 5.37            | 5.6  | 5.6                    | 5.54 |
| 18             | 4.24        | 4.25 | 4.36            | 4.36 | 4.36                   | 5.24 |
| 33             | 4.34        | 4.34 | 4.2             | 4.21 | 4.21                   | 4.24 |
| 48             | 4.16        | 4.16 | 4.06            | 4.07 | 4.07                   | 4.07 |
| 63             | 4.1         | 4.1  | 4.04            | 4.06 | 4.05                   | 4.06 |

A N V A

| Fuente               | G.L. | S.C.  | C.M.  | F.L      | Prob. |
|----------------------|------|-------|-------|----------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 0.21  | 0.106 | 648.82   | **    |
| Tiempo de Fermentac. | 4    | 8.61  | 2.153 | 13181.24 | **    |
| Tratamiento x Tiempo | 8    | 1.02  | 0.127 | 778.84   | **    |
| Error                | 15   | 9.45  | 0.163 |          |       |
| TOTAL                | 29   | 9.841 |       |          |       |

C.V = 0.28

-----  
**TABLA XIX : VARIACION DE LA ACUIDAD AMILASICA (1/40.5ml) SIYAO) DURANTE LA FERMENTACION**  
 -----

DEL MORROMI

| TIEMPO | TRADICIONAL       | SUSTRATO SOLIRO   | PREPARACION ENZIMATICA |
|--------|-------------------|-------------------|------------------------|
| BIAS   | 1 ; 2 ; X         | 1 ; 2 ; X         | 1 ; 2 ; X              |
| 3      | 2.108 1.974 2.041 | 2.132 2.516 2.324 | 3.2 3.25 3.225         |
| 18     | 2.25 2.254 2.252  | 2.415 2.451 2.433 | 2.72 2.73 2.725        |
| 33     | 1.3 2.314 1.807   | 2.002 2.002 2.002 | 2.3 2.316 2.308        |
| 48     | 1.66 1.676 1.668  | 1.688 1.704 1.696 | 2.015 2.045 2.03       |
| 63     | 0.86 0.864 0.862  | 1.44 1.452 1.446  | 1.83 1.84 1.835        |

A N V A

| Fuente               | S.L. | S.E. | C.M.  | fc      | Prob. |
|----------------------|------|------|-------|---------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 3.07 | 1.534 | 1144.58 | **    |
| Tiempo de Fermentac. | 4    | 5.65 | 1.412 | 1053.54 | **    |
| Tratamiento x tiempo | R    | 0.79 | 0.099 | 73.59   |       |
| Error                | 15   | 0.02 | 0.001 |         |       |
| TOTAL                | 29   | 9.53 |       |         |       |

C.V = 1.821

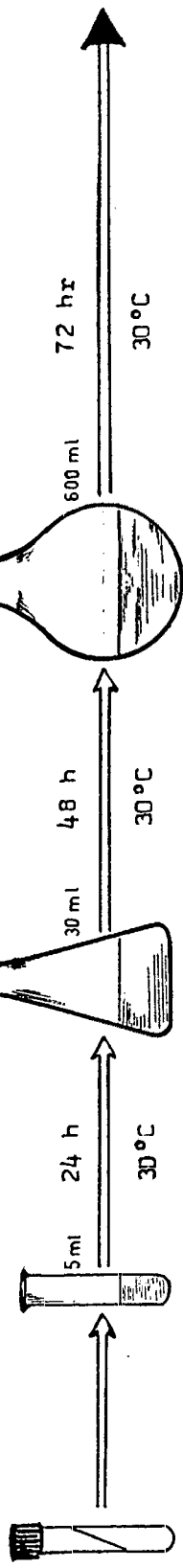
TABLE II VARIACION DE LA ACTIVIDAD PROTERGICA (U/O.J ml x 10 ) DURANTE LA FERMENTACION DEL MERMOL

| TIEMPO<br>DIAS | TRADICIONAL |         | SUSTRATO SOLIDO |         | PREPARACION ENZIMATICA |         |         |         |         |
|----------------|-------------|---------|-----------------|---------|------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                | 1           | 2       | 1               | 2       | 1                      | 2       |         |         |         |
| 3              | 100.152     | 100.174 | 100.163         | 109.131 | 109.145                | 109.138 | 174.145 | 174.863 | 174.504 |
| 18             | 101.102     | 99.224  | 100.163         | 99.932  | 102.734                | 101.333 | 127.455 | 129.455 | 128.455 |
| 33             | 82          | 82.032  | 82.016          | 85.331  | 85.775                 | 84.455  | 115.002 | 116.547 | 115.772 |
| 48             | 74          | 74.032  | 74.016          | 70.939  | 75.971                 | 72.455  | 105.041 | 105.041 | 105.041 |
| 63             | 58.431      | 58.431  | 57.431          | 59.4    | 57.414                 | 58.407  | 99.22   | 97.202  | 98.211  |

A N V A

| Fuente               | S.L. | S.C.   | E.M.  | Fc      | Prob. |
|----------------------|------|--------|-------|---------|-------|
| Tratamiento          | 2    | 10.906 | 5.453 | 3938.52 | **    |
| Tiempo de fermentac. | 4    | 11.763 | 2.941 | 2123.86 | **    |
| Tratamiento x tiempo | 8    | 1.802  | 0.2   | 144.61  | **    |
| Error                | 15   | 0.021  | 0.001 |         |       |
| TOTAL                | 29   | 24.292 |       |         |       |

FIGURA No 5 PREPARACION DE INOCULOS PARA LA FERMENTACION DEL MOROMI

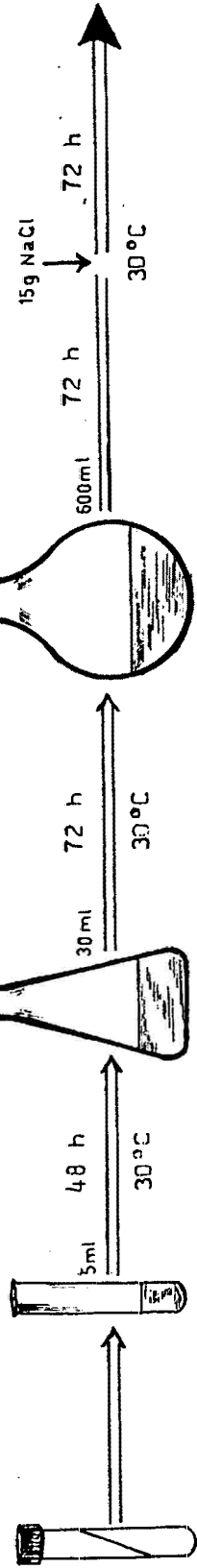


Pediococcus halophilus  
ATCC 21786

Caldo Acetato de Na

Caldo Acetato de Na, NaCl 5%

Caldo Acetato de Na, NaCl 10%



Zigosaccharomyces rouxii  
ATCC 34518

Caldo M<sub>40</sub> Y

Caldo M<sub>40</sub> Y NaCl 5%

Caldo M<sub>40</sub> Y NaCl 7.5%

10%