

8701272
20

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE LA SOPA DE MISO
CON RELACION A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA AMILASA Y PROTEASA

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA GRISELDA VILLELA CARDENAS
ASESOR: ING. ENRIQUE MACEDO VELASCO
GUADALAJARA, JALISCO. 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

García

Juan



DEDICATORIA:

A MI SEÑOR JESÚS.

Mis ojos pondré en los fieles de la tierra,
para que estén conmigo;
El que ande en el camino de la perfección,
este me servirá.
Salmo 101:6

A MI PAPÁ:

Sr. Jesús Villela Reyes
Por su aliento y provisión.

A MIS HERMANOS:

Laura Delia, Lourdes, Martha, Chuyita y José Luis.
*Por la unidad y el amor que nos tenemos
gracias a Dios y a Mamá.*

A MIS MAESTROS:

Dr. Takeo Tabata.
Dr. Tetsuya Ogura Fujii
Ing. Enrique Macedo
Q.F.B. Rosa R. González M.
Dra. Rosa María Muñoz S.
Q.F.B. Emma Liliana Gómez C.
*Gracias por impartirme de sus
conocimientos y amistad.*

A MIS AMIGOS:

Concepción Ramírez Illán
Martina G. de Corpus
Delia Martínez
Anita Niño
Isabel Cervantes
Por su amor y compañerismo.

INDICE:

CAPITULO I.

INTRODUCCION:	2
GENERALIDADES	5

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODO DE ANALISIS	23
-------------------------------------	----

CAPITULO III.

PRESENTACION DE RESULTADOS	44
----------------------------------	----

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES	55
--------------------	----

CAPITULO V.

BIBLIOGRAFIA	59
--------------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERALIDADES

INTRODUCCION.

La soya (*Glycine max*) en el Oriente es fundamental en la dieta de un gran sector de la población.

Debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína; en los últimos años ha habido un desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral. La soya en la preparación del miso es un ingrediente principal. El miso es el nombre japonés dado al alimento mas importante de soya y cereales. Es el producto de la fermentación de la mezcla de soya, arroz, inoculado con Aspergillus Oryzae, con cierta concentración de sal; es también hecho y consumido en otras partes de Oriente; en cada nación tiene su propio nombre: Chiang en China; Tauco en Indonesia; Doenjang en Corea y Tao Chieo en Tailandia. Este producto tiene semejantes sus fermentaciones con respecto a los microorganismos de la salsa de soya.

El miso tiene la consistencia de mantequilla de cacahuete, algunos son suaves y otros son granulados. El color varía de un color amarillo luminoso y brillante a un marrón negruzco, generalmente se dice que en color obscuro es más fuerte el sabor. Tiene un distintivo aroma agradable parecido al de la salsa de soya y es típicamente salado, aunque la concentración de sal puede variar; algunos pueden tener sabor dulce. La salsa de soya es usada como un agente saborizante en la cocción así como condimento refinado, es usado en lugar de la salsa de soya y sal y da un sabor especial en los alimentos.

Usualmente el miso no es consumido por si sólo, pero se disuelve en agua como base para varios tipos de sopa, muchas veces la sopa contiene vegetales, algas, tofu o pescado. Este puede servir como un sasonador para cocinar carnes y platillos con vegetales y puede ser mezclado con vegetales frescos (crudos) tales como pepinos; algunos pueden ser adicionados al pescado. las variaciones de la pasta del frijol son innumerables. Sólo en Japón hay muchos tipos de miso así como hay diferentes variedades de queso en los Estados Unidos; se hacen variando el cereal usado, la relación de soya, cereal (arroz, trigo), contenido de sal, tiempo de fermentación y otros ingredientes tal como pimienta la cual es muy popular en China y Corea.

En México se conoce poco sobre este alimento, pero siendo una preparación sencilla y de fácil adquisición de la materia prima y por la información dada ultimamente que de acuerdo a los datos estadísticos comprobados por la Sociedad de Cáncer en Japón, las personas que consumen mucho miso tienden a disminuir la probabilidad de que se presente el cáncer. (Cita Bibliográfica No. 3)

Con este breve estudio se elaboró un mejor método de preparación con las condiciones óptimas para su mejor aprovechamiento nutricional de consumo de la sopa de miso.

Se observaron cambios en la composición de la sopa de miso, donde se analizó la actividad enzimática de la amilasa y proteasa en su más bajo contenido de sal; de acuerdo a la variación de temperatura y concentración de sal. Siendo el miso la fuente principal de enzimas por medio del cual se preparó un líquido extracto de miso; reportando los resultados en % de maltosa y % de Nitrógeno amínico, que son índices de la presencia de carbohidratos y proteínas; y la óptima temperatura para obtener lo máximo de estos nutrientes en una sopa de vegetales (papa) y sopa de pescado. Los resultados fueron buenos en los análisis hechos en actividad enzimática; por lo tanto se procedió a preparar la sopa de miso estableciendo las condiciones de temperatura, tiempo de cocción con el objetivo de obtener el mejor valor nutritivo.

Este estudio se realizó en la Universidad Autónoma de Guadalajara en el Departamento de Investigación del Instituto de Ciencias Exáctas y Terrestres.

GENERALIDADES.

El miso es un producto de la fermentación; y para que la fermentación cumpla su objetivo con la mayor efectividad, mayor rendimiento y óptimo intervalo de tiempo, es necesario reunir los siguientes elementos:

- 1) Contar con un microorganismo idóneo para el proceso y/o producto particular.
- 2) Seleccionar el medio de cultivo adecuado para el o los microorganismos a utilizar; es decir que el medio contenga todos los nutrientes esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción.
- 3) Establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación.

Lo anterior se resume como sigue:

MICROORGANISMOS	ELEMENTOS NUTRIENTES	CONDICIONES AMBIENTALES ADECUADAS
BACTERIAS LEVADURAS HONGOS TEJIDO CELULAR, ETC.	C,H,O,N,S,P. METALES VITAMINAS ETC.	pH, TEMPERATURA VISCOSIDAD OXIGENO DISUELTO

Todas estas variables son las que interaccionan en la fermentación y deben optimizarse para lograr proceso adecuado.

El miso se considera un alimento enriquecido por cumplir con los siguientes requisitos: Su materia prima es abundante y disponible; dispone de procedimientos tecnológicos; puede reducirse a gran escala y bajo costo; calidad sanitaria; demuestra su valor nutritivo; buena tolerancia y ausencia de tóxicos; aceptable sensorialmente; fácil preparación; gran variedad de sabores; empaque atractivo; bajo costo.

El miso puede ser clasificado en base al color y textura del producto terminado, en los rangos de blanco y amarillo brillante a rojo, y de dulce a salado. El miso de arroz es el más popular y puede ser dividido en tres tipos: miso blanco dulce amarillo brillante, amarillo brillante salado, amarillo rojo salado.

Estos tipos de miso y arroz son hechos por variación de relación de ingredientes, remojo y cocinado; condiciones que implican variación de tiempo, temperatura, tiempo de fermentación y maduración. El miso también es clasificado en base al lugar donde es producido, nombrados por ejemplo Sendai, Shinshu, etc.

CARACTERÍSTICAS SOBRE LOS TRES TIPOS DE MISO DE ARROZ EN RELACIÓN A LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN			
	Miso blanco	Miso salado	Miso salado rojo
Soya:arroz:sal	100:200:35	100:60:65	100:50:48
Tiempo de fermentación	2 - 4 días	30 días	60 días
Temperatura de fermentación	50° C	30 - 35° C	30 - 35° C
Color	Amarillo luminoso pálido	Amarillo brillante	Rojo
Sabor	Muy dulce	Salado	Salado
Sal (% NaCl)	5	12 - 13	12.5 - 13.5
Humedad (%)	43	48	50
Proteínas (%)	8	10	12
Azúcar (%)	20	13	11
Vida de anaquel	Corto	Bastante largo	Largo

Cita Bibliográfica No. 12

El miso contiene de 48 - 52% de agua. Si disminuye es demasiado duro, y si es más de 55% viene a ser demasiado suave. Naturalmente el contenido de humedad afecta grandemente la velocidad de la fermentación. Actualmente ha ocurrido una gran revolución en la manufacturación del miso, la cual ha tomado la forma de equipo automático y un procesamiento continuo.

MATERIA PRIMA EN LA ELABORACIÓN DEL MISO TRADICIONAL.

a) SOYA:

La soya pertenece a la familia leguminosa, subfamilia papilinoidea y género *Glycine* L. De acuerdo con Mateo Box, el género *Glycine* comprende doce o quince especies, de las cuales *Glycine max* es la de mayor importancia económica. La descripción botánica de la especie *Glycine max*. (L.) proporcionada por Mateo es la siguiente: "Probablemente esta especie procede de la *Glycine ussuriensis Rengel et Maack*; forma silvestre que se encuentra en el extremo oriente".

Son plantas herbáceas, anulares, con sistema radicular bien desarrollado y con abundante nodulación; tallos erguidos y bien ramificados, la longitud de los tallos varía de 45 centímetros a más de 1.5 metros.

La soya prospera en casi todos los tipos de suelo, excepto los muy arenosos. La soya se utiliza como planta en los forrajes para alimento de ganado, y como semilla o grano en alimentos para el hombre; y el grano puede ser verde o seco; los granos verdes son ricos en vitamina A y contiene buena cantidad de vitamina B y Rivo flavina, no así en los granos secos, en los cuales el contenido vitamínico disminuye considerablemente.

Los granos son más ricos en proteínas y grasas que la mayoría de las variedades de frijol común, pues algunas variedades de soya contienen hasta 1.5 veces el porcentaje de proteínas.

Los granos verdes o secos también son una buena fuente de minerales como calcio, hierro y fósforo.

Los granos secos se usan en la elaboración de muchos productos. Generalmente muchos de los productos derivados de la soya no se usan solos, sino como complementos de otros alimentos, para aumentar el contenido proteico.

Tabla I.

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES DE UN PRODUCTO DE FRIJOL DE SOYA.

Aminoácidos esenciales (Gm./16 Gm.N)													
Fuente de proteína del frijol	Contenido de proteína (%)												
soya	Iso	Leu	Lis	Met	Cis	Met+Cis	Fen	Tir	Fen+Tir	Tre	Trip	Val	
Miso	17.3	6.5	13.1	5.9	1.2	6.4	4.1	10.5	3.0	1.2	5.7

Cita Bibliográfica No. 15

Las siguientes abreviaciones han sido usadas: Iso, Isoleucina; Leu, Leucina; Lis, Lisina; Met, Metionina; Cis, Cisteína; Fen, Fenilalanina; Tir, Tirosina; Tre, Treonina; Trip, Triptófano; Val, Valina.

PROTEÍNAS:

Los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción en las proteínas de soya son: ácido glutámico y ácido aspártico, le siguen la leucina, arginina y lisina.

Las fracciones 11S y 7S constituyen aproximadamente el 70% del total de las proteínas de soya y se encuentran en ella como proteínas de almacenamiento; las proteínas restantes, fracciones 2S y 15S, están compuestas de enzimas intercelulares (lipoxigenasa, ureasa, amilasa), hemaglutininas, proteína inhibidor y membrana lipoprotéica, importantes por su actividad biológica.

Los mayores componentes de las proteínas de soya están clasificados de acuerdo a sus propiedades de sedimentación. (Tabla II).

Tabla II.: DISTRIBUCIÓN APROXIMADA DE LOS MAYORES Y PRINCIPALES COMPONENTES DE LAS PROTEÍNAS DE SOYA.

FRACCIÓN	CONTENIDO (%)	COMPONENTES PRINCIPALES
2S	8	Tripsina inhibidor, Citocromo.a
7S	35	Lipoxigenasa, Amilasa, Globulinas (cerca de 85%), Hemaglutininas
11S	52	Globulinas
15S	5	Polímeros

Cita Bibliográfica No. 1

La globulina 11S es rica en glutaminas y residuos de asparagina y baja en histidina, triptófano, metionina y cisteína; la mayoría de los aminoácidos básicos están internos. Es una estructura cuaternaria, compuesta de 3 subunidades ácidas y 3 básicas de 35,000 y 20,000 daltons, respectivamente.

La 7S globulina es una proteína cuaternaria trimétrica, en la cual las subunidades están asociadas vía hidrofóbica y quizás uniones de hidrógeno. La más significativa diferencia entre las 7S globulinas y las 11S globulinas es la superioridad de 5 a 6 veces en contenido de triptófano, metionina y $\frac{1}{2}$ cisteína, de esta última.

La estructura primaria de las proteínas se conoce muy poco; por lo tanto la determinación de la estructura primaria de estas multicadenas de proteínas, debe ser precedida al aislamiento y purificación de las subunidades.

GRASA:

Los principales ácidos grasos que se encuentran en la soya son: ácido linoléico, ácido oléico y ácido linolénico.

CARBOHIDRATOS:

Los carbohidratos solubles de la soya no han sido estudiados seriamente como una fuente potencial de alimento o nutrición para el hombre. Su principal contribución es para animales, como contribuyentes de algunas calorías, especialmente para rumiantes. Entre los azúcares que contiene la soya se encuentran la sucrosa, rafinosa y estafiosa; la glucosa está presente en la soya inmadura en cantidades substanciales, pero desaparece conforme el frijol se va acercando a la madurez.

b) MICROORGANISMOS:

Los microorganismos que tienen mayor importancia en la elaboración del miso son:

Aspergillus Oryzae, Aspergillus flavus-soyae, Saccharomyces rouxii.

1. Aspergillus Oryzae

Este hongo, procedente del Japón, es el de mayor importancia técnica de esta clase. Se utiliza desde hace siglos para la preparación de la bebida nacional japonesa, el vino de arroz saké.

La forma de este hongo muestra rangos característicos. Durante la formación de los cuerpos fructíferos se observa primeramente un hinchamiento mazudo del extremo terminal de una hifa, que emite esterigmas en todas direcciones y que con el crecimiento de estas formaciones se redondea poco a poco hasta producir una esfera perfecta. Los esterigmas terminan en cabezuelas bien conformadas y producen largas cadenas de esporas amarillas, que se desprenden fácilmente y adquieren con el tiempo una coloración pardo grisácea casi imperceptible. Las esporas son esféricas, gruesas, lisas o finamente granudas y conservan su capacidad germinativa durante años. También es notable la gran variedad de los conidióforos.

El hongo se cultiva sobre el arroz; con mucha facilidad a 30 °C. Tiene una capacidad sacarificante (enzima:amilasa) para la almidón del arroz; y una fuerza proteolítica para la desintegración de las proteínas.

2. Aspergillus flavus soyae.

Características generales:

Tiene micelio ramificado, con las hifas vegetativas introducidas en el medio nutritivo y las fértiles o conidióforas, aéreas. Los conidióforos tabicados o no tabicados emergen de las células basales introducidas en el substrato o sobre el mismo. Los conidióforos son células miceliales especiales, agrandadas y rodeadas de una gruesa cubierta; su proporción distal se hincha formando una vesícula que sirve de soporte a los esterigmas dispuestos radialmente; de los cuales se originan por extensión y división celular las conidias. Estas conidias forman cadenas y su coloración es característica de cada especie, en este caso es verde amarillenta.

Necesitan menos humedad que la generalidad de las levaduras y bacterias. Son aerobios y crecen a pH óptimo de 5.0 a 6.0; Temperatura óptima de crecimiento 25 - 30 °C; Debido a que excretan enzimas digestivas, éstas les permiten crecer en cualquier substrato que contenga sustancias orgánicas. Obtienen carbono y energía de los carbohidratos, especialmente de la glucosa, y las fuentes de nitrógeno las obtienen de compuestos orgánicos, como peptonas, peptidos y aminoácidos. Necesitan para su crecimiento trazas de Fe, Cu, Zn, Mn, y Mo.

El crecimiento de los mohos es lento, comparado con el de las bacterias y levaduras, por lo que, cuando las condiciones son favorables al desarrollo de todos estos organismos, los mohos están en condiciones desfavorables de competencia; sin embargo, una vez iniciado, su crecimiento puede ser muy rápido. Por otra parte, al

disponer de cantidades excesivas de nutrientes, segregan en el medio productos de desasimilación enzimas alfa-amilasa, proteasa ácida, proteasa neutra y lipasa, además de otras; y acumulan en el micelio sustancias de reserva (grasas e hidratos de carbono).

3. Saccharomyces rouxii:

Características generales:

Células redondas, ovoides alargadas o filiformes y con pseudomicelio. Reproducción multipolar o formación de ascosporas que pueden seguir a la conjugación, pero pueden también desarrollarse a partir de células diploides, cuando éstas presentan la fase vegetativa; En términos generales, las levaduras necesitan un poco más de agua que los mohos, pero menos que las bacterias. Son osmófilas, se desarrollan bien en medios con una presión osmótica elevada. En el miso se desarrollan bien en concentración de NaCl al 18%; La utilización anaeróbica de oxígeno genera principalmente alcohol etílico y bióxido de carbono. Sin embargo, altas concentraciones de bióxido de carbono inhiben el crecimiento de las levaduras; Sus requerimientos de pH son mucho más limitados que el de los mohos; el pH óptimo de crecimiento puede localizarse entre pH 4.5 y 5.0; La temperatura más adecuada suele situarse entre 20 y 30 °C. La incubación a 30 °C suele ser satisfactoria. Se obtienen grandes cantidades de alcohol etílico a temperaturas algo menores.

c) ENZIMAS:

La hidrólisis de proteínas requiere una concentración de ácido tóxico para las células vivas y temperaturas más altas que los límites fisiológicos; pero en las células vegetales y animales ocurre ésta hidrólisis fácilmente debido a los catalizadores orgánicos llamados enzimas, que constituyen la base de las complejas y variadas reacciones que caracterizan las funciones vitales.

Las enzimas son proteínas; se producen dentro de las células vivas, son sustancias de alto peso molecular y pueden extraerse en estado activo; Las sustancias cuya transformación química se acelera por una enzima se llaman substratos.

Otra propiedad interesante de las enzimas es su especificidad o sea que efectúan una catálisis selectiva de una reacción con preferencia a otras posibles reacciones que podrían producirse entre las mismas sustancias; esto es que siempre tienen un sustrato que tiene una configuración precisa sobre la cual actúan con máximo efecto.

Las enzimas que se encuentran en el miso son aportadas por el Aspergillus Oryzae son amilasa y proteasa .

Las amilasas: Del género carbohidrasas que se encuentra distribuidas por todo el reino animal, vegetal o microbiano;

Son catalizadoras de la hidrólisis del enlace α -1,4 y/o α -1,6 enlaces glucosídicos de disacáridos y polisacáridos tales como azúcares y almidones.

Las amilasas han sido subdivididas en : Endoamilasas o α -amilasas.

ENDOAMILASAS o α -AMILASAS:		
NOMBRE COMUN	NUMERO DE CLASIFICACION	NOMBRE CIENTIFICO
α -amilasa	E. C . 3.2.1.1.	α -1,4 -glucan -4- glucosidolasa

Cita bibliográfica No. 3,4.

Actúan sobre los enlaces α - 1 , 4 glucosídicos que produce hidrólisis al azar del almidón en fragmentos de 6 a 9 unidades, concomitante de maltosa. Los productos primarios son oligosacáridos los cuales son divididos para producir maltosa, alguna glucosa, isomaltosa y productos de ramificación de bajo peso molecular.

EXOAMILASAS o β -AMILASAS:		
NOMBRE COMUN	NUMERO DE CLASIFICACION	NOMBRE CIENTIFICO
β -amilasa	E. C. 3.2.1.2.	β -1,4 -glucan -4- maltahidrolasa

Son de origen vegetal o microbiológico; degradan amilosa, amilopectina ó glucógeno, hidrolizando enlaces alternos glucosídicos.

Tiene lugar con inversión de configuración y por consiguiente la α -malosa es obtenida como producto final. La β -amilasa es capaz de desviar el punto de enlace, que es β -1,6 enlace glucosídico en amilopectina y glicogeno.

Esto resulta en un 55% en la conversión de amilopectina a maltosa; el otro producto es un residuo no hidrolizado se conoce como dextrina límite de β -amilasa.

PROTEASAS:

Enzimas proteolíticas: Estas son enzimas que atacan los enlaces peptídicos de las proteínas.

Se clasifican en dos grupos:

Peptidasas: (Exopeptidasas).- Actúan sobre el enlace peptídico junto a un amino libre o un grupo carboxilo. Los principales tipos de peptidasas son las siguientes:

* Carboxipeptidasas: (peptidil - aminoácido hidrolasa. E. C. 3. 4. 2.).- Requiere de un grupo carboxilo libre en el sustrato y divide el enlace peptídico adyacente a este grupo, liberando un aminoácido libre.

* Aminopeptidasas (α - amino - acil - peptidohidrolasa E. C. 3. 4. 1.).-Actúan sobre el enlace péptido adyacente esencialmente al grupo amino libre a simples péptidos.

* Dipeptidasas (Dipeptidohidrolasa E. C. 3. 4. 3.)- Específicamente actúan sólo en ciertos dipeptidos; un ejemplo es glicilglicina dipeptidasa, que requiere Co^{++} o Mn^{++} para su acción.

Proteinasas: (Endopeptidasas): Actúan sobre el interior de los enlaces peptídicos de las proteínas; ellas pueden sin embargo también romper enlaces peptídicos en apropiados peptidos simples y sus derivados. Ejemplo son: pepsina, tripsina.

Las enzimas dentro del inóculo con Aspergillus Oryzae son: Aspergillus Alkalineproteasa (E. C. 3. 4. 21. 15) y Aspergillus proteinasa o Aspergillopeptidasa.

METODO DE PREPARACION DE MISO.

Para la elaboración del miso tradicional, existen varios métodos que difieren de acuerdo a la variedad que se utilice. Pero básicamente el proceso es el mismo. Brevemente involucra la limpieza de los cereales, remojo y cocinado, la preparación del koji y el mezclado de éste con el frijol soya, sal e inóculo. La fermentación se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas para obtener el producto. El proceso es delineado en la Figura. 1.

En la producción del miso están esencialmente involucradas dos fermentaciones sucesivas. La primera involucra la preparación del koji bajo condiciones aeróbicas con cepas de Aspergillus Oryzae y Aspergillus Soyae. El koji sirve como una fuente de enzimas y nutrientes para la segunda fermentación que es anaeróbica involucrando levaduras y bacterias.

En la primera parte, después de remojar el arroz en agua toda la noche o hasta que haya un incremento de acerca 35% en el contenido de humedad, el exceso de agua es eliminado, y el arroz mojado es cocido por cerca de 40 minutos en una olla de vapor cerrada ó una hora en una abierta. El arroz es entonces esparcido en charolas, enfriado a 35 °C e inculado con aproximadamente 0.1% de Aspergillus Oryzae.

KOJI

La palabra "koji" (Tamiya 1958) es una abreviación de Kabi - Tacki que significa "flor de hongo". El proceso fué introducido en Japón y pasó a China. El koji es una fuente de enzimas para convertir el almidón en azúcares fermentables y proteínas en péptidos y aminoácidos. Los hongos del koji crecen sobre el arroz para producir amilasas las cuales convierten el almidón del arroz en azúcares fermentables; y proteasas que convierten las proteínas en péptidos y aminoácidos. Así que en la segunda etapa de fermentación el azúcar está disponible para el crecimiento de la levadura en la masa.

Los microorganismos usados en koji son casi siempre fúngicos del género Aspergillus e incluye: Aspergillus Oryzae y Aspergillus Soyae. Otros hongos están empleados hasta cierto punto para la conversión del almidón en azúcares fermentables en el proceso amilo - koji .

Los hongos usados para el koji han sido investigados extensivamente y se sabe que producen una gran variedad de enzimas incluyendo; amilasas, proteasas (tres tipos conocidos: una es activa en pH alcalino, otra en pH ácido y la otra en pH neutro nucleasas, sulfatasas, fosfatasas, transglucosidasas, peptidasas, ribonucleo-depolimerasas, fosfatasa monocleotida, adenildeaminasas y purinucleosodasas.

En el proceso moderno del koji se empieza con el crecimiento de una cepa seleccionada de Aspergillus Oryzae sobre un cultivo puro de agar. La cepa es

seleccionada por su habilidad especial, por selección natural o por mutación inducida y tiene que tener la habilidad de esporular generosamente sobre el arroz. La selección es hecha para dar un koji deseable para una fermentación particular. Las esporas de un cultivo madre son usadas para inocular 1 - 1.5 Kg. de arroz húmedo, esterilizado en una charola de madera, la cual también está esterilizada. Al arroz se le agrega 2% de cenizas de madera como una fuente de trazas de elementos. Después de cinco días de incubación, las esporas de la primera charola son usadas para inocular todas las charolas ya esterilizadas.

El área entera de producción debe estar esterilizada y los trabajadores dedicados en el área de producción de esporas entrarán con ropa completamente esterilizada para prevenir contaminación. En cuartos de incubación, el incubador y las charolas están esterilizadas con vapor entre cada serie de esporas. Las esporas se producen a una temperatura de 30 °C, se secan a 50 °C, y se almacenan a 15 °C. Se determina regularmente la pureza de la inoculación.

Las esporas de una o más cepas están mezcladas juntas y están preparadas para una fermentación particular. Así pues, el koji, para la fermentación del MISO está compuesto de varias cepas mezcladas en una proporción definida; 150 gramos de inóculo equivale a 1×10^{12} de esporas viables.

Se saca el koji usado en la fermentación del miso, quizá se encuentran tres cepas morfológicamente distintas; una esporulando brillantemente, con un tono café, otra segunda, la cual es más bien corta esporulando ligeramente y con un matiz verde amarillo, y una intermedia esporulando vigorosamente y de un tono verde amarillo.

Durante el proceso la temperatura, humedad y aireación son factores extremadamente importantes que deberán ser controlados. Cuando la fermentación se lleva a cabo en cuartos grandes, es un problema debido a la contaminación por bacterias. El crecimiento bacteriano es caracterizado por un sobrecalentamiento, resultando una condensación de agua fría sobre los granos de arroz, lo cual causa un

crecimiento más rápido de las bacterias. La contaminación se previene vaporizando los cuartos del koji, por medio de filtración de aire y lámparas ultravioletas para reducir los microorganismos indeseables que pudieran estar presentes en el aire. Otro factor importante es mantener los granos de arroz húmedos, pero sin dejarles agua libre sobre la superficie. También durante la preparación del koji, el arroz se voltea varias veces, sobre todo del fondo hacia la superficie. En las plantas modernas este volteado se hace con aparatos mecánicos automáticos. En el proceso viejo esto se hacía con la mano y esta operación incrementaba la contaminación. Para fomentar el crecimiento del hongo, la humedad es mantenida cerca del 90%. En la actualidad en las plantas nuevas, el aire es lavado y por consiguiente alto en humedad. La ventilación deberá ser adecuada para suplir oxígeno suficiente y para remover el bióxido de carbono.

En aproximadamente 40 - 48 horas, el arroz está completamente cubierto con micelio blanco de las cepas inoculadas de Aspergillus Oryzae. En el koji el micelio aparece como un fieltro de color blanco con los granos de arroz enlazados con el micelio.

No debe ocurrir contaminación incluyendo los cambios por micotoxinas o bacterias indeseables presentes.

Es esencial que el micelio del hongo penetre rápidamente en los granos de arroz para producir los azúcares fermentables útiles en la segunda fermentación.

TRAMIENTO DE LA SOYA:

Simultáneamente con la producción del koji la soya es preparada para la fermentación; aunque casi todas las variedades pueden ser usadas, la preparación requiere que la soya tenga un color amarillo brillante fino, y la cubierta de la semilla brillante lisa, se prefiere la soya de tamaño grande, porque el radio de la cáscara al cotiledón es más chico a lo largo del frijol; también requiere un alto contenido

proteínico, absorción de agua uniforme y cocinarse rápidamente; el miso es un producto que es uniforme en color y consistencia.

La soya es preparada para la fermentación es limpiada y lavada, es remojada por un tiempo de 20 horas a 16 °C de preferencia por la noche absorbiendo aproximadamente 1.2 veces su peso de agua, cambiando el agua de remojo al menos una vez, ya que puede ocurrir una fermentación rápida por bacterias formadoras de esporas; se escurre toda el agua, la soya se cocc bajo 10 - 15 lb de presión a una temperatura de 115 °C por 20 minutos en una olla cerrada; hasta que esté suficientemente blanda para ser molida fácilmente. (La temperatura y tiempo de cocimiento influye en el color y el sabor del producto final, otros factores que determinan el sabor y el color dependen de la proporción de la soya, el arroz, el koji, cantidad de sal y tiempo de fermentación).

La soya ya cocida se muele quedando como una pasta semisólida.

MEZCLADO:

Se mezclan la soya molida con el koji y la sal y se muelen ligeramente y suficiente agua es añadida hasta que el contenido de humedad de la mezcla sea cerca de 48%. La mezcla se conoce como miso verde. Las proporciones de los ingredientes en el momento del mezclado determina el tipo, color, sabor, olor, y apariencia del producto final. Así de esta manera el miso blanco contiene más arroz que soya; y en los tipos más oscuros podrían contener 50 - 90% de soya. El miso blanco contiene menos sal (4 - 8%) el cual permite una fermentación más rápida pero da al producto una vida más corta y presenta un sabor dulce derivado de azúcares producidos por enzimas de arroz koji. El miso rojo café contiene de un 11 - 14% de sal el inóculo sobre otros misos es siempre de la misma forma que el tipo de miso hecho esencialmente.

Esta mezcla es colocada en charolas para el segundo estado de fermentación.

FERMENTACIÓN:

En este punto se agrega a la mezcla ya molida el inóculo que consiste en una levadura tolerante de sal y bacteria capaz de crecer bajo condiciones anaeróbicas. Los organismos dominantes son la levadura Sacharomyces rouxii y puede estar también presente la levadura Torulopsis sp. y una bacteria produciendo ácido láctico. Para asegurar las condiciones anaeróbicas se coloca un peso sobre la superficie, inhibiendo el crecimiento de Aspergillus oryzae, al mismo tiempo, el contenido de sal limita el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas. En este estado de fermentación, las enzimas del koji actúan sobre el frijol soya y los constituyentes del arroz. El almidón es digerido por la amilasa y maltasa a dextrina, maltosa y glucosa. La proteasa actúa sobre la proteína del frijol soya para producir polipéptidos, péptidos y aminoácidos libres, los cuales realizan la palatabilidad del miso. Uno de los principales aminoácidos producidos es ácido glutámico el cual da el delicioso sabor del miso. El aceite del frijol soya es convertido en parte a ácidos grasos, los cuales contribuyen al aroma del miso.

Muchas bacterias y levaduras son las responsables de el sabor, textura, aroma, y desarrollo del color en el miso como Pediococcus halophilus, Pediococcus pentosaceus, Streptococcus faecalis y otra bacteria láctica que crece en el koji y eventualmente produce ácido láctico durante el segundo estado de fermentación.

La levadura Sacharomyces rouxii usada en el inóculo; contribuye también al placentero aroma del miso debido a que produce etil, butil, y amiloalcoholes; los ésteres producidos por la reacción de estos alcoholes con ácidos orgánicos también produce un desarrollo del aroma.

La temperatura de fermentación es de 30 - 38 °C. y el tiempo de fermentación varía con el tipo de miso preparado.

Los misos más oscuros pueden tomar de 8 a 12 meses y pueden preservarse varios meses sin refrigeración. La alta concentración de sal inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos indeseables. Incluyendo aquellos que producen toxinas.

En algunas regiones, el miso es fermentado a la temperatura ambiente de la localidad y ese miso es llamado "miso natural". Este tipo requiere de por lo menos un verano completo para completar la fermentación, porque en el invierno ocurre una pequeña fermentación.

Cuando la fermentación está completa, se deja madurar y está listo para el consumo.

MADURADO Y EMPAQUETADO.

Al final de la fermentación la masa es mantenida en un recipiente alrededor de dos semanas para la maduración. El producto madurado es entonces mezclado, molido, pasteurizado y empaquetado.

Tradicionalmente el miso se vende en recipientes de madera de varios tamaños. Hoy el empaque es en tubo de plástico parecido al de las salchichitas.

Composición estandar de varios tipos de miso.					
Variedad	Humedad (%)	Proteina (%)	Azucars R.(%)	Lípidos(%)	NaCl (%)
miso blanco	44	8	33	2	5
miso dulce	46	10	20	4	6
miso salado amarillo	49	11	13	5	12
miso rojo salado	50	12	14	6	13
miso de soya	47	19	2	10	10

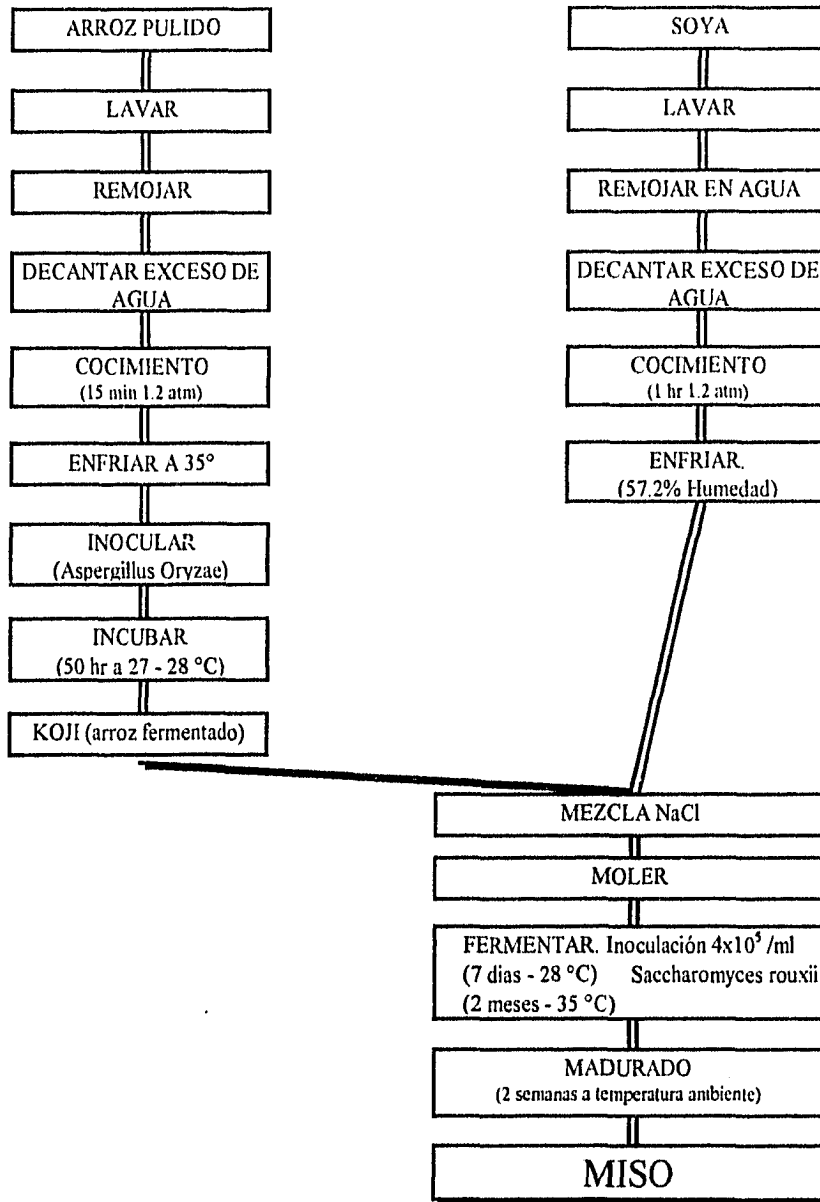


Fig. 1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA MANUFACTURA DEL MISO.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS DE ANALISIS

A.- MATERIAL.-

a) Materia Prima:

Soya: Se empleó soya comercial, mexicana, sin variedad específica, con 11 % Nitrógeno total.

Arroz: Comercial cultivada en México, sin especificación en la variedad.

Papas.

Pescado.

b) Reactivos:

Agar Sacarosa de papa (A.S.P.)

K_2CrO_4 al 2%

$AgNO_3$ 0.02N

Almidón al 2 %.

Ac. acético buffer M/10 pH = 4.5

Tolueno.

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$

$KNaC_4 \cdot H_4O_8 \cdot 4H_2O$

NaOH

$FeSO_4$

H_2SO_4

$KMnO_4$

Gelatina al 5%

Fosfato buffer (M/10, pH=5.2)

Formalina

NaCl

c) Microorganismos:

Aspergillus Oryzae: Cepa de cultivo con alta capacidad proteolítica, traída de Japón. pH y Temperatura óptima. Actividad enzimática pH=6.0 y temperatura 40° C. Medio de cultivo PSA (papa-sacarosa-agar).

Saccharomyces rouxii: Condiciones óptimas de actividad enzimática pH=6.8 y temperatura de 30° C, medio de cultivo extracto de malta a partir de trigo.

d) Equipo:

Baño maría con control de temperatura.

Balanza analítica.

Equipo de material de vidrio.

Equipo de calentamiento : mufa, mechero, autoclave.

B.- PARTE EXPERIMENTAL.-

1.- Manufactura de miso: (figura 1)

Se prepararon cuatro muestras de miso con diferentes concentraciones de sal. (Tabla 2.1).

Se utilizó 100 gramos de arroz, 100 gramos de soya sin cocer para cada una de las muestras.

Se procedió de la siguiente forma:

La soya se lavó, remojó en agua destilada por 12 horas en refrigerador; se decantó el exceso de agua, se cocinó a 1.2 atm. de presión y 121° C de temperatura durante 1 hora, se dejó enfriar a una temperatura ambiente y posteriormente se extendió asépticamente en cuatro cajas de madera de poca profundidad, previamente lavadas y desinfectadas, y en el fondo y parte de las paredes cubierta de papel aluminio. Igual se hizo con el arroz.

El iniciador se preparó con anterioridad esterilizando 4 cajas petri conteniendo cada una 20 gramos de arroz humedecido con 20 mililitros de agua destilada, durante

15 minutos a 1.2 atm. de presión y 121° C. A su término se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se inocularon con la cepa pura de Aspergillus Oryzae incubándose durante 3 días.

Transcurrido este tiempo el arroz se cubrió de una capa verde amarillenta de mohos; listo para su utilización. El contenido de esta caja fue revuelto con el arroz cocinado incubándose durante 50 horas a 28° C.

Koji . Preparado el koji se vertió en las cajas que contenían la soya cocinada y se mezcló con la sal cada una de ellas. Se molió, se inoculó con Saccharomyces rouxii. Se mezcló muy bien, se cubrió con plástico limpio ligándolo al recipiente. La fermentación se realizó naturalmente, tiempo durante el cual se observó cuidadosamente su consistencia, aroma, sabor. Se maduró a temperatura ambiente durante dos semanas, tiempo en el cual hubo desarrollo del color.

De cada una de estas muestras se analizó el contenido salino; y el porciento de azúcares reductores y nitrógeno amínico para observar la actividad enzimática de amilasa y proteasa.

Muestra Núm.	% NaCl	gr. de Koji	gr. de NaCl	gr. de soya cocida
1	6.6	135	20.0	200
2	8.14	135	30.0	200
3	10.5	135	40.0	200
4	12.76	135	50.0	200

Tabla 2.1 Muestra de miso a diferentes concentraciones de sal.

De estas 4 muestras se eligió la muestra Num. 3 (10.5 % NaCl) para la preparación de la sopa de miso, por ser la que se conservó en mejor estado de consistencia, olor, sabor, color, no hubo desarrollo de otros microorganismos contaminantes. A esta concentración de sal en el estudio hecho en el extracto de miso (líquido de enzima) se obtuvieron los mejores resultados de la actividad enzimática.

2.- Manufactura de la sopa de miso.

Se prepararon dos muestras de sopa de miso utilizando la muestra de miso No. 3 (10.5 % NaCl) una con vegetales y otra con pescado. (figuras 8 y 9)

C.- ANALISIS QUIMICOS:

De cada una de las muestras de miso se preparó un extracto de miso o líquido de enzima, como se delinea en la figura 2.

Se analizó lo siguiente:

1. Determinación de sal por el método de Mohr. (fig 3).
2. Actividad enzimática de amilasa por medio la determinación de azúcares reductores por el método de Bertrand.
3. Actividad enzimática de proteasa analizando nitrógeno amínico por Sorensen.

1.- DETERMINACION DE SAL POR MEDIO DEL METODO DE MOHR.

Fundamento:

El ión de cloruro en disolución se determina por precipitación en nitrato de plata de una disolución debilmente acidificada con ácido nítrico.

En una solución neutra o en una solución poco alcalina, el cromato de potasio indica el punto final del nitrato de plata en la titulación del cloro.

El cloruro de plata es precipitado cuantitativamente antes de que el cromato de plata (rojo) es formado.

REACTIVOS:

AgNO₃ 0.02 N

K₂CrO₄ al 2%

KCl 0.02 N

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 2 gr. de miso (muestra) dentro de un crisol de porcelana; enseguida se calcina en la mufla a 550° C, en un tiempo aproximado de 1 hora. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente.

Al cabo de esto se disuelve en agua, aforando a 100 ml.; después se toma una alícuota de 5 ml y se adiciona 1 ml de K₂CrO₄ al 2 % como indicador.

Cálculo:

$$\% \text{ NaCl} = A \times 0.00117 \times F \times \frac{100}{5} \times \frac{100}{2}$$

A = ml de AgNO₃ 0.02 N (titulación)

F = normalidad de AgNO₃.

0.00117 = Factor de corrección del Cloruro de Sodio.

El KCl se purifica mediante recristalización utilizándose para preparar la de KCl a 0.02 N que se usará para valorar la solución de AgNO_3 0.02 N

2.- ANALISIS ACTIVIDAD ENZIMATICA DE AMILASA.

FUNDAMENTO:

En este método se preparó una mezcla de almidón al 2%, ácido acético buffer M/10 pH=4.5, agua destilada, tolueno, líquido de enzima (fig. 4). El almidón es utilizado como una fuente de polisacáridos donde van a ser desdoblados por el extracto de líquido de enzima; el almidón actuó como sustrato de enzima α -amilasa donde va a fragmentar la molécula de monosacáridos, una vez que se preparó la mezcla se procedió a la titulación de azúcares reductores por el método de Bertrand; (fig. 5) donde el sulfato cúprico pentahidratado es reducido por la maltosa; con separación de óxido cuproso. Manteniendo determinadas condiciones de ensayo de las soluciones y a la duración de la ebullición la cantidad de óxido cuproso formando esta en determinada relación con la cantidad de almidón empleado. El óxido cuproso por sí solo en este sistema no se disuelve en agua es por eso que se utiliza tartrato sódico potásico; el óxido cuproso es filtrado, y a este filtrado se le añadió solución de sulfato férrico y ácido sulfúrico; donde se transformó en sulfato cúprico y sulfato ferroso. Esta disolución se valoró con permanganato de potasio.

REACTIVOS:

Solución de almidón al 2%

Solución buffer ácido acético M/10 pH=4.5

Agua destilada

Tolueno

Líquido de enzima.

PROCEDIMIENTO

En una matraz Erlenmeyer (125 ml) se preparó una mezcla añadiéndole 25 ml de almidón al 2%, 10 ml de solución buffer de ácido acético M/10 pH=4.5, 10 ml de agua destilada, 0.5 ml de tolueno y 1 ml de líquido de enzima.

De cada muestra de miso se prepararon 3 muestras y se pusieron a calentar a baño maría, a la temperatura de 50° C, se prepararon otras 3 muestras y se pusieron a calentar a baño maría a una temperatura de 60° C y otras 3 a una temperatura de 75° C, de la cual se obtiene la máxima actividad enzimática.

Se preparó una muestra como blanco, sólo sin líquido de enzima y se puso también a baño maría; durante 30 minutos, de cada una de las muestras se tomó una alícuota de 10 ml y se analizó por el método de Bertrand. Se procedió a hacer lo mismo con la muestra blanca, a la hora se sacó el otro matraz, y se tomó una alícuota de 10 ml, de la mezcla y se tituló por el método de Bertrand. Después de 2 horas se sacó el último matraz, se tomó una alícuota, y se analizaron azúcares reductores por el método de Bertrand.

METODO DE BERTRAND. (Azúcares reductores) Fig 5.

En este método se preparó una muestra blanca para cálculo; que se hizo poniendo el líquido de enzima, tratándose en autoclave en un tiempo de 10 minutos inactivando la enzima.

REACTIVOS.

1) Sulfato cúprico pentahidratado

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99.5%) 40 gr aforar a 1 lt de agua destilada

2) Sal de Rochelle (99.9%)

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 gr. aforar a 1 lt de agua

NaOH (97.34%) 150 gr.

3) Sulfato férrico.

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (100%) 50 gr aforar a 1 lt de agua.

H_2SO_4 200 gr.

d) Permanganato de potasio.

KMnO_4 5 Gr aforar a 1 lt de agua.

PROCEDIMIENTO:

A la alícuota de 10 ml de la muestra del líquido de enzima se le adicionó en primer término 20 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y posteriormente 20 ml de sal de Rochelle, la mezcla se calentó a ebullición por 3 minutos, enfriando, filtrando y desechando el filtrado.

El residuo se disolvió con 20 ml de la mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ utilizando 5 ml de cada adición, enseguida se lavó con 20 ml de agua destilada. El filtrado recoletando se valoró con KMnO_4 0.1 N. Se realizó el mismo procedimiento con el blanco.

CALCULO:

A los ml de KMnO_4 utilizados para valorar la muestra se le restan los utilizados para valorar el blanco; de ahí que la equivalencia: 1 ml de $\text{KMnO}_4 = 10$ mg Cu; se busca en la tabla de Bertrand la equivalencia a mg de maltosa = Y; se obtienen los gramos de maltosa = Y, y tomando en cuenta que para la preparación de la muestra se utilizaron 25 ml de almidón al 2%, entonces 1 ml de almidón al 2% es igual a 0.102 gr de almidón, por lo tanto en 25 ml de almidón al 2% hay 0.5 gr de almidón; y el volumen total de la muestra a titular es igual a 46.5 ml entonces en el volumen total de la muestra hay 0.0108 gr/ml de almidón y de esta mezcla se toma una alícuota de 10 ml en la cual existe 0.108 gr de almidón; En esta muestra de análisis se obtiene Z = % de maltosa.

$$Z = Y/0.108 \times 100$$

$$Y = \text{mg de maltosa.}$$

$$0.108 = \text{gr de almidón.}$$

3.- ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROTEASA.

FUNDAMENTO: Este método se basa principalmente en la determinación directa de proteínas; la proteasa como hidroliza la proteína fraccionándola en grupos peptídicos; cuando se adiciona formalina a una solución acuosa neutralizada, que contiene proteínas del grupo $-NH_2$ (amida) liberando un protón que puede titularse con NaOH, y el resultado se reporta en porcentaje de nitrógeno amínico.

REACTIVOS:

- Gelatina al 5%

(5 gr de gelatina se disuelven en 100 ml de agua destilada caliente)

- Solución Buffer de fosfato M/10 pH = 5.2

(3.58 gr de Na_2HPO_4 se aforan a 250 ml; 13.63 gr de KH_2PO_4 se aforan a 1 lt y ambos se mezclan).

- Formalina neutra con NaOH 0.1N

- Hidróxido de sodio N/10.

(4.0 gr de NaOH se afora a 1 lt)

- Fenoltaleína.

- Líquido de enzima.

(25 gr de miso se disuelven en 25 ml de agua destilada y se filtra)

PROCEDIMIENTO: (Figura 6)

Se prepara una mezcla: En un matraz Erlenmeyer (125 ml) se adicionaron 25 ml de gelatina al 5% como fuente de proteína y 10 ml de solución buffer de fosfato M/10

pH = 5.2, 0.5 ml de tolueno (como conservador de la enzima) añadiéndole 15 ml de líquido de enzima.

Se tomaron una alícuota de 10 ml de la mezcla y se neutralizó con NaOH N/10; y se adiciona 10 ml de formalina neutra y se titula con NaOH 0.1 N; ml de NaOH = A para cálculos.

Para B la mezcla se puso en baño maría por 3 horas a T de 40° C; después de esto se tomaron una muestra de 10 ml, se neutralizó con NaOH; y se le adicionó 10 ml de formalina neutra; y fenolftaleína y se titula con NaOH N/10 = B.

Cálculos:
$$\% \text{ A.N.} = (B-A) \times 0.0014 \times F \times \frac{100}{5} \times \frac{100}{2}$$

A:N = Amino-nitrógeno.

A = ml de NaOH 0.1 N (1^{ra} titulación)

B = ml de NaOH 0.1 N (2^{da} valoración)

F = Normalidad de NaOH

PROCEDIMIENTO ANALITICO DE NITROGENO AMINICO DE SORENSEN:

Se tomaron 25 ml de extracto de miso o líquido de enzima se le adicionó unas gotas de fenolftaleína y se valoró con NaOH 0.1N, posteriormente se le vertieron 20 ml de formalina neutra y de nuevo se valora con NaOH 0.1N. El objetivo de realizar dos valoraciones es obtener la suma del contenido de aminoácidos con dos carboxilos en la primera y con un carboxilo en la segunda.

Cálculos:
$$\% \text{ N.A.} = A \times F \times 0.0014 \times 100$$

A = ml de NaOH 0.1 N

F = Normalidad del NaOH

0.0014 = Factor de corrección de nitrógeno.

Por los resultados que se obtuvieron al analizar las dos enzimas en el miso; se procedió a ver el cambio de las enzimas en el miso al ser usado como alimento, en este caso la sopa de miso que se preparó con papa; sopa de miso con pescado para ver la actividad de proteasa. Este procedimiento se delinea en las figuras 8 y 9.

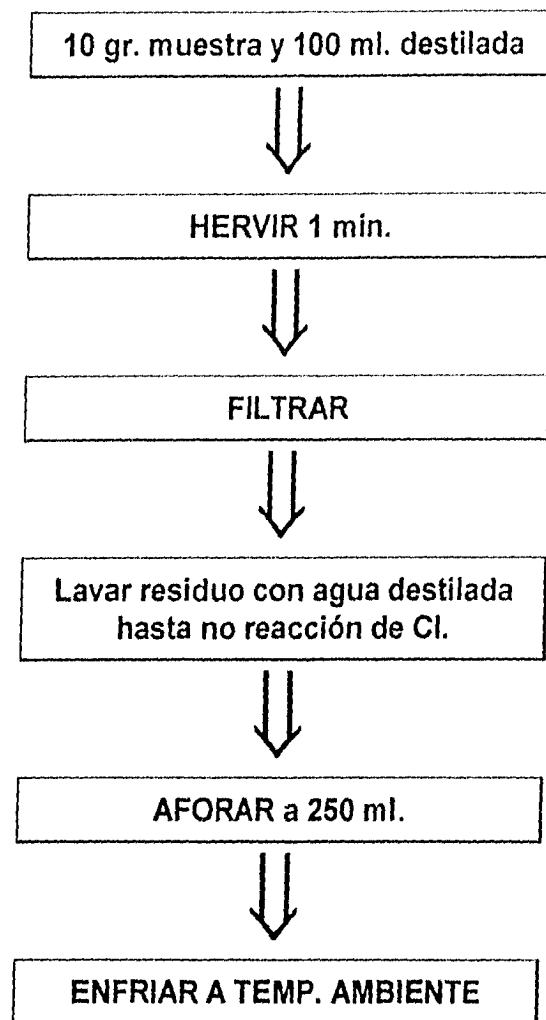
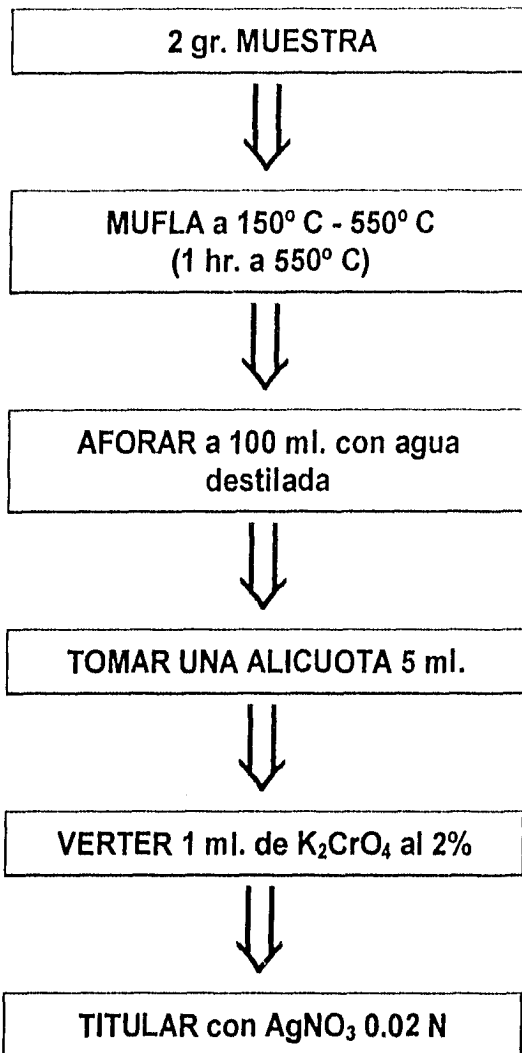


Fig. 2 PREPARACION DE EXTRACTO DE MISO



$$\% \text{ NaCl} = A \times 0.00117 \times F \times \frac{100}{5} \times \frac{100}{2}$$

A = ml. de AgNO₃ 0.02 N

F = Normalidad de AgNO₃

0.00117 = Factor de corrección del NaCl

Fig. 3 ANALISIS DE NaCl. METODO DE MOHR.

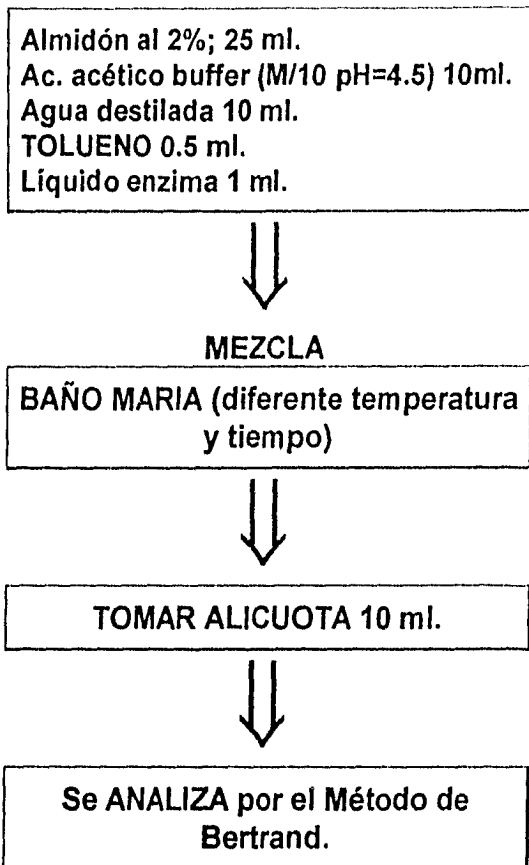


Fig. 4 ANALISIS DE ACTIVIDAD DE AMILASA

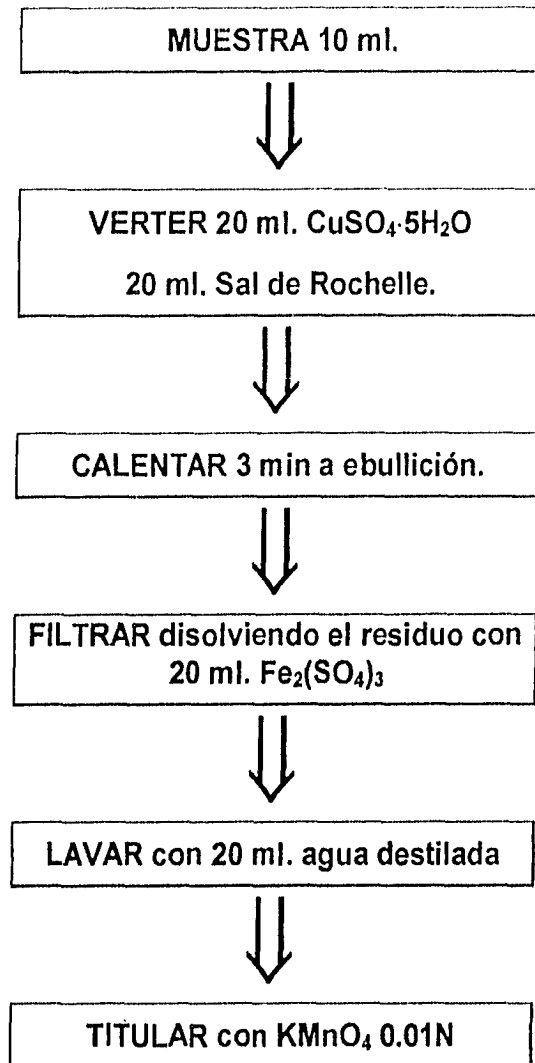
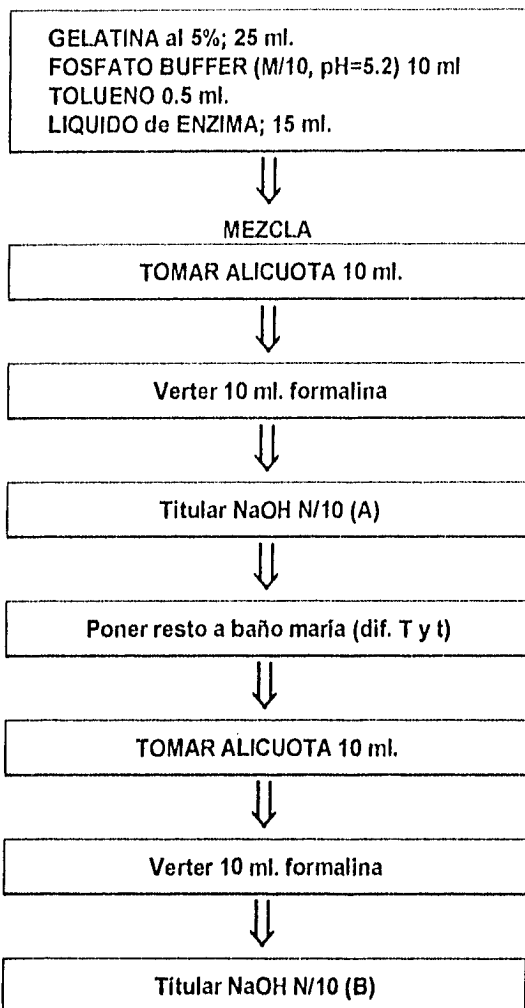


Fig. 5 ANALISIS DE AZUCARES REDUCTORES DE BERTRAND



$$\% \text{ A.N.} = (B-A) \times 0.0014 \times F \times 100$$

A.N. = Amino de Nitrógeno

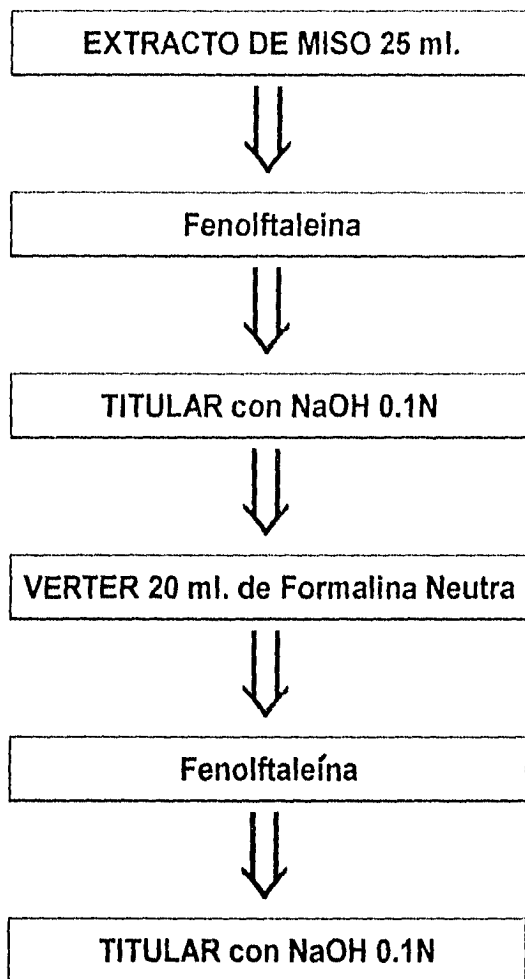
(A) ml de NaOH N/10 1ª Titulación

(B) ml de NaOH N/10 2ª Valoración

F = Normalidad de NaOH

1.4 = Factor de corrección de nitrógeno

Fig. 6 ANALISIS ACTIVIDAD DE PROTEASA



% Nitrógeno Amínico = $A \times F \times 0.0014 \times 100$
A = ml. de NaOH 0.1N
F = Normalidad de NaOH
0.0014 = Factor de corrección de Nitrógeno

Fig. 7 PROCEDIMIENTO ANALITICO DE N.A. DE SORENSEN

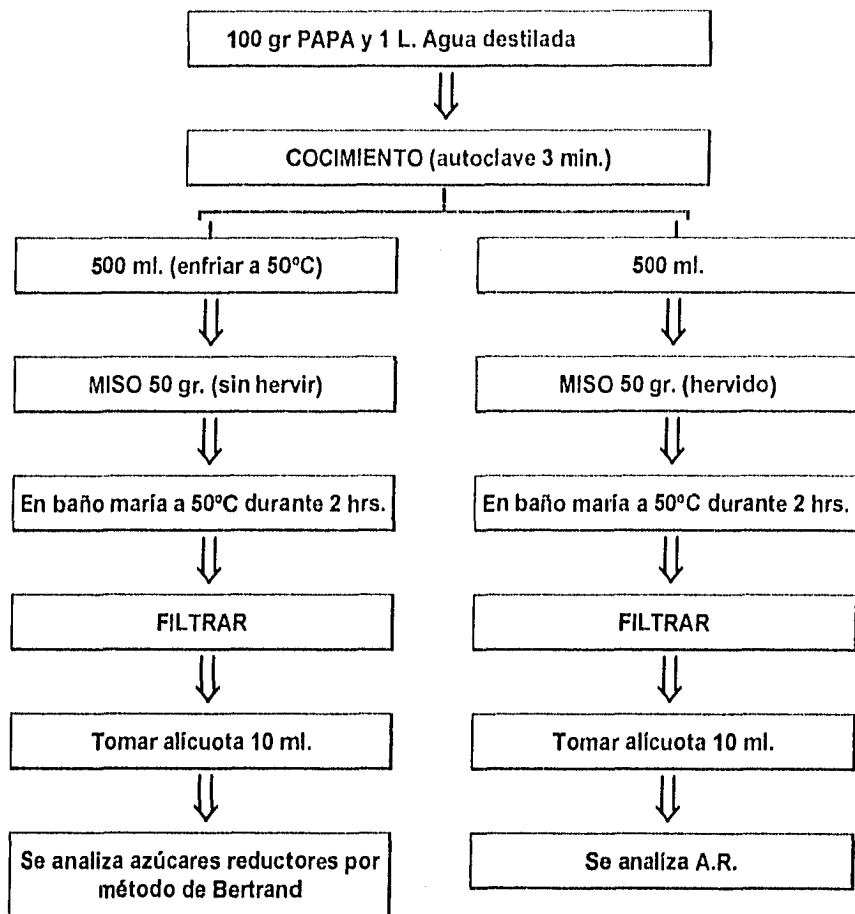


Fig. 8 PREPARACION DE SOPA DE MISO PARA ANALISIS DE ACTIVIDAD DE AMILASA

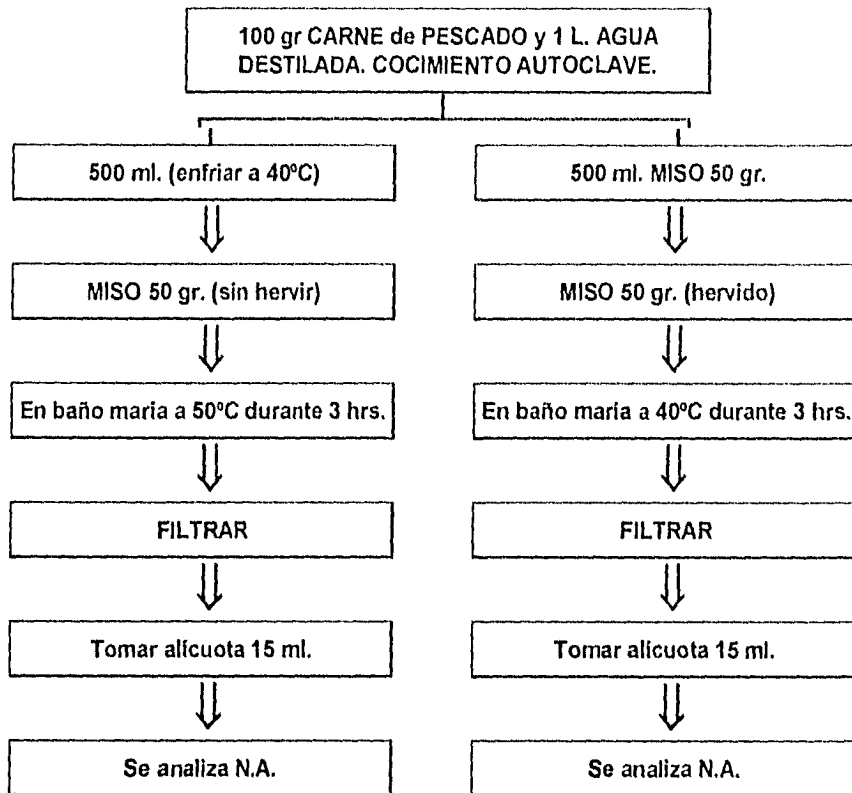


Fig. 9 PREPARACION DE SOPA DE MISO CON PESCADO PARA ANALISIS DE ACTIVIDAD DE PROTEASA

CAPITULO 3

PRESENTACION DE RESULTADOS

Muestra Miso	5NaCl	T°C	t	ml. KMnO ₄	% A.R. (maltosa)
1	6.6	50	30'	7.9	13.5
		50	60'	9.2	18.3
		50	120'	11.3	31.0
2	8.14	50	30'	9.8	19.7
		50	60'	10.8	23.5
		50	120'	12.7	34.7
3	10.5	50	30'	8.7	17.5
		50	60'	9.2	18.3
		50	120'	12.0	34.0
4	12.76	50	30'	6.8	9.5
		50	60'	9.2	18.3
		50	120'	10.9	27.5

Tabla 3.1 Valores obtenidos en el análisis de la actividad enzimática de amilasa a 50°C.

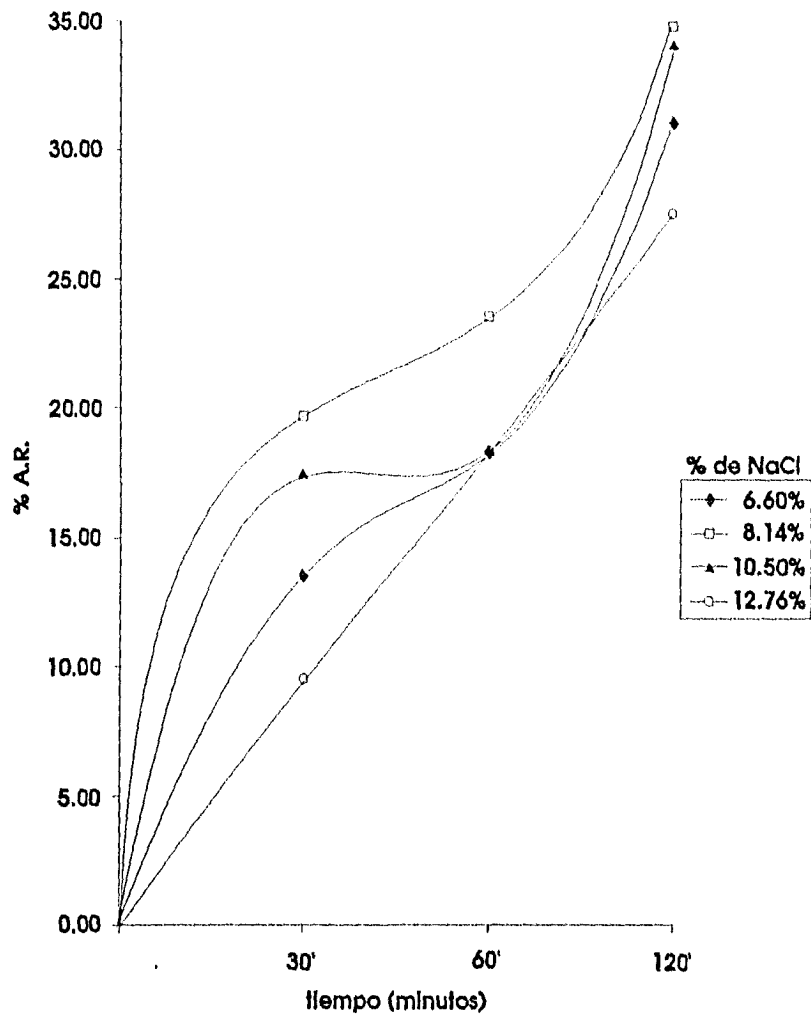
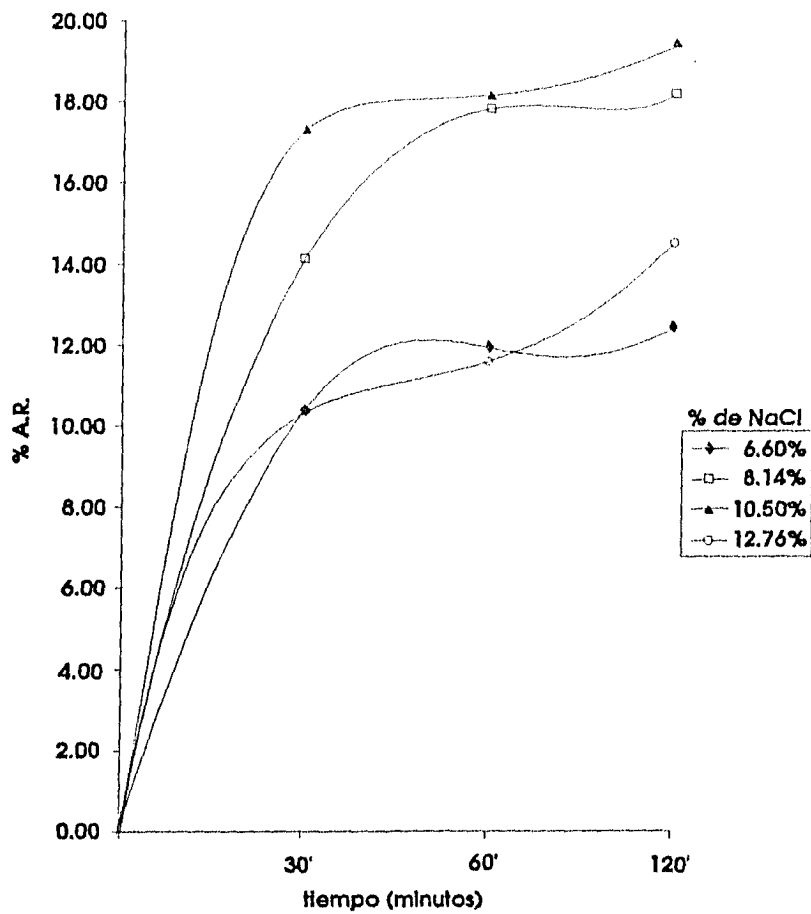


Fig. 10 ACTIVIDAD DE LA AMILASA EN EXTRACTO DE MISO A 50° C

Muestra Miso	5NaCl	T°C	t	ml. KMnO ₄	% A.R. (maltosa)
1	6.6	60	30'	7.3	10.37
		60	60'	7.7	11.94
		60	120'	7.8	12.40
2	8.14	60	30'	8.0	14.10
		60	60'	8.8	17.80
		60	120'	8.9	18.14
3	10.5	60	30'	8.7	17.30
		60	60'	8.9	18.15
		60	120'	9.2	19.40
4	12.76	60	30'	7.2	10.37
		60	60'	7.5	11.57
		60	120'	8.1	14.44

Tabla 3.2 Valores obtenidos en el análisis de la actividad enzimática de amilasa a 60°C.



**Fig. 11 ACTIVIDAD DE LA AMILASA EN EXTRACTO DE MISO
A 60° C**

**VALORES OBTENIDOS EN EL
ANÁLISIS DE PROTEASA EN EXTRACTO DE MISO.**

Muestra	% NaCl	T° C	% N.A.
1	6.6	40° C	2.1
2	8.14	40° C	1.85
3	10.5	40° C	1.72
4	12.76	40° C	1.48

Tabla 3.3 Valores obtenidos en el análisis de proteasa en extracto de Miso, a T=40° C.

Muestra	% NaCl	T° C	% N.A.
1	6.6	60° C	0.74
2	8.14	60° C	0.49
3	10.5	60° C	0.25
4	12.76	60° C	0.18

Tabla 3.4 Valores obtenidos en el análisis de proteasa en extracto de Miso, a T=60° C.

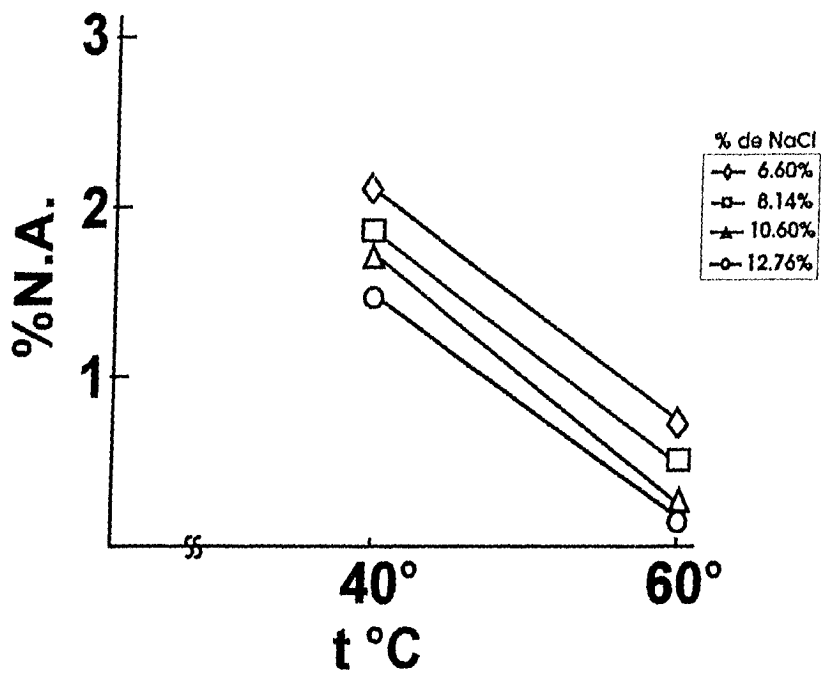


Fig. 12 ACTIVIDAD DE LA PROTEASA EN EXTRACTO DE MISO A 40 °C y 60 °C

VALORES OBTENIDOS DE LA ACTIVIDAD DE AMILASA
EN LA SOPA DE MISO CON PAPA.

T° C	t	ml KMnO ₄	% Maltosa
50° C	0'	4.1	0.41
50° C	30'	5.7	0.57
50° C	1 hr.	6.4	0.64
50° C	2 hr.	7.6	0.76

Tabla 3.5 Sopa de Miso sin hervir.

T° C	t	ml KMnO ₄	% Maltosa
50° C	0'	2.8	0.25
50° C	30'	2.8	0.28
50° C	1 hr.	3.0	0.30
50° C	2 hr.	3.8	0.30

Tabla 3.6 Sopa de Miso hervida.

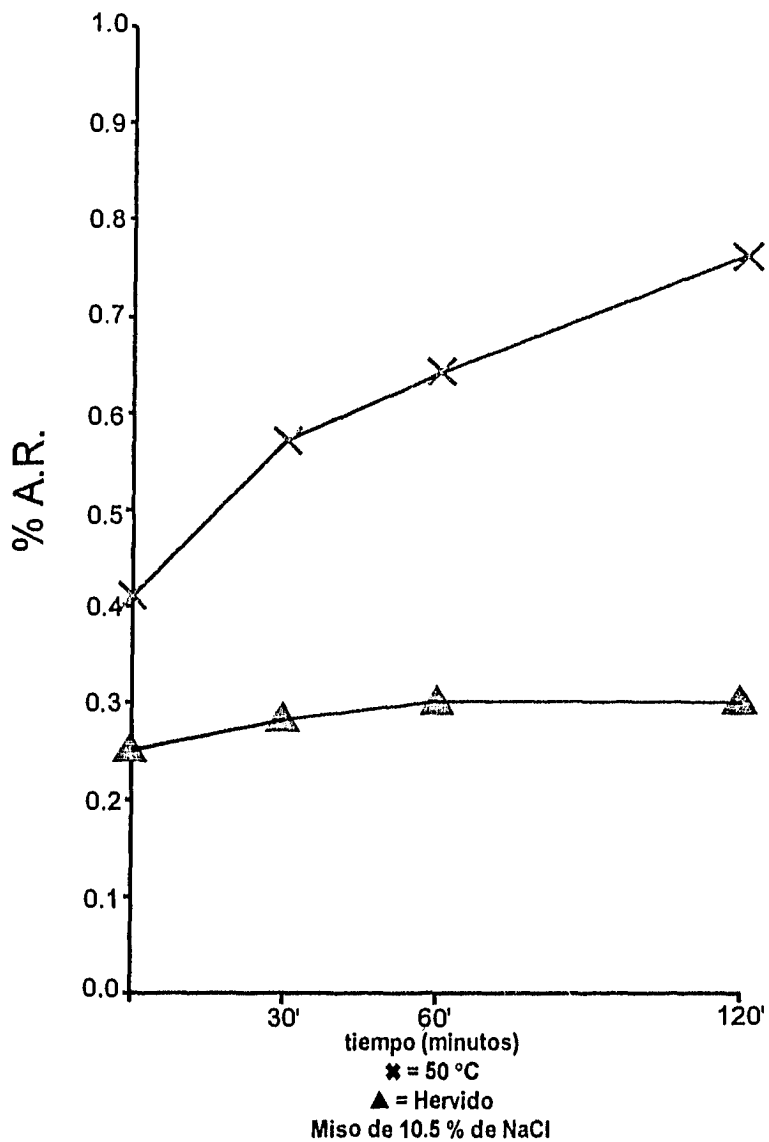


Fig. 13 ACTIVIDAD DE AMILASA EN SOPA DE MISO CON PAPA.

VALORES OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE PROTEASA
EN SOPA DE MISO CON PESCADO. POR EL METODO DE SORENSEN.

T° C	t	A = ml NaOH	% N.A.
40° C	0'	4.3	0.43
40° C	30'	6.8	0.69
40° C	1 hr.	7.2	0.72
40° C	2 hr.	7.6	0.76
40° C	3 hr.	8.0	0.81

Tabla 3.7

T° C	t	A = ml NaOH	% N.A.
120° C	0'	6.0	0.60
120° C	30'	6.0	0.60
120° C	1 hr.	6.1	0.61
120° C	2 hr.	6.1	0.61
120° C	3 hr.	6.1	0.61

Tabla 3.8

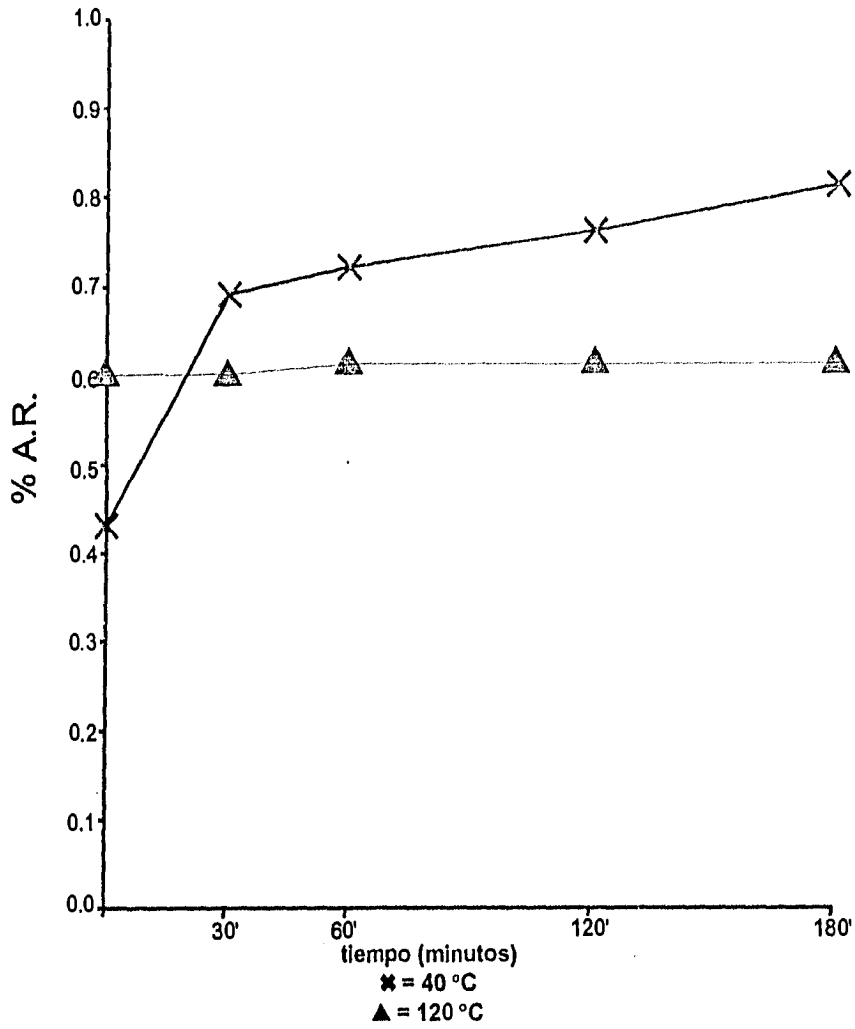


Fig. 14 ACTIVIDAD DE PROTEASA EN SOPA DE MISO CON PESCADO A T = 40 °C y T = 120 °C (1.2 atm.)

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos la actividad de la amilasa es mayor en las muestras que contienen de 8.14 a 10.5 % de NaCl, siendo la de 8.14 la que presenta el mayor porcentaje de azúcares reductores (34.7 %). Con respecto al tiempo de calentamiento a 50° C podemos observar que los porcentajes antes mencionados de cloruro de sodio se obtienen después de 120 minutos de calentamiento y que la muestra con 8.14 % de cloruro de sodio registró los más altos porcentajes de azúcares reductores a 30 y 60 minutos en comparación con el resto de muestras. (Tabla 3.1, figura 10).

En la figura 10 se observa una disminución en el porcentaje de azúcares reductores a 30 y 60 minutos, esto es debido a la influencia que presenta la sal sobre la actividad enzimática.

En una muestra de miso a concentraciones menores a 8.14 % de cloruro de sodio se observó contaminación de microorganismos indeseables.

En el miso la sal actúa como un inhibidor del crecimiento y desarrollo de dichos microorganismos que pueden producir toxinas.

Sin sal o bajas concentraciones de ella se crea un medio adecuado donde la fermentación no tiene control y se contamina fácilmente con hongos y levaduras que descomponen el alimento.

En la tabla 3.2 y figura 11 el porcentaje de azúcares reductores producidos por el Aspergillus Oryzae, en la muestra de 10.5 % de concentración de sal, es mayor a un tiempo de calentamiento a 60° C y 120 minutos. (19.40 % A.R.) Se observa que a concentraciones mayores de sal (10.5 NaCl) existe una disminución en el contenido del porcentaje de azúcares reductores, a estas concentraciones (12.76 % NaCl) el desarrollo de la levadura Saccharomyces rouxii disminuye, pero el resultado es mejor a una temperatura de 50° C.

El análisis hecho de azúcares reductores a un tiempo de calentamiento de 75° C el resultado fue de cero, a esa temperatura la enzima se inactivó por ser termolábil.

En el análisis de la actividad de proteasa en el extracto de miso por la determinación de nitrógeno amínico (tabla 3.3 y figura 14). Se observó que a una temperatura de 40° C. con una muestra de un contenido salino de 10.5 % el porcentaje de nitrógeno amínico fue bueno, con respecto a la muestra de concentración de sal de 6.6 % se observa que el contenido de nitrógeno amínico es el más alto, este valor no se tomó en consideración porque se desarrollaron otros microorganismos que aceleran la fermentación.

En lo que corresponde a la temperatura de 60° C. (tabla 3.4 y figura 14), existe una disminución considerable en el contenido de nitrógeno amínico en las muestra con un porcentaje de sal de 8.14 a 10.5. También se observa que el porcentaje de nitrógeno amínico disminuyó en la muestra de contenido salino de 12.76 donde casi se inactivó la enzima.

En las preparaciones de sopa de miso con papas y carne de pescado para uso doméstico se corroboró la relación que guarda con el estudio de la actividad de amilasa y proteasa en el extracto de miso (líquido de enzima) y el análisis hecho de azúcares reductores y nitrógeno amínico.

El alimento preparado con miso sin hervir (tabla 3.5 y figura 15) se observó que a un tiempo de calentamiento de dos horas a 50° C el porcentaje de azúcares reductores aumentó, por lo que se vio que la actividad de la amilasa fue buena.

Con respecto a la sopa con miso hervido (Tabla 3.6 y figura 15) la temperatura de ebullición (95° C.) inactivó la enzima dando un porcentaje menor de azúcares reductores y manteniéndose constante en un tiempo de calentamiento de dos horas a 50° C.

En la preparación de sopa de miso con pescado para análisis de actividad de proteasa (Tabla 3.7 y figura 17) a un tiempo de calentamiento de 3 horas a 40° C y un contenido salino de 10.5 % presenta su mejor actividad dando porcentaje alto de nitrógeno amínico, a las temperaturas mayores de 60° C la enzima es inactivada (Tabla 3.8 y figura 17).

Se concluye que en estudio de los cambios en la composición de la sopa de miso con relación a la actividad enzimática de la amilasa y proteasa la temperatura a la

cual las enzimas presentan su mejor actividad es de 40° C a 60° C. Esto indica que es mejor cocer todos los vegetales y/o carne y enfriarlos a una temperatura de 50° C a 60° C y se pone la pasta de miso agitando un poco, esta manera de preparación es nutricional, porque las enzimas son más activas.

LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
SAN DIEGO

CAPITULO 5

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Smith A.K; C Circle S.J. Soybeans Chemistry and Technology. 2nd Edition, Volume. -1 - Proteins revised. United States of America; Avi. Publishing Company. Inc. 1978. 389.
- 2.- Beuchat. L.R. Food and Beverage Mycology. 2nd Edition. United States of America; Avi. Publishing Company. INC, 1978. 224.
- 3.- Wtaker J.R. Principles of Enzimology for food sciences. Marcel Dekker Volume -2-United States of America. 1972, 442,443,537.
- 4.- Commission on Biochemical Nomenclature: Enzyme Nomenclature. Recomendations. (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry. Elsevier Scientific. Publishing Company. Amsterdam. 1973.
- 5.- Colowick S.P. and Kaplan N.O. Methods in enzimology. Vol.1. United States of America. Academic Press. 1975.
- 6.- Badui.D.S. Química de los Alimentos. 2^a Edición. México. Ed. Alambra Mexicana Universidad 1990.
- 7.- Dr. Hathn H. Bioquímica de las fermentaciones. Madrid, Ed El Aguilar. 1956.
- 8.- Egan H, Kirk.R.S., Sawyer R. Análisis Químico de Alimentos. Pearson. Edición.No.5. C.E.C.S.A. México. 1993.
- 9.- Chemical Abstracts. Enzymes. Biochemistry Sections. Volume - 103 - Number - 1- Julio -8-1985. 2506.
- 10.- Ayres.G.H. Análisis Químico Cuantitativo. 2^a Edición. México. Ed. Harla. 1970. 229,609.
- 11.- Greenberg. A. E, Clesceri. L. S, Eaton A. D. Standard Methods; for examination of water and wastewater. 18^a Edition, United States of America. 1992.
- 12.- OKuda, T. Moriyama V. Ciencia y Tecnología del Miso. Japón. Tokio Fuji. Publishing, Co. 1977. 278.
- 13.- Mochizaki. T. Ciencia y Tecnología del Miso, Japón. Tokio Fuji Publishing Co. 1976, 269.
- 14.- Boyer. P. D, Lardy H. Mybäck K; The enzymes. United States of America, Avi. Publishing Vol. 4. Company INC. 1960. Cap. 19 y 20.
- 15.- Devel H.J. Nutritional Value of Soybeans and Soybean product. Ed. K: S. Markley, United States of America , 1956. 786.
- 16.- Wiseman; Ph.D. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. United States of America. Ellis Horwood Limited Publishers Chichester 1979. Cap. 3.