

**PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *Rhizopus oligosporus* PARA
LA DETOXIFICACIÓN DE SEMILLAS DE LUPINO (*Lupinus mutabilis*)**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN
INGENIERÍA
ÉNFASIS EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**Presentado por:
Ing. EDUAR HUMBERTO ORTEGA DAVID
Estudiante Programa de Doctorado en Ingeniería Énfasis Alimentos**

**Dirigido por:
Ing. AÍDA RODRÍGUEZ DE STOUVENEL Ph.D.
Escuela de Ingeniería de Alimentos**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
Santiago de Cali
Octubre de 2012**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma Asesor

Firma Jurado 1

Firma Jurado 2

Firma Jurado 3

Santiago de Cali, 29 de Octubre del 2012

AGRADECIMIENTOS

El Autor expresa su agradecimiento a quienes dieron su apoyo en la realización del presente trabajo:

Doctor Ernesto Favela Torres, Investigador de la Universidad Autónoma Metropolitana sede Iztapalapa, México.

Personal de apoyo de la Planta Piloto de Fermentaciones Sólidas No. 4, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa México.

Doctora Helena Villacrez, Investigadora del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Estación Santa Catalina INIAP, Ecuador.

Doctor Ángel Zamora Burbano director del Grupo ASINDETEC, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Químico David Eduardo Perdomo, Cromatografista de los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Doctora Martha Isabel Páez, Laboratorios Análisis Instrumental Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Doctor Alejandro Fernández Quintero, Docente Programa de Ingeniería en Alimentos Universidad del Valle, Cali Colombia.

A mis Jurados, por sus valiosos comentarios y sugerencias sobre mi tesis.

A todos aquellos Investigadores y amigos en diferentes lugares del mundo, quienes con un artículo, comentario o sugerencia, colocaron su grano de arena en el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos especiales:

A mi tutora, Doctora Aida Rodríguez, Docente Programa Ingeniería en Alimentos Universidad del Valle por su apoyo, guía, enseñanza, sugerencias y comentarios, que ayudaron a mi formación y al desarrollo de mi doctorado y mi tesis.

Al Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología COLCIENCIAS, por su aporte financiero para el desarrollo de mi Doctorado, como beneficiario del programa Doctorados Nacionales.

Al Maestro Pedro Oswaldo Granda Paz y el Doctor Javier García Álzate docentes Universidad de Nariño, Pasto, Colombia, por su confianza.

DEDICATORIA

A mis padres Carlos y Feliza, mis realizadores.

A mi esposa Carmen Alicia, fiel compañera.

A mi hijo Luis David, mi precioso motivo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	13
1.1. ABSTRACT	14
2. INTRODUCCIÓN	15
3. MARCO TEÓRICO	19
3.1. DESCRIPCIÓN DEL LUPINO	19
3.1.1. Generalidades de la especie	19
3.1.2. Composición química y física de la semilla	21
3.2. PROCESOS DE DETOXIFICACIÓN APLICADOS A LA SEMILLA DE LUPINO	24
3.3. LA FERMENTACIÓN SÓLIDA	27
3.3.1. La Fermentación sólida en el procesamiento de alimentos	27
3.3.2. Características del medio y condiciones del proceso en la fermentación sólida.	28
3.3.2.1. La humedad	29
3.3.2.2. El pH	29
3.3.2.3. El tamaño de partícula	29
3.3.2.4. La aireación	30
3.3.3. Modelamiento de los procesos de fermentación sólida	30
3.3.3.1. Cinética de crecimiento	31
3.3.3.2. Cinética de detoxificación y consumo de sustratos	31
3.4. EL HONGO <i>Rhizopus oligosporus</i> Y SU METABOLISMO	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1. MATERIAL VEGETAL, ADECUACIÓN Y ALMACENAMIENTO	34
4.2. MICROORGANISMOS E INÓCULOS	34
4.3. DETERMINACIÓN DE pH, HUMEDAD Y ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS	35
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA	36
4.4.1. Determinación de propiedades físicas	36
4.4.2. Determinación de la composición química	37
4.4.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas	37
4.4.4. Análisis estadístico	38
4.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA DETOXIFICACIÓN	38
4.5.1. Preparación del medio	38
4.5.2. Fermentación	39
4.5.3. Determinación de biomasa y materia seca	39
4.5.4. Diseño experimental y análisis estadístico	39
4.6. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN	40

	REACTOR CON AIREACIÓN ESTÁTICA	
4.6.1.	Preparación del medio	40
4.6.2.	Fermentación	41
4.6.3.	Determinaciones	41
4.6.4.	Diseño experimental y análisis estadístico	42
4.7.	INFLUENCIA DE LA HUMEDAD Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN REACTOR CON AIREACIÓN FORZADA	42
4.7.1.	Inóculo	42
4.7.2.	Preparación del medio	43
4.7.3.	Fermentación	44
4.7.4.	Determinaciones	44
4.7.5.	Diseño experimental y análisis estadístico	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA	47
5.1.1.	Propiedades física de la semilla	47
5.1.2.	Composición química de la semilla	47
5.1.2.1.	Análisis bromatológico	47
5.1.2.2.	Presencia de sustancias tóxicas	49
5.1.3.	Propiedades fisicoquímicas	50
5.1.3.1.	Hidratación	50
5.1.3.2.	Proceso de hidratación de semillas y cotiledones	51
5.1.3.3.	Relación entre hidratación y tamaño de semillas	52
5.1.3.4.	Relación entre humedad y el pH	53
5.2.	INFLUENCIA DEL pH	54
5.2.1.	Crecimiento del microorganismo	54
5.2.2.	Degradación de alcaloides	59
5.2.3.	Consumo de sólidos totales	63
5.2.4.	Cambios en el pH	63
5.2.5.	Relación entre las características del medio y la degradación de alcaloides	65
5.2.5.1.	Crecimiento y degradación	65
5.2.5.2.	Consumo de sólidos y degradación	67
5.2.5.3.	El pH y la degradación	68
5.3.	LA HUMEDAD Y EL TAMAÑO DE PARTÍCULA CON AIREACIÓN ESTÁTICA	69
5.3.1.	Descripción del medio de fermentación	69
5.3.2.	Crecimiento observado	69
5.3.3.	Variación del pH	72
5.3.4.	Cambios en el contenido de humedad-materia seca	73
5.3.5.	Cambios en el contenido de materia orgánica	75
5.3.6.	Cambios en el contenido de alcaloides	77
5.3.6.1.	Cambios por cada alcaloide	80
5.4.	LA HUMEDAD, EL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y LA AIREACIÓN FORZADA	83

5.4.1.	Caracterización de los lechos de fermentación	83
5.4.2.	Observaciones sobre el crecimiento	83
5.4.3.	Comportamiento de la humedad en el sistema	85
5.4.4.	Respiración del hongo	85
5.4.4.1.	Punto máximo de producción de CO ₂	86
5.4.4.2.	Concentración de CO ₂ en el sistema	86
5.4.4.3.	Cantidad de CO ₂ producido	87
5.4.4.4.	Oxígeno consumido	90
5.4.4.5.	Coeficiente respiratorio (CR)	91
5.4.5.	Variación en la relación humedad-materia seca	91
5.4.6.	Variación en la concentración y cantidad de alcaloides	93
5.4.6.1.	Disminución por cada alcaloide	96
5.5.	ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS: EFECTO DEL TIEMPO, TAMAÑO Y TEMPERATURA EN LA DETOXIFICACIÓN	100
5.5.1.	Respiración del hongo durante 96 h	101
5.5.2.	Variación en el pH	102
5.5.3.	Variación en la detoxificación	104
5.5.4.	Relación entre producción de CO ₂ , alcaloides consumidos y detoxificación	106
5.5.5.	Efecto de un menor tamaño de partícula en la detoxificación	108
5.5.6.	Efecto de una mayor temperatura en la detoxificación	109
6.	CONCLUSIONES	110
7.	BIBLIOGRAFÍA	112
8.	ANEXOS	122

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1	Análisis proximal expresado en porcentaje de diferentes especies de lupinos en semilla entera y grano sin tegumento 21
Tabla 2	Contenido de ácidos grasos del Lupino 22
Tabla 3	Contenido de alcaloides presentes en la semilla de Lupino (<i>L. mutabilis</i>). 24
Tabla 4	Diseño experimental segunda fase 40
Tabla 5	Diseño experimental tercera fase 42
Tabla 6	Diseño experimental cuarta fase 46
Tabla 7	Análisis proximal de semilla, cotiledón y tegumento de Lupino (<i>L. mutabilis</i>) 48
Tabla 8	Composición de fracción fibrosa de cotiledón y tegumento de Lupino (<i>L. mutabilis</i>). 49
Tabla 9	Composición mineral de cotiledón y tegumento de Lupino (<i>L. mutabilis</i>). 49
Tabla 10	Contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) del Lupino (<i>L. mutabilis</i>) 50
Tabla 11	Incremento en el diámetro y el volumen de la semilla de Lupino (<i>L. mutabilis</i>) 53
Tabla 12	Cantidad de materia seca consumida y de biomasa seca por unidad de área 56
Tabla 13	Contenido de alcaloides totales en agar lupino en pH 3.5 y 5.5 durante las 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i> 60
Tabla 14	Contenido de alcaloides: lupanina, esparteína, tetrahidrorombifolina y otros minoritarios, en agar lupino en pH 3.5 y 5.5 durante 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i> 62
Tabla 15	Características iniciales del lecho de fermentación 70
Tabla 16	Variación en el pH del medio durante el proceso de fermentación 73
Tabla 17	Contenido de materia seca durante las 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i> 74
Tabla 18	Análisis proximal de cotiledones enteros y quebrantados después de 48 h de fermentación 77
Tabla 19	Cinética de variación de los alcaloides quinolizidínicos presentes en los cotiledones de Lupino fermentados con <i>R. oligosporus</i> 80
Tabla 20	Cantidad de cada alcaloide presentes en el medio de fermentación durante las 48 h 82
Tabla 21	Contenido promedio de materia seca y densidad inicial del lecho de fermentación en columnas 84
Tabla 22	Porcentaje de humedad en el medio después de 48 h de 85

	fermentación	
Tabla 23	Porcentaje de concentración de CO ₂ en su punto máximo de producción	87
Tabla 24	Cantidad de CO ₂ producido en la fermentación de cotiledones de Lupino por <i>Rhizopus oligosporus</i>	88
Tabla 25	Cantidad de oxígeno consumido y coeficiente respiratorio promedio en el proceso de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	94
Tabla 26	Contenido de humedad y reducción de materia seca de los medios, punto inicial y después de 48 h de fermentación	95
Tabla 27	Variación en la concentración y la cantidad de alcaloides después de 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	97
Tabla 28	Variación en la cantidad de cada alcaloide por unidad experimental después de 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	98
Tabla 29	Cinética de variación en la concentración y cantidad de alcaloides durante 96 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	107

Índice de Figuras

		Pág.
Fig. 1	Semilla parcialmente seca y completamente húmeda	51
Fig. 2	Cinética de absorción de agua de semillas y cotiledones de <i>L. mutabilis</i>	52
Fig. 3	Tamaño de la semilla en diferentes valores de hidratación	52
Fig. 4	extracción de la biomasa fúngica de la superficie del agar	54
Fig. 5	cantidad de biomasa por área de <i>R. oligosporus</i> en PDA y agar lupino a pH de 3.5 y 5.5	55
Fig. 6	Velocidad de crecimiento del <i>R. oligosporus</i> en PDA y agar lupino a pH de 3.5 y 5.5	57
Fig. 7	Cinética de variación de pH en 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	64
Fig. 8	Relación entre cantidad de biomasa de hongo y alcaloides consumidos en agar lupino 3.5 y 5.5.	65
Fig. 9	Relación entre cantidad de materia seca y alcaloides consumidos en agar lupino 3.5 y 5.5.	67
Fig. 10	Crecimiento del <i>R. oligosporus</i> en cotiledones enteros con 40 % de humedad en 0, 24 y 48 h de fermentación	70
Fig. 11	Crecimiento del <i>R. oligosporus</i> en cotiledones enteros y quebrantados 50 y 60 % de humedad en 48 h de fermentación	71
Fig. 12	crecimiento del <i>R. oligosporus</i> en el lecho interno de cotiledones enteros y quebrantados con 60 % de humedad en 48 h de fermentación	71
Fig. 13	Variación del pH durante 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	72
Fig. 14	Porcentaje de reducción en el contenido de materia seca en 48 h de fermentación	74
Fig. 15	Variación de la humedad en la fermentación con <i>R. oligosporus</i>	75
Fig. 16	Contenido porcentual de materia orgánica en cotiledones enteros y quebrantados en tres niveles de humedad después de 48 h de fermentación	76
Fig. 17	Porcentaje de reducción en la cantidad de alcaloides totales en cotiledones de Lupino durante 0, 24 y 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i>	81
Fig. 18	Columnas rellenas con material en partículas quebrantadas y enteras, en tiempo inicial de fermentación	83
Fig. 19	Crecimiento en las 24 y 48 h de fermentación	84
Fig. 20	Observación microscópica de la esporulación durante el proceso de fermentación	84
Fig. 21	Concentración de CO ₂ , producción total de CO ₂ y coeficiente respiratorio en 48 h de fermentación con <i>R. oligosporus</i> para los	92

	medios de cotiledones enteros, Tyler No. 4 y No. 6.	
Fig. 22	Cantidad de dióxido de carbono producido durante 96 h de fermentación	101
Fig. 23	Cantidad de oxígeno consumido durante 96 h de fermentación	102
Fig. 24	Evolución del coeficiente respiratorio durante 96 h de fermentación	103
Fig. 25	Variación del pH en el tiempo durante 96 h de fermentación	104
Fig. 26	Relación entre producción de CO ₂ , alcaloides consumidos y detoxificación	108

Índice de Ecuaciones

	Pag.
Ec. 1 Ecuación logística diferencial	31
Ec. 2 Ecuación logística integrada	31
Ec. 3 Ecuación exponencial	31
Ec. 4 Ecuación de Pirt para el consumo de sustratos	32
Ec. 5 Ecuación de Luedeking y Piret para la formación de producto	32
Ec. 6 Porcentaje de degradación de alcaloides	36
Ec. 7 Diámetro ortogonal de la semilla	36
Ec. 8 Volumen del casquete en función del radio y la altura	37
Ec. 9 Ecuación de cálculo del volumen de la suspensión de esporas	43
Ec. 10 Ecuación diferencial de la cantidad de CO_2 y O_2 producido o consumido respectivamente	45
Ec. 11 Ecuación integral de la cantidad de CO_2 y O_2 producido o consumido respectivamente	45
Ec. 12 Ecuación para el cálculo del coeficiente respiratorio	46
Ec. 13 Ecuación de detoxificación en función del rendimiento de biomasa	66
Ec. 14 Ecuación de detoxificación en función del consumo de materia seca	68

1. RESUMEN

La utilización de las semillas de Lupino andino (*L. mutabilis* var. Andino 450) se ha limitado por la presencia de alcaloides quinolizidínicos de difícil eliminación. Como opción de detoxificación, se ha determinado que la fermentación sólida ocurrida en el tempeh puede eliminar hasta el 90 %. La fermentación está influenciada por el pH, la humedad, el tamaño de partícula y la aireación. Estos aspectos fueron estudiados en el proceso de detoxificación del lupino con *Rhizopus oligosporus* (ATCC 22959 ®). Se sembró en agares lupino para estudiar el pH (AL 3.5 y AL 5.5) y se fermentó en cotiledones con y sin aireación forzada en tres humedades (H-40, H-50 y H-60 %) y tres tamaños de partícula (entero, Tyler No 4 y No 6).

La detoxificación fue influenciada por el pH, la humedad y el tamaño de partícula. Se logró el 63 % de eliminación en AL 5.5 y en AL 3.5 solamente el 16 %. En H-60 y partículas No. 4 sin aireación, se degradó el 70 % en 48 h. La detoxificación fue afectada cuando la humedad está por debajo del 50 %. La reducción de tamaño incidió más que la humedad en la degradación. La aireación forzada tuvo poco efecto mostrando mejores resultados en 60 ml min⁻¹. La aireación y un menor tamaño (No. 6) mejoraron la degradación hasta el 77 %. El incremento en el tiempo de fermentación (96 h), permitió una detoxificación del 84 %. El alcaloide más degradado fue la lupanina, seguido por la THR y la esparteína lo cual varía por las condiciones de fermentación.

Se correlacionó las variables del proceso con las ecuaciones: exponencial, biomasa vs detoxificación ($Y_{(x/D)}$), detoxificación vs materia seca consumida ($Y_{(D/Ms)}$) y Luedeking-Piret (LP). La ecuación $Y_{(D/Ms)}$ presentó la mayor correlación ($R^2 = 0.94$), por tanto la detoxificación pudo predecirse con los datos de consumo de materia seca. Los valores de α y β de LP coincidieron con las observaciones experimentales, concluyendo que la detoxificación está asociada a la fase de crecimiento del hongo. La fermentación es una alternativa que puede ser complementaria para la detoxificación del lupino.

1.1. ABSTRACT

The use of the Andean lupin seeds (*L. mutabilis* var. Andino 450) is limited by the presence of quinolizidine alkaloids difficult to eliminate. As detoxification option, the studies said solid fermentation occurred in tempeh can remove up to 90%. The fermentation is influenced by pH, moisture, particle size and aeration. These were studied in the detoxification process of lupin with *Rhizopus oligosporus* (ATCC 22959 ®). Lupin agars were planted to study the pH (LA 3.5 and LA 5.5) and cotyledons were fermented with and without forced aeration in three moisture levels (H-40, H-50 and H-60%) and three particle sizes (whole, Tyler No. 4 and No. 6).

The detoxification was influenced by pH, moisture and particle size. The 63% of eliminación was achieved in LA 5.5 and LA 3.5 only 16%. In medium with H-60, size No. 4 and without aeration, 70% was degraded within 48 hours. Detoxification was affected when moisture is below 50%. The alkaloids degradation is more influenced for size reduction than moisture. Forced aeration had little effect showing better results in 60 ml min⁻¹. Aeration and less particle size (No. 6) improved the degradation to 77%. The time fermentation increase (96 hours), allowed a detoxification of 84%. The more degraded alkaloid was lupanine follow for THR and sparteine, which can change for the fermentation conditions.

The process variables were correlated with equations: exponential, biomass vs detoxification ($Y_{(X/D)}$), detoxification vs dry matter intake ($Y_{(D/MS)}$) and Luedeking-Piret (LP). The equation $Y_{(D/MS)}$ had the highest correlation ($R^2=0.94$) so, the detoxification could be predicted with values of dry matter intake. The values of α and β of LP equation agreed with experimental observations, concluding that the detoxification is associated with the fungal growth phase. Fermentation could be a complementary alternative for other processes of detoxification of lupin seeds.

2. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas se han convertido en uno de los sectores más relevantes en la industria agroalimentaria mundial, por poseer un alto contenido de proteínas que pueden ser utilizadas en la nutrición humana y animal. En Colombia su impulso comenzó desde el primer tercio del siglo XX, donde ya se explotaban con doble propósito¹ semillas de especies como el maní. A mediados del mismo siglo se inició la producción de soya logrando un área sembrada de 66500 ha en 1970. Hacia finales de siglo esta disminuyó a 10379 ha como consecuencia de la fuerte competencia del sector, hasta llegar hoy en día a una nula participación en las exportaciones mundiales (Roldán Luna *et al.*, 1997). La producción mundial de soya ha sido liderada desde años atrás por Estados Unidos, Brasil y Argentina (Martínez *et al.*, 2005), tendencia que hoy en día continua con una producción de 83, 74 y 50 millones de toneladas (Agropanorama, 2012). La producción nacional es incapaz de suplir la demanda la cual es atendida por importaciones que vienen principalmente de los Estados Unidos. En el periodo enero-octubre de 2011, la importación de semilla de soya representó el 0.9 % del total de las importaciones del país, además de una gran cantidad de torta de soya (MINCOMER, 2011). La semilla y la torta son utilizadas en diversos ámbitos de la industria alimenticia y en la fabricación de balanceados para animales.

En el mundo se han evaluado otras alternativas con el propósito de disminuir la dependencia de la soya. Una de ellas son las plantas del género *Lupinus* (*Lupinus sp.*) principalmente en países como Australia y Chile donde se ha desarrollado tecnología para el cultivo y procesamiento (Adawy, 2001). Esto ha comprobado la posibilidad de explotar industrialmente especies como el altramuza (*Lupinus albus*),

¹ Se consideran como doble propósito en razón de que de estas especies se obtienen grasas y proteínas.

el lupino amarillo (*L. luteus*), entre otros (Serrano, 2004). La especie nativa de los Andes, el Lupino, chocho, tarwi o Andean lupin (*Lupinus mutabilis*), ha sido utilizada por sus pobladores desde épocas prehispánicas. Pese a que la efectividad nutricional de la semilla ha sido ampliamente comprobada (Rivera y Ramírez, 1986), en Suramérica su desarrollo se ha visto limitado principalmente por la presencia de tóxicos de difícil eliminación.

El Lupino (*L. mutabilis*) es originario de la región de los Andes desde Venezuela hasta Chile. Actualmente sus semillas se aprovechan sólo en Bolivia, Perú y Ecuador, para consumo casero e industrial. Los reportes más recientes sobre la producción Ecuatoriana y Peruana fue de 1524 y 9887 ton, para los años 2005 y 2001 respectivamente (Dinero, 2007) (Minagricultura Perú, 2008). En Colombia su producción y consumo es casi nula, existiendo a la fecha cultivos experimentales y algunos utilizados principalmente para consumo animal.

El Lupino (*Lupinus mutabilis*) posee una semilla con 45% de proteína, 18 % de aceite, 21% de extracto no nitrogenado, 11% de fibra, además de otras sustancias benéficas de diferente naturaleza (Hawthorne, 2006; Dini *et al.*, 1998). El desarrollo de la especie se ha limitado por el contenido de sustancias tóxicas conformadas por alcaloides quinolizidínicos las cuales se encuentran al interior de las células (Hatzold *et al.*, 1983). Estos alcaloides confieren al grano cierto nivel de toxicidad y un sabor fuertemente amargo. Los Incas idearon un método para detoxificarlo o desamargarlo, 'el remojo acuoso continuado' el cual es usado hasta la actualidad. Aunque con este método se puede llegar a un 99 % de detoxificación, su aplicación a gran escala es difícil ya que es laborioso, provoca reacciones de descomposición indeseables (Palacios y Ortega, 1998) y la consecuente pérdida de nutrientes por solubilización (Navas, 1995). Adicional a esto, con las aguas de remojo que se vierten se genera un fuerte impacto ambiental por la toxicidad de las sustancias lixiviadas. La combinación de estos aspectos va en detrimento de la competitividad de esta actividad económica por los sobrecostos generados.

El proceso de remojo ideado por los Incas ha evolucionado con la adición de sustancias químicas que mejoran la extracción (FAO, 2007). Otros procesos que se han evaluado son los tratamientos térmicos (Palacios y Ortega, 1998) y la germinación de la semilla (Sánchez *et al.*, 2005), observando una baja eficiencia de detoxificación. Investigadores del INIAP en Ecuador, han desarrollado un proceso completo para la detoxificación de las semillas basado en el principio del remojo, la cocción y la adición de agua ozonizada (Comunicación verbal Ing. Elena Villacrés investigadora INIAP). Este proceso es altamente eficiente para detoxificar y para controlar las reacciones de descomposición, pero su aplicación es costosa.

En el ámbito agronómico también se han desarrollado investigaciones con el fin de detoxificar la semilla *in vivo*. Con la domesticación de la especie realizada por los Incas, se inició el proceso de selección genética de semillas, prefiriendo las que poseen menor sabor amargo. Este proceso concluyó con la variedad 'Inti' desarrollada por Von Baer, y Groos, (1983), la cual posee niveles de alcaloides de 0.0075 % (Gross *et al.*, 1988). Un procedimiento similar se realizó con los lupinos del Mediterráneo (*L. albus* y otros), con resultados hoy evidentes. Sin embargo en el caso del *L. mutabilis* esto provocó que la planta perdiera sus cualidades de resistencia a plagas y a los eventos climáticos (Comunicación verbal Dr. Ángel Mujica), circunstancia que es inconveniente en las condiciones agroeconómicas del país.

La degradación biológica de los alcaloides ha sido objeto de varios estudios debido a la disminución de los problemas que la detoxificación convencional provoca. Santana *et al.*, (2002) identificó microorganismos capaces de usar estas sustancias como fuente de carbono y nitrógeno. Jiménez *et al.*, (2007) demostró que a través de la elaboración de Tempeh es posible detoxificar cotiledones enteros de lupino en un alto porcentaje. Por lo tanto, un proceso fermentativo podría aplicarse para detoxificar la semilla de lupino o sus derivados. Éste proceso tendría beneficios adicionales como el bajo costo, reducción casi total de efluentes, disminución del número de operaciones, entre otros. Adicionalmente el

incremento en la biodisponibilidad de nutrientes, la cual es reconocida en productos fermentados como el Miso y el Koji entre otros (Rose, 1982). Estudios similares se han realizado para establecer aspectos técnicos del bioproceso en la detoxificación de la torta de algodón y la canola.

En el estudio de Jiménez *et al.*, (2007), se alcanzó la eliminación del 91 % de los alcaloides del *L. mutabilis* en cotiledones. Mejorar este nivel de detoxificación depende de la comprensión de aspectos físicos, químicos, biológicos y de ingeniería que inciden directamente en el proceso de fermentación con *R. oligosporus*. La fermentación sólida está influenciada por parámetros como la humedad, el pH, el tamaño de la partícula y la aireación, que no han sido estudiados en la fermentación del lupino. El objetivo del presente estudio fue evaluar la incidencia de los parámetros del proceso de fermentación sólida con *Rhizopus oligosporus*, en la detoxificación de los cotiledones de lupino (*L. mutabilis*). En el presente trabajo se estudió el sistema microorganismo-medio estableciendo las condiciones apropiadas para la detoxificación con el fin de determinar si es posible alcanzar el nivel de consumo alimentario.

Los resultados obtenidos muestran la incidencia de los parámetros de fermentación en la degradación de los alcaloides. El pH inicial del medio demostró su influencia en la detoxificación ya que los sistemas enzimáticos en el pH 5.5 catabolizan una mayor cantidad de alcaloides que en el pH 3.5. En medios sin aireación forzada la humedad y el tamaño de partícula, demostraron influenciar el crecimiento del hongo y mejorar la detoxificación. La aireación forzada no incidió considerablemente en la detoxificación ni en la transferencia de oxígeno. Por el contrario un tamaño de partícula menor mejoró la degradación de alcaloides. Un mayor tiempo de fermentación, mayor temperatura y menor tamaño de partícula, demostraron tener una incidencia negativa en la detoxificación y la calidad del producto final. La cinética experimental de reducción en el contenido de alcaloides, fue ajustada a modelos matemáticos que demostraron buena correlación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. DESCRIPCIÓN DEL LUPINO

3.1.1. Generalidades de la especie

Los *Lupinus* son un género de plantas dicotiledóneas que pertenecen a la familia Fabaceae. Las especies están distribuidas en los 5 continentes, siendo Norte y Suramérica donde se encuentra el mayor número (Wink, 1991). Sus semillas se caracterizan por tener alto contenido de proteínas, grasas y otros nutrientes además de sustancias tóxicas y antinutricionales. En lo agrícola estas leguminosas son importantes por su capacidad de mejorar el suelo liberando fósforo y fijando nitrógeno atmosférico, además de su resistencia a plagas, sequías y heladas (Jacobsen y Mujica, 2006). Actualmente especies Europeas como el lupino blanco (*L. albus*), el lupino amarillo (*L. luteus*) y el lupino azul (*L. angustifolius*) (Wink, 1991) son las especies de mayor desarrollo agroindustrial, principalmente en países como Australia y Chile, siendo este último el primer productor y exportador de lupino amargo del mundo con una producción aproximada de 64000 toneladas en el 2007 (INDAP, 2007). El lupino blanco cuenta en la actualidad con un amplio desarrollo y valor comercial en diferentes países del mundo, en virtud del adelanto investigativo del cual ha sido objeto (Avelup, 2007).

El lupino, tarwi, chocho o “Andean Lupin” en su denominación internacional, es originario de los Andes centrales, desde Venezuela hasta Argentina. Actualmente es importante únicamente en los países andinos como Bolivia, Perú, Ecuador (Jacobsen y Sherwood, 2002). Crece adecuadamente entre los 2.000 y 3.800 m.s.n.m., en climas templados y fríos (Popenoe y King, 1989). De acuerdo a lo

señalado por Tapia (1982) y Gross (1982), en el sur de Colombia² se observa la presencia de la subespecie tarwi o chocho (*Lupinus mutabilis*), la cual crece en el norte de Perú y Ecuador. Esta subespecie es bianual y su característica de mayor importancia es la tolerancia a la antracnosis (FAO, 2007; Figueroa *et al.*, 2005, Hernández *et al.*, 2007).

Las semillas de Lupino³ (*Lupinus mutabilis*) han sido la base proteica en la alimentación de los pobladores suramericanos desde épocas precolombinas. En la actualidad se utiliza únicamente en países andinos para consumo casero e industrial. Los datos más recientes dicen que esta legumbre en Ecuador tuvo una producción que pasó de 789 a 1524 toneladas por año entre 2000 y 2006 (Dinero, 2007). Aunque en el pasado el Lupino también se encontraba en Colombia (Jacobsen y Sherwood, 2002), en la actualidad crece libremente en la naturaleza y en algunas granjas en donde se conserva como recurso promisorio (Granjas Universidad de Nariño). La explotación de *Lupinus mutabilis* es menor frente a especies como el lupino blanco, cuya producción en Chile se destina a productos principalmente para la nutrición animal.

La planta tiene una altura que varía entre 0,5 a 2 m, su tallo es muy leñoso, ramificada de eje central predominante, con ramas desde la mitad de la planta, con inflorescencia a la misma altura. El número de ramas varía desde unas pocas hasta más de 50. Su raíz puede llegar hasta una profundidad de 3 m con nódulos de diferentes tamaños (1-3 cm diámetro). Posee hojas digitadas, generalmente compuestas por 8 folíolos de forma ovalada a lanceolada. En sus flores los colores van de azul a blanco y rosado, dispuestas en forma de espiga. Los frutos están en vainas de 5 a 12 cm de longitud y un contenido variable de semillas. Estas últimas

² Estas referencias muestran que dentro de la misma especie hay variabilidad por la adaptación a diferentes ecosistemas en los Andes, generando tres subespecies diferentes, ubicadas en tres regiones andinas diferentes. Una en Bolivia y altiplano del Perú; otra en centro y sur del Perú. El Chocho una subespecie característica del norte del Perú y Ecuador; se ha propagado al sur de Colombia en los ecosistemas similares por cercanía geográfica

³ Se continuará llamando 'Lupino' a la especie (*L. mutabilis*)

van de 0.5 a 1.5 cm de diámetro y 0.2 - 0.5 g de peso, recubiertas por un tegumento duro de color predominantemente blanco⁴. Tienen una forma variada entre redonda, ovalada o ligeramente cuadrada (Sánchez, 2006; Jacobsen y Sherwood, 2006).

3.1.2. Composición química y física de la semilla

Las semillas del Lupino se caracterizan por poseer diversidad de nutrientes principalmente proteínas y lípidos (López De Romana *et al.*, 2007; Navas *et al.*, 1996). Una composición proximal comparativa de diferentes especies de lupinos se muestra en la Tabla 1, de la cual es posible observar que el Lupino Suramericano tiene los mayores contenidos de estos nutrientes.

Tabla 1. Análisis proximal expresado en porcentaje de diferentes especies de Lupinos en semilla entera y grano sin tegumento.

Especies	<i>L. angustifolius</i>		<i>L. albus</i>		<i>L. luteus</i>		<i>L. mutabilis</i>	
	Semilla	Grano	Semilla	Grano	Semilla	Grano	Semilla	Grano
Tegumento	24	0	18	0	27	0	16	0
Humedad	9	12	9	11	9	12	8	10
Proteína	32	41	36	44	38	52	44	52
Grasa	6	7	9	11	5	7	14	17
Ceniza	3	3	3	4	3	4	3	4
Lignina	1	1	1	1	1	1	1	1
Polisacáridos	22	29	17	21	8	11	9	10
Oligosacáridos	4	6	7	8	9	12	5	6
Otros componentes	0.50	1	0.60	1	0.90	1	1	1
Suma Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Fuente: (ILC, 2005)

Las proteínas del Lupino son principalmente globulinas y albúminas (Santos *et al.*, 1997), cuyo balance de aminoácidos es rico en lisina y leucina y pobre en aminoácidos azufrados como la metionina y cisteína (Gross *et al.*, 1989). De igual forma la fracción lipídica está conformada mayoritariamente por ácidos grasos insaturados (Zamora *et al.*, 2011) como el ácido oleico, linoléico y palmítico que conforman más del 90 % de esta fracción (Tabla 2) (Jacobsen y Mujica, 2006). En el extracto no nitrogenado se presentan disacáridos como la sacarosa y

⁴ En Australia se conoce como lupino perla, en razón de su apariencia.

oligosacáridos de 3, 4 y 5 unidades como la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa respectivamente (Muzquiz *et al.*, 1999).

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos del Lupino

Ácidos grasos	Vlr %
Oleico	40.4
Linoléico	37.1
Linolénico	2.9
Palmítico	13.4
Palmitoléico	0.2
Esteárico	5.7
Mirístico	0.6
Araquídico	0.2
Behénico	0.2

Fuente: (Jacobsen y Mujica, 2006)

El inconveniente para el desarrollo productivo de las semillas de Lupino es la presencia de alcaloides quinolizidínicos. Estas sustancias poseen un moderado efecto tóxico en vertebrados y le confieren a la semilla y sus derivados un fuerte sabor amargo (DuPont *et al.*, 1993). Están presentes como consecuencia de los procesos de autodefensa de la planta contra atacantes en el ecosistema (Wink y Twasdowski, 1992; Wink, 1994). En algunos estudios se ha demostrado que la resistencia de la planta contra enfermedades como la antracnosis está relacionada con la presencia de los alcaloides (Hernández *et al.*, 2007), razón por la que su eliminación por manipulación genética sería poco práctica.

En la semilla también es posible encontrar sustancias antinutricionales tales como compuestos fenólicos, fitatos y oligosacáridos. Sin embargo se encuentran en pequeña cantidad, tienen baja toxicidad y pueden eliminarse fácilmente.

El Lupino contiene aproximadamente 3,5 % (p/p) de alcaloides, lo que se considera como un contenido medio frente a otras especies de *Lupinus*. Pertenecen a la familia de los alcaloides quinolizidínicos derivados de la lisina, compuestos en su mayoría por dos anillos heterocíclicos, hidrofílicos, termoresistentes, con peso molecular promedio de 220 g/mol (Hatzold *et al.*, 1983; Wink, 1991; Schoeneberger *et al.*, 2007). Dentro de las semillas los alcaloides

asociados a otras sustancias son las responsables del sabor amargo que caracteriza a esta especie y que hace completamente impalatable cualquier producto elaborado con semillas sin tratamiento (DuPont *et al.*, 1993).

La fracción de alcaloides está conformada por una mezcla de sustancias siendo predominantes para la especie (*L. mutabilis*) la lupanina y esparteína (Tabla 3). La toxicidad de estas sustancias DL_{50} en vertebrados es de 450 y 550 mg/kg respectivamente (Blanner *et al.*, 2002). Butler *et al.*, (1996) confirma además que la ingesta de estas sustancias tiene efectos sobre el contenido de glóbulos rojos. Un efecto teratogénico se reporta para alcaloides minoritarios como la amodendrina y la anagirina, a los cuales se les atribuye enfermedades como el síndrome del ternero cojo (Panter, 2005). Otros estudios han demostrado la efectividad de estas sustancias para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Tyski *et al.*, 1988; Figueroa *et al.*, 2005; De la Vega *et al.*, 1996), mostrando inhibición del 46 % sobre el crecimiento de *A. oryzae* (Blanner *et al.*, 2002). Pese a las investigaciones hechas sobre estas sustancias, en general son pocos sus usos prácticos. Las investigaciones más recientes están encaminadas a la utilización de estas sustancias para usos agrícolas (Villacrés *et al.*, 2008).

Al igual que en la mayoría de especies vegetales en el Lupino es posible encontrar sustancias antinutricionales tales como el ácido tánico que disminuye la digestibilidad de proteínas (Bartolomé *et al.*, 2000), los fitatos que reducen la absorción de minerales (Greiner, 2001) los oligosacáridos causantes de problemas gástricos (Muzquiz *et al.*, 2006) y la disminución de la absorción de glucosa y metionina (Zdunczyk *et al.*, 1997). Estas sustancias tienen baja toxicidad y se eliminan mediante el remojo, la germinación, la cocción e incluso la fermentación (Haddad *et al.*, 2006). Por su baja toxicidad y por la variedad de opciones para la eliminación de estas sustancias se considera que su presencia es un problema menor en comparación a la presencia de los alcaloides.

Tabla 3. Contenido de alcaloides presentes en la semilla de Lupino (*L. mutabilis*).

No.	COMPUESTO	% PESO
1	Lupanina	1.78
2	13-Hidroxilupanina	0.46
3	4-Hidroxilupanina	0.27
4	Esparteina	0.23
5	Tetrahidrohombifolina	0.11
6	4,13-Hidroxilupanina	0.066
7	13-(Angeloiloxi) lupanina	0.05
8	<i>cis</i> -13-cinamoiloxi) Lupanina	0.036
9	Angustifolina / oxoesparteina	0.02
10	<i>trans</i> -13-(cinamoiloxi) lupanina	0.012
11	13-(Tigloiloxi) lupanina	0.01
12	α -Isolupanina	0.009
13	Amodendrina	0.007
14	13-(Angeloiloxi)-4-	0.007
15	4-(Angeloiloxi) lupanina	0.007
16	13-(Benzoiloxi) lupanina	0.007
17	Multiflorita	0.004
18	Dehidrolupanina	0.003
19	17-Oxolupanina	0.003
20	11,12-Dehidroxiesparteina	0.002
21	Anagirina	0.001
22	No identificados	0.008
Total contenido de alcaloides		3.1

Fuente: Hatzold *et al.*, 1983

3.2. PROCESOS DE DETOXIFICACIÓN⁵ APLICADOS A LA SEMILLA DE LUPINO

La detoxificación o desamargado del lupino consiste en la eliminación de los alcaloides. Este proceso es imprescindible, ya que son estas sustancias la razón principal de la toxicidad y de la impalatabilidad de las semillas. Los tratamientos realizados para la detoxificación funcionan mayormente en base a la extracción y/o eliminación de los alcaloides.

En épocas prehispánicas los Incas idearon un proceso de detoxificación basado en la hidrosolubilidad de estas sustancias, que consistía en someter a las semillas

⁵ En el presente trabajo se establece como “procesos de detoxificación” lo que en otros trabajos se conoce comúnmente como “desamargado”.

al agua corriente de quebradas por varios días. Actualmente, el proceso ha evolucionado a remojos en contenedores hasta con 5 cambios de agua y cocciones intermedias, con una duración aproximada de 120 h. Este proceso garantiza una eficiencia de remoción del 99 %, dejando a las semillas con un contenido de alcaloides de 0.02 %, nivel considerado como límite permisible para el consumo (Schöneberger e Ildefonso, 1981; Sousa *et al.*, 1994).

Las dificultades de extracción están relacionadas con la ubicación intracelular de estas sustancias. El proceso acuoso requiere de múltiples operaciones unitarias, provoca la pérdida de nutrientes y reacciones de descomposición. Requiere de una demanda energética considerable y causa impactos ambientales nocivos por los lixiviados. Todos estos aspectos al final se traducen en un proceso con altos costos de ejecución.

El proceso de desamargado acuoso requiere de varias operaciones de transporte, tanto para la semilla en cada lote como para la movilización de agua de extracción. Se requiere agua en una proporción cinco veces mayor a la cantidad de material procesado. También es necesario al menos un calentamiento hasta temperatura de ebullición sostenido durante 30 min. Estos procedimientos permiten que la semilla detoxificada pueda ser utilizada únicamente para la fabricación de productos con alto valor agregado.

La detoxificación acuosa provoca además otros efectos sobre la semilla. La pérdida de nutrientes disminuye la calidad nutricional por la eliminación de sustancias solubles entre las que se encuentran proteínas, minerales, vitaminas y carbohidratos. En el caso de las proteínas la pérdida puede llegar hasta un 29 % (Navas *et al.*, 1995). De igual forma en el proceso se presentan reacciones de deterioro provocadas por la fermentación espontánea del material que afecta la calidad organoléptica (Palacios y Ortega, 1998). La descomposición favorecida por la alta humedad se caracteriza por la producción de un fuerte olor y sabor, cuyos efectos no desaparecen con facilidad.

Finalmente, el tratamiento de los lixiviados implica la ejecución de operaciones que aunque no están relacionadas directamente con la detoxificación, forman parte de los costos finales de procesamiento. Desde el punto de vista ambiental se debe tener en cuenta que el escalamiento de la extracción acuosa, implicaría la ejecución de procesos para tratar las aguas residuales. Actualmente se han implementado procesos como la ultrafiltración para la concentración de los alcaloides y así poder reducir el volumen de efluentes (Investigaciones realizadas por INIAP). De igual forma Santana *et al.*, (2002) investigó con buenos resultados, procesos biológicos con el fin de remover los alcaloides presentes en estas aguas.

La detoxificación acuosa ha evolucionado con la adición de sales, ácidos orgánicos y ozono (FAO, 2007). Con esto se ha obtenido una disminución en el tiempo de detoxificación y una disminución de la cantidad de agua utilizada. En el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador INIAP, han mejorado el proceso con la adición de agua ozonizada para disminuir las reacciones de putrefacción (Comunicación verbal Ing. Elena Villacrés investigadora INIAP). No obstante, en este proceso persisten las pérdidas nutricionales, alto consumo energético, la producción de lixiviados contaminantes y los altos costos, permitiendo la utilización del material únicamente para productos de alto precio.

Algunos procesos alternativos también han sido estudiados para la detoxificación del lupino. Entre estos, los tratamientos térmicos cuya aplicación es limitada por la termoestabilidad de estas sustancias (Palacios y Ortega, 1998). La cocción a presión y con la aplicación medios alcalinos con detoxificaciones parciales (Jiménez *et al.*, 2001). La germinación que provoca una baja detoxificación y variaciones en las estructuras de los alcaloides (Sánchez *et al.*, 2005). Ninguno de estos procesos por si solo, garantiza la eliminación total de las sustancias aunque podrían combinarse para obtener una mayor eficiencia (Haddad *et al.*, 2006).

La detoxificación *in vivo*, para el *L. mutabilis* llegó a su punto más alto con el trabajo de Von Baer, y Groos, (1983) con el desarrollo de la variedad “Inti” sin alcaloides. Los resultados de esta investigación son poco prácticos ya que la eliminación de estas sustancias en la planta provoca la pérdida de las características de resistencia que son de mucha importancia para el cultivo del lupino. Los trabajos realizados por el Ingeniero Eduardo Peralta Líder del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP Ecuador, se han fundamentado en la búsqueda del mejoramiento de la precocidad y el incremento de los rendimientos de la producción agrícola; no en la detoxificación.

3.3. LA FERMENTACIÓN SÓLIDA

Consiste en el cultivo de microorganismos en un medio sólido humedecido, sin la presencia de una fase acuosa libre. Para estos procesos se reportan ventajas tales como la reducción de efluentes, el mejoramiento de las propiedades organolépticas, el mejoramiento de la composición bromatológica y la biodisponibilidad de los nutrientes, la mejora en los rendimientos, la inhibición de microorganismos nocivos y a la eliminación de sustancias nocivas (Nigam y Robinson, 2004). Se reconoce que estos procesos son relativamente baratos y simples, incrementando la competitividad de los productos (Holker y Lenz, 2005).

3.3.1. La fermentación sólida en el procesamiento de alimentos

Las fermentaciones sólidas se han aprovechado en todo el mundo para la biotransformación de alimentos, confiriéndoles características de conservación, sensoriales y nutricionales especiales (Rose, 1982). Otros estudios han demostrado la capacidad de mejorar el alimento gracias a la eliminación de diferentes compuestos antinutricionales y toxinas (Zamora y Field, 1979).

Aprovechando la capacidad detoxificante, diversas fermentaciones se han ensayado en la soya, el algodón, la canola, entre otros, (Pal Vig y Walia, 2001; Nout *et al.*, 1995). Se ha estudiado los requerimientos para la fermentación, el tipo de microorganismos y su nutrición, condiciones del medio, estudios de la cinética y aplicación de la ingeniería en el desarrollo de reactores (Zhang *et al.*, 2006, Weng y Sun, 2006 a, b). También se reporta la producción de sustancias nutricéuticas como isoflavonas entre otros. Los beneficios de las fermentaciones justifican la profundización en su conocimiento (Thomas *et al.*, 2007).

Existen pocos estudios relacionados con fermentaciones en el lupino, razón que justifica la profundización en el tema para su futura aplicación. Estudios como el de Santana *et al.*, (2002), demostraron que algunas especies de *Pseudomonas* degradan alcaloides quinolizidínicos en alto porcentaje. De igual forma Jiménez *et al.* (2007) demostró que con *Rhizopus* pueden eliminarse alcaloides mientras se fabrica alimentos con Lupino. En otros trabajos se ha estudiado al lupino como materia prima para la producción de enzimas, comprobando su calidad composicional (Blanner *et al.*, 2002). Estudios preliminares de fermentación propios para detoxificación de masas de lupino se realizaron con la elaboración del Miso. Se determinó cualitativamente (por el grado de desaparición del sabor amargo) una disminución del sabor amargo posterior.

3.3.2. Características del medio y condiciones del proceso en la fermentación sólida.

En la fermentación sólida, la humedad A_w , la composición química de los sustratos, el pH y el tamaño de la partícula en conjunto con las condiciones de proceso como la aireación, la altura y la forma del reactor, inciden directamente en el metabolismo de los microorganismos y en los resultados del proceso.

3.3.2.1. La humedad

La humedad se relaciona directamente con el transporte de sustratos y productos en el sistema. De igual forma garantiza el crecimiento y afecta directamente su metabolismo (Kuswanto, 2004; Roussos y Perraud-Graine, 1996). En conjunto con la A_w son un referente de la capacidad del medio para sostener el crecimiento microbiano. También es importante en la disipación del calor en sistemas fermentativos a escala mayor (Angel *et al.*, 2002). En el caso del lupino la humedad afecta el tamaño de partícula, el área superficial y la porosidad del lecho.

3.3.2.2. El pH

El pH y el crecimiento del *R. Oligosporus* se relacionan inversamente (Nagel, 2002). El incremento del pH por el amoniaco de la proteólisis, disminuye la producción de biomasa causándose inhibición por producto. Un fenómeno similar se presenta en medios acidificados (Steinkraus, 1996; Sparringa y Owens, 1999). El pH afecta la germinación en valores por encima o por debajo de 4.0 (Medwin y Grant, 1984). De igual forma el pH está relacionado con la ejecución de reacciones enzimáticas. La actividad de las enzimas del *Rhizopus* está caracterizada por picos de actividad cuyos valores óptimos están en 3.0 y 5.5 (Miskiewicz *et al.*, 2004). El pH en la fermentación con *Rhizopus* cambia permanentemente (Nout *et al.*, 1990) razón por la que se requiere estudiarlo.

3.3.2.3. El tamaño de partícula

La porosidad permite el incremento en el crecimiento microbiano e incide directamente en la producción de enzimas (Rahardjo, 2005). El tamaño es inversamente proporcional a la accesibilidad del hongo a las sustancias en el interior de la partícula. Algunos estudios de la penetración de micelio de *R. oligosporus* en soya, han determinado que este se introduce hasta el 25 % del espesor de la semilla (Jurus y Sundberg, 1976). La reducción de tamaño es una

manera de facilitar el alcance a las partes más profundas del grano permitiendo alcanzar a los alcaloides.

El tamaño en el lupino cambia en función de la humedad ya que el material absorbe gran cantidad de agua lo que provoca su hinchamiento. Teniendo en cuenta la tendencia pegajosa del lupino, esta característica debe estar en un límite que facilite la aireación sin producir apelmazamiento que la restrinja.

3.3.2.4. La aireación

La aireación en microorganismos aerobios es fundamental para el crecimiento y la producción de metabolitos. De la respiración del microorganismo también depende la velocidad de generación de calor metabólico y la concentración del dióxido de carbono (Viniegra *et al.*, 2003). La aireación en relación al tamaño de partícula juega un papel muy importante en la conservación de la humedad del medio. En el caso del *R. Oligosporus* la aireación está influenciada por la capa de biomasa formada sobre el sustrato y la transferencia de oxígeno al agua presente en la superficie de la partícula (Oostra *et al.*, 2001).

En estudios realizados para algunos tipos de fermentación en columnas empacadas, existen estándares recomendados de velocidades de flujo los cuales están entre 0.85 y 1.2 cm/s (Mitchell *et al.*, 2006). Algunos experimentos varían su tasa de flujo de inyección de aire a fin de establecer el punto óptimo, que permita el máximo crecimiento con el menor impacto sobre el medio (Spier *et al.*, 2007).

3.3.3. Modelamiento de los procesos de fermentación sólida.

Son importantes para establecer el grado de correlación existente entre las variables en el sistema microorganismo sustrato. La fermentación sólida ha tratado de describirse a través de múltiples modelos matemáticos que explican los fenómenos que ocurren en el proceso (Mitchell *et al.*, 2003). No hay referencias relacionadas con el lupino.

3.3.3.1. Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento en fermentaciones sólidas incluye ecuaciones lineales, exponenciales y logísticas, que contienen diferentes variables para explicar los efectos en el crecimiento, la producción de metabolitos y el consumo de sustratos.

La ecuación logística es utilizada por su simplicidad y su alta aproximación descriptiva en todas las fases del crecimiento (Ec. 1 y 2). Es utilizada para la predicción en función de la concentración inicial y máxima de biomasa, la tasa de crecimiento específico y el tiempo (Mitchell *et al.*, 2004). Esta es la ecuación más utilizada en la descripción del crecimiento del *Rhizopus*.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad \text{Ec. (1)}$$

$$X = \frac{X_m}{1 + ((X_m/X_0) - 1)e^{-\mu t}} \quad \text{Ec. (2)}$$

En trabajos como el de la degradación del gossipol, Weng y Sun (2006b) describen la cinética de eliminación de la sustancia a partir de la combinación de la ecuación logística y una ecuación empírica que relaciona la variación de reactantes y el crecimiento en el tiempo. Se observó un R^2 del 99 % entre los valores predichos por el modelo con los valores experimentales.

Otra ecuación utilizada es la ecuación exponencial (Ec. 3) que se aplica para describir la etapa de crecimiento. La biomasa está en función de la cantidad de biomasa inicial X_0 , el tiempo t y tasa de crecimiento específico μ .

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad \text{Ec. (3)}$$

3.3.3.2. Cinética de detoxificación y consumo de sustratos.

El crecimiento microbiano se describe en función de la presencia de un producto o sustrato, el consumo de oxígeno, fuentes de carbono nitrógeno y/o productos entre ellos dióxido de carbono o metabolitos de interés. La ecuación de Pirt (1975) (Ec. 4) es útil para determinar las variaciones de reactantes en función del

crecimiento (X), coeficiente de rendimiento biomasa por reactantes (Y_{XR}) y un coeficiente de mantenimiento (m_R) (Mitchell *et al.*, 2004). La ecuación de Luedeking-Piret (1959) (Ec. 5) explica la formación de productos y está en función de un coeficiente de producto asociado al crecimiento (Y_{PX}) y un coeficiente del producto no asociado al crecimiento m_p .

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{1}{Y_{XR}} \frac{dX}{dt} - m_R X \quad \text{Ec. (4)}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + m_P X \quad \text{Ec. (5)}$$

3.4. EL HONGO *Rhizopus oligosporus* Y SU METABOLISMO

Los hongos poseen un metabolismo heterótrofo semejante al de otras células eucariotas. Los nutrientes complejos se digieren mediante exoenzimas liberadas al medio, siendo posteriormente absorbidos. La glucólisis vía respiración aerobia, es la forma habitual para la obtención de energía (Cochrane, 1958).

La especie *Rhizopus oligosporus* es utilizada en la producción de alimentos como el Tempeh. Los cambios provocados en la soya son consecuencia de las enzimas producidas (Nout y Kiers, 2005). Se ha reportado su participación en la eliminación de toxinas bacterianas e inhibición de otros microorganismos (Swan, 1982). La destrucción de aflatoxinas alcanza hasta un 40% cuando estas ya existen (Jennessen *et al.*, 2005). Posee células multinucleadas, que invaden rápidamente sustratos ricos en proteínas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C y la de esporulación 41°C, sin exceso de oxígeno y humedad (Soccol, 1992). El crecimiento es mejor en pHs ácidos, aunque es afectado en valores por debajo de 3.5 (Sparringa *et al.*, 2002). La atmosfera óptima debe contener un 20 % de oxígeno y menos del 5 % de CO₂ (Nout y Kiers, 2005). En la elaboración de Tempeh puede coexistir con diferentes microorganismos tales como el *Lactobacillus plantarum* (Nout y Rombouts, 1990). Estos factores son

responsables de la calidad de los productos y de su velocidad de formación (Kuswanto, 2004).

El hongo posee efecto proteolítico evidenciado por el incremento de aminoácidos libres y la producción de amoníaco, el cual es indeseable puesto que incrementa el pH y es tóxico, inhibiendo el crecimiento (Sparringa y Owens, 1999). También posee capacidad lipolítica que se evidencia por la reducción en el contenido de extracto etéreo y el incremento en la proporción de ácidos grasos libres (Nout y Kiers, 2005). Hidroliza lentamente oligosacáridos como la estaquiosa, verbascosa y rafinosa (Nout y Kiers, 2005). Además produce metabolitos secundarios entre los que están vitaminas del complejo B, carotenos, ergosterol y ácido linoléico (Kuswanto, 2004). El hongo requiere de vitaminas para su desarrollo razón por la que algunas de estas disminuyen (Reddy y Pierson, 1994).

La capacidad de biodegradar diferentes sustancias se produce por la variedad de enzimas producidas. Varzakas, (1998) estudió los sistemas enzimáticos del hongo involucrados en la fermentación de tempeh en soya. Se identificó la presencia de enzimas proteolíticas como arilamidases activas en leucina y valina además de quimotripsinas. Estas aminopeptidasas hidrolizan el enlace CO-NH con una alta actividad durante toda la fermentación. Las fosfatasas (ácidas y alcalinas) participan activamente en la hidrólisis de monoésteres de ácido fosforotioico donde se han sustituido S – O. También puede observarse la actividad de lipasas y carbohidrasas. La α -manosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, lipasa estearasa, estearasa y naftolfosfohidrolasa, presentan baja actividad. Enzimas como la endoglucanasa y endoxilanasas cuya actividad es alta después de 40 h de fermentación, está relacionada con la penetración de micelio en la semilla. Miszkiewicz *et. al.*, (2004) observó la presencia de enzimas ácidas que tienen picos de actividad durante el proceso a pHs de 3.0 y 5.5. La incidencia de estos sistemas enzimáticos podría relacionarse con la degradación de los alcaloides.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL, ADECUACIÓN Y ALMACENAMIENTO.

Las semillas de lupino (*L. mutabilis*) utilizadas en la experimentación se obtuvieron de cultivos pilotos establecidos en la ciudad de Pasto-Nariño-Colombia, en el corregimiento de Anganoy a 2659 m.s.n.m. El material vegetal inicial para implementar los cultivos pilotos fueron semillas de *Lupinus mutabilis* variedad Andino 450 obtenido en el INIAP Estación Santa Catalina en Quito Ecuador.

Las semillas cosechadas fueron seleccionadas manualmente para eliminar material defectuoso. El lote fue dividido en una fracción que fue conservada completa y otra descascarada para separar cotiledones y tegumento. Parte de los cotiledones fueron conservados enteros, parte molido hasta harina (Tyler malla No 48) y parte quebrantados al tamaño requerido en cada prueba (Tyler malla No 4 y No 6). Cada fracción se guardó en bolsa plástica y éstas en recipiente de polipropileno cerrado y conservadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

4.2. MICROORGANISMO E INÓCULOS

Se adquirió una cepa de *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 en The American Type Culture Collection Corporation ©, USA. La activación y obtención de esporas para fabricar inóculos y el testigo se realizó en agar PDA. Inicialmente la cepa fue activada a 25° C por siembra en tubo inclinado. De estos se repicaron a otros tubos de trabajo de los cuales se tomó material para producir esporas.

Los inóculos se prepararon de micelio esporulado sembrado sobre agar PDA, incubados a 30° C durante 9 días. La suspensión de esporas para la fase 2 y 3 de experimentación se hizo adicionando 6 ml de agua destilada estéril en cada tubo. Se raspó con asa y se vació la suspensión en un tubo vacío estéril. La suspensión

se estandarizó con un contenido de 10^7 esporas ml^{-1} de suspensión contadas en cámara Malassez. La producción de esporas en la fase 4 se realizó sobre agar PDA en matraz, a 30°C durante 7 días. La suspensión se preparó adicionando al matraz 20 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 0.1 % y raspando con agitador magnético. La suspensión se recolectó en tubo estéril para su uso.

4.3. DETERMINACIÓN DE pH, HUMEDAD Y ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.

La determinación de la humedad se realizó por la técnica A.O.A.C. 930.15/90. La medición del pH se realizó de acuerdo a la técnica A.O.A.C. 943.02/90. Se tomó 1 g de muestra y se homogenizó en 10 ml de agua desionizada. La mezcla permaneció en reposo por 30 min y el pH se midió en potenciómetro a 20°C .

La determinación de alcaloides quinolizidínicos se realizó según Muzquiz et al. (1993). Se homogenizó una muestra de 0.5 g con 5 ml de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se centrifugó a $10000 \times g$ por 15 min repitiendo este procedimiento tres veces. Los sobrenadantes recogidos se neutralizaron con 1 ml de hidróxido de sodio 10 M. Se realizó tres extracciones con 10 ml de cloroformo (Merck Uvasol) en embudo de decantación. El cloroformo se recogió y se evaporó a vacío 30°C hasta sequedad total. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol para inyectar en cromatógrafo. La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A equipado con un detector FID a una temperatura de 280°C . Se usó una columna DB-1MS 1&W Scientific (30 m x 0.25 mm x DI 0.25 μm) y helio como gas de arrastre a una tasa de 1.0 ml min^{-1} . La programación de temperatura comenzó a 150°C incrementando de 5°C min^{-1} hasta alcanzar los 235°C . Se utilizó estándar de cafeína como patrón interno. La identificación de los picos se hizo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, en un equipo Shimadzu GC-MS QP-2010 en las mismas condiciones de la cromatografía.

El cálculo de la detoxificación se realizó con los valores obtenidos de alcaloides totales en los diferentes puntos de la cinética. Se realizó mediante la ecuación:

$$\%D = (C_I - C_F) / C_I * 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

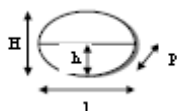
Donde: C_I = Contenido inicial de alcaloides (mg g^{-1})
 C_F = Contenido final de alcaloides (mg g^{-1})

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA

4.4.1. Determinación propiedades físicas

Los componentes de la semilla se determinaron pesando 10 g y haciendo la separación manual de tegumento y cotiledones. Cada parte se pesó y finalmente se estimó su porcentaje en peso (g). La determinación del tamaño se realizó haciendo mediciones ortogonales utilizando un Vernier (precisión 0.05 mm). Para las mediciones, se tomaron aleatoriamente 100 semillas enteras parcialmente secas. Posteriormente las medidas se hicieron en semillas hidratadas en 40, 50 y 60% de humedad. Para calcular el diámetro promedio de cada partícula o semilla se utilizó la ecuación siguiente (ASAE, 1986):

$$D_p = \sqrt[3]{H \cdot l \cdot p} = (H \cdot l \cdot p)^{1/3} \quad \text{Ec. (7)}$$



Donde: H , L , p son las dimensiones ortogonales de altura, longitud y profundidad, respectivamente.

El volumen de la semilla se calculó con la ecuación del casquete, cuya forma se asemeja a la del cotiledón. Éste multiplicado por 2 es el volumen de la semilla.

$$V_p = 2\pi h^2 \left(R - \frac{h}{3} \right) \text{ Ec. (8)}$$

Donde: h es la altura del casquete y R es el radio. El radio utilizado para el cálculo es el promedio de la longitud y la profundidad de la semilla.

4.4.2. Determinación de la composición química

Los análisis químicos se realizaron en la semilla completa, cotiledones y el tegumento. Se utilizaron las siguientes metodologías: humedad A.O.A.C. 930.15/90, proteínas (N x 6.25) Kjeldahl Gunning-Arnold, materia grasa A.O.A.C. 920.39/90, fibra bruta A.O.A.C. 962.09/90, cenizas A.O.A.C. 942.05/90 y extracto libre de nitrógeno por diferencia. La composición mineral en cotiledones y tegumento se determinó por espectrofotometría de absorción atómica: oxidación húmeda, colorimétrica para el fósforo y turbidimétrica para el azufre y absorción atómica para los demás elementos. Se utilizó un equipo Perkin Elmer 2380 Atomic Absorption Spectrophotometer. Para la determinación de fibra detergente neutra (FDN), fibra ácida (FDA), lignina, celulosa y hemicelulosa se utilizó el método de Van Soest (Bernal de Ramírez, 1994). La composición elemental se determinó en harina de semilla entera previamente secada en estufa a 105 °C. Se empleó un analizador CHN Analyzer Flash EA-1112 (Thermo Electron Corporation).

4.4.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas

Se determinó la capacidad máxima de hidratación del grano, la velocidad de absorción y el pH de acuerdo con el incremento en la humedad. Se tomaron muestras de 20 g de material (base parcialmente seca) y fueron colocadas en vasos de precipitados. Estas se cubrieron con 60 g de agua destilada a temperatura constante de 30 °C. Cada 2 h durante 24 h, una de las muestras fue drenada, secada con papel absorbente y pesada para determinar la ganancia en peso de agua. Luego se determinó el contenido de humedad de acuerdo con A.O.A.C. 930.15/90.

La caracterización del material en las humedades de 40, 50 y 60% se realizó en 50 g de material a los que se les adicionó agua de acuerdo al balance inicial. La medición del diámetro y volumen en cada nivel de humedad se hizo con un Vernier y se utilizaron las ecuaciones 7 y 8 para hacer los cálculos respectivos. La medición del pH se realizó de acuerdo con la técnica A.O.A.C. 943.02/90.

4.4.4. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó aplicando estadística descriptiva. Se utilizó el paquete estadístico MINITAB 14.

4.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA DETOXIFICACIÓN

4.5.1. Preparación del medio

Se prepararon tratamientos de agar lupino con pH de 3.5 y 5.5 denominados AL 3.5 y AL 5.5. Los agares se formularon con 4.5 g de harina por cada 100 ml de agua destilada. Se adicionó el 1.3 y 1.0 % m/v de agar bacteriológico No 1, para cada tratamiento respectivamente. Se adicionó 0.95 ml de una solución de ácido clorhídrico 1 N por cada 100 g de agar para alcanzar un pH de 3.5 y 0.35 ml para alcanzar un pH de 5.5. Para AL 5.5 se preparó el agar bacteriológico, se mezcló con la harina más el ácido y se esterilizó a 121° C por 15 min. El agar de 3.5 se mezcló en dos partes, una fracción de agua-agar con la harina y el ácido y otra de agua y ácido. Luego de la esterilización las dos se mezclaron.

Los agares se vertieron en cajas petri una cantidad aproximada de 10 g. Cuando el agar se enfrió se cubrió con una membrana de polipropileno de 90 mm de diámetro, 0.1 mm de espesor y con poro de 0.1 mm. Como testigo se utilizó agar PDA en proporción de 39 g por litro. Para cada unidad experimental se registró el peso de la caja vacía y anhidra, peso de la caja más el agar y el peso de la caja más agar y membrana anhidra. Por diferencia puede obtenerse el valor de cada uno de los elementos dentro de la caja.

4.5.2. Fermentación

En cada unidad experimental se adicionó como inóculo el 1 % de la masa del medio, equivalente a 100 µl de suspensión que se distribuyó en toda la superficie con aza. Las cajas se introdujeron en incubadora a 25° C y se retiró aleatoriamente 3 de ellas cumplido el tiempo de fermentación.

4.5.3. Determinación de biomasa y materia seca

El peso seco de la biomasa adherida a la membrana se determinó en cada tiempo de fermentación. La membrana se separó de la superficie del agar y se secó a 90° C por 3 h. Luego se enfrió en desecador y se pesó. La biomasa se calculó por diferencia entre el peso total (membrana + micelio) y el peso de la membrana.

Para determinar el contenido de materia seca, el agar que quedó después de retirada la membrana y la biomasa, se secó en estufa a 105° C por un tiempo de 6 h. Finalizado el tiempo las cajas se enfriaron en desecador y se pesaron.

En 48 h de fermentación se realizaron 19 mediciones de biomasa y de materia seca. Para pH 3.5 se muestreó a las 0, 2, 4, 6, 7, 10, 12, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 36, 39, 42, 45, 48 h y en AL 5.5 a las 0, 2, 4, 6, 7, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 36, 39, 42, 45, 48 h. Se realizaron 10 mediciones de pH a las 0, 6, 12, 16, 20, 24, 28, 36, 42 y 48 h para AL 5.5 y para AL 3.5 se midió a las 0, 6, 12, 16, 22, 26, 30, 36, 42 y 48 h. La cinética de biodegradación de alcaloides se construyó con 8 mediciones tomadas a las 0, 12, 16, 20, 24, 28, 36, 42 y 48 h y 0, 12, 16, 22, 26, 30, 36, 42 y 48 h para el pH 5.5 y 3.5 respectivamente.

4.5.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza usando el modelo lineal general en el paquete estadístico MINITAB 14. Se utilizó un nivel de significancia $p < 0.05$.

Tabla 4. Diseño experimental segunda fase

Factores	Niveles	Unidad experimental (UE)	Tratamientos	Réplicas	Total Unidades Experimentales	Variables Respuesta
pH	PDA AL-3.5 AL-5.5	Agar en cajas petri 10 g por caja	57	3	171	Alcaloides Biomasa pH Mat. Seca
Tiempo	19 Puntos					

4.6. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD Y EL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN REACTOR CON AIREACIÓN ESTÁTICA

4.6.1. Preparación del medio

Se determinó el contenido de humedad del material vegetal y se realizó el balance de agua, para calcular la cantidad necesaria para humedecer los cotiledones hasta 40, 50 y 60 % (H-40, H-50 y H-60). En un frasco hermético con capacidad de 2 litros se introdujo el material vegetal, agua destilada y la solución de ácido clorhídrico 1.0 N para nivelar el pH en 5.5. La hidratación se realizó durante 24 h en refrigeración con movimientos continuos para garantizar hidratación homogénea. Para el medio H-40 se prepararon 545.43 g de material húmedo conformados por 332.01 g de cotiledones (Base Parcialmente Seca BPS)⁶, 205.92 g de agua y 7.5 g de solución de ácido. Para H-50 se preparó 666.67 g con 332.01 g de material, 322.89 g de agua y 11.76 g de ácido. Para el medio H-60 se prepararon 857.14 g utilizando 332.01 g de cotiledones, 506.64 g de agua y 18.48 g de ácido.

Las unidades experimentales (frasco), se utilizaron como envases de vidrio de 350 ml de capacidad con 43 mm de diámetro por 95 mm de profundidad. En cada

⁶ Este estado de humedad se considera como “base parcialmente seca” ya que a pesar de que los cotiledones están aparentemente secos, aun guardan una cantidad de humedad al interior. Este valor de humedad se lo tiene en cuenta en los cálculos del balance de materia para elaborar el medio.

frasco se introdujo un papel aluminio con la forma del frasco para contener el material. Se colocó 20 g de materia seca inicial en cada frasco de manera que se introdujo 36.36, 44.44 y 57.14 g de semillas húmedas en H-40, H-50 y H-60 respectivamente. Los experimentos se realizaron en dos tamaños de partícula; cotiledón entero y quebrantada (Tyler malla No 4) en cada humedad. Por tanto, se prepararon 15 frascos para cada uno de los seis tratamientos. La oxigenación fue únicamente el espacio de cabeza dentro del reactor.

Hidratado el material vegetal se introdujo en cada frasco y se tapó para someterse a tratamiento térmico. La temperatura se elevó a 121° C a 15 psi durante 5 min, seguido se despresurizó y enfrió hasta temperatura ambiente.

4.6.2. Fermentación

La fermentación se inició inoculando en cada frasco el 1 % de la masa total de una suspensión de esporas con población de 10^7 esp ml⁻¹. Por tanto se inocularon 0.37, 0.45 y 0.58 ml de suspensión para H-40, H-50 y H-60 respectivamente. En cada reactor se homogenizó para distribuir el inóculo. Luego los frascos se introdujeron en una incubadora a 25° C. Cumplido el tiempo de fermentación se tomaron aleatoriamente 3 frascos en los cuales se realizaron los análisis.

4.6.3. Determinaciones

De cada unidad experimental se registró al inicio el peso del frasco con su tapa vacío, frasco más papel aluminio, frasco más papel y cotiledones húmedos. Durante las 48 h se muestreó cada 12 h y se registró el peso del frasco con el material fermentado. Este se introdujo dentro de una estufa a 105° C durante 72 h para determinar por diferencia la humedad y el peso seco. En cada punto se determinó el pH, alcaloides totales y cenizas. La humedad y el pH se determinaron por las técnicas A.O.A.C. y la actividad acuosa inicial se determinó en un equipo ACUALAB CX-2. Al inicio y al final del proceso se realizó un análisis proximal.

4.6.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Tabla 5. Diseño experimental tercera fase

Factores	Niveles	Combinaciones	Unidad experimental (UE)	Tratamientos	Réplicas	Total Unidades Experimentales	Variables Respuesta
Tamaño	Entero Quebrado	Ent H-40 Ent H-50 Ent H-60	Frasco con material húmedo 20 g de material seca	30	3	90	Alcaloides pH Mat. seca
Humedad	H-40 H-50 H-60	Que H-40 Que H-50 Que H-60					
Tiempo	5 Puntos	5					

Se realizó un análisis de varianza usando el modelo lineal general con el uso del paquete estadístico MINITAB 14. Se utilizó un nivel de significancia $p < 0.05$.

4.7. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD Y EL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN REACTOR CON AIREACIÓN FORZADA

4.7.1. Inóculo

Se preparó tubos de ensayo con agar PDA como cultivos de trabajo para utilizarse como iniciadores. La producción de esporas se realizó en matraces de 250 ml con 50 g de agar PDA. Se sembraron y se incubaron a 30° C durante 7 días.

Para elaborar el inóculo, a los matraces se les adicionó 20 ml de solución acuosa al 0.1 % de Tween 80 y se raspó. La suspensión se recolectó y se contó las esporas por triplicado en cámara de Newbauer. El volumen de suspensión a adicionarse por materia seca de cotiledones, se calculó con la siguiente relación:

$$V_{\text{sus}} = \frac{[E_{\text{med}}] \times \text{MS}}{[E_{\text{sus}}]} \quad \text{Ec. (9)}$$

Donde: V_{sus} = Volumen de suspensión (ml)
 E_{med} = Esporas en el medio (esp g⁻¹)
 E_{sus} = Esporas en la suspensión (esp ml⁻¹)
 MS = Materia seca en el medio (g)

4.7.2. Preparación del medio

Se calculó la cantidad de agua necesaria para humedecer los cotiledones en dos humedades 50 y 60 % (H-50 y H-60) realizando el balance de agua. El medio se preparó en un matraz con capacidad de 1 litro en el que se introdujo el material vegetal, agua destilada y la solución de ácido clorhídrico 1.0 N para nivelar el pH en 5.5. La hidratación se realizó durante 24 h en refrigeración.

El análisis de humedad determinó que los cotiledones (BPS) tenían una humedad de 10.315±0.125 % y un 89.685±0.125 % de sólidos. Por tanto, para preparar 250 g de medio con 50 % de humedad se tomaron 139.37 g de material (BPS) y 110.63 g de agua. Para preparar 250 gramos de medio H-60 se utilizaron 111.51 g de cotiledones y 138.49 g de agua. En el agua para cada medio están incluidos los valores de la solución de ácido y el inóculo. Por tanto el 80 % se utilizó en la hidratación inicial y el restante 20 % para el inóculo y el ácido. El ácido en H-50 se utilizó en una proporción de 0.195 g por cada 11.1501 g de cotiledones (equivalente a 10 g de materia seca). Para H-60 se utilizó 0.309 g de ácido por igual cantidad. El faltante de agua que pudo quedar se completó con agua destilada estéril. Los cotiledones hidratados y acidulados se sometieron a tratamiento térmico a 121° C durante 5 minutos para luego ser enfriados hasta temperatura ambiente. Luego se adicionó el inóculo y el agua restante, se mezcló para homogenizar las esporas inoculadas y se tomó el tiempo como el inicio del proceso.

Se utilizaron columnas de vidrio de 20 mm de diámetro por 180 mm de altura total. Dentro de la columna se definió una altura de lecho de 110 mm que fue el volumen útil del reactor en el cual se fermentó el material. El material inoculado fue empacado en las columnas a las que se les colocó tapones de papel aluminio y algodón en los extremos. Se registró el peso de la columna vacía (con tapones) y el peso de la columna llena.

4.7.3. Fermentación

Se realizaron experimentos en tres tamaños de partícula, entero y quebrantado en serie Tyler malla No 4 y No 6. Dos niveles de humedad, H-50 y H-60 y tres volúmenes de aireación, en 20, 60 y 100 ml min⁻¹ a un tiempo de 48 h. Las columnas se sumergieron en baño maría a 25° C y se inyectó aire húmedo al sistema. Durante ese tiempo se monitoreó la producción de CO₂ y el pH, la humedad y el contenido de alcaloides totales al inicio y al final. Con el tratamiento en el que se observó mayor detoxificación se realizó una cinética de 96 h, con medición cada 24 h.

4.7.4. Determinaciones

La humedad se determinó en una termobalanza OHAUS MB 45. El equipo se programó a una temperatura de 130° C durante 45 min. La medición de pH se hizo de acuerdo a la metodología A.O.A.C. 943.02/90.

La determinación de alcaloides se realizó de acuerdo a la técnica de Muzquiz *et al.*, (1993). La medición se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Corp. CG Autosistem XL R3, equipado con detector FID, columna capilar PE-1 de 30 metros, automuestreador y software Turbochrom Workstation versión 4.1. La identificación se realizó en un cromatógrafo de gases GC-6890 N Network GC sistem, acoplado a un detector de masas 5975B VL MSD e inyector 7683B series, de Agilent Technologies.

Se monitoreó la producción de CO₂ con la ayuda de un equipo de análisis respirométrico. Está conformado por un analizador GOWMAC (Gowmac Instruments Company), gas chromatographer series 580 equipado con un detector de conductividad térmica, columna CTR-1 concéntrica Altech. Se utilizó helio como gas de arrastre a 40 ml min⁻¹ y el equipo se programó a una temperatura de columna de 50° C, inyector a 80° C, detector 80° C y 150 mA. La toma de muestra de cada columna se controló mediante un Multiposition Control Module de Valco Vici Instruments Co. Inc. El sistema se controló con el software Clarity Versión 2.6.06.574 / 21 2009. La determinación de la cantidad de CO₂ y O₂ se calculó con las siguientes relaciones:

La diferencial del CO₂ y O₂⁷:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{(CO_{2mov} - CO_{2aire}) * (Flujo Aire)}{MSI} * \frac{PM CO_2}{VGI} * CorrT^0 * CorrP \quad \text{Ec. (10)}$$

Donde:

- dCO₂ / dt = Diferencial de concentración de CO₂ (mg CO₂ h⁻¹ g MSI⁻¹)
- CO_{2mov} = Concentración promedio de CO₂ móvil (%)
- CO_{2aire} = Concentración de CO₂ en el aire (%)
- Flujo Aire = Volumen de aire inyectado al reactor (ml min⁻¹)
- MSI = Material seca inicial (g)
- PM CO₂ = Peso molecular del CO₂ (mg mmol⁻¹)
- VGI = Constante volumen molecular gas ideal (ml mmol⁻¹)
- Corre T⁰ = Factor de corrección de temperatura
- Corre P = Factor corrección de presión

Para la integral (CO₂ y O₂ acumulado)

$$\left(\frac{Cant CO_2}{g MSI}\right)_2 = \sum_{t=0}^t \left[\left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_1 * (t_2 - t_1) \right] + \left[\left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_2 - \left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_1 * (t_2 - t_1) \right] + \left[\left(\frac{Cant CO_2}{g MSI}\right)_1 \right] \quad \text{Ec.(11)}$$

Donde:

- (Cant CO₂ / g MSI)₂ = Cantidad de CO₂ final (mg CO₂ g MSI⁻¹)
- (dCO₂ / dt)₂ = Diferencial de concentración de CO₂ final (mg CO₂ h⁻¹ g MSI⁻¹)

⁷ Las ecuaciones 10 y 11 se utilizan de igual forma para calcular el contenido de dióxido de carbono y oxígeno cambiando solamente los parámetros de cada compuesto.

$(t_2 - t_1)$ = concentración de CO_2 en el aire (%)
 $(d\text{CO}_2 / dt)_1$ = Diferencial de concentración de CO_2 inicial ($\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g MSI}^{-1}$)
 $(\text{Cant CO}_2 / \text{g MSI})_1$ = Cantidad de CO_2 inicial ($\text{mg CO}_2 \text{ g MSI}^{-1}$)

Para el coeficiente respiratorio CR:

$$CR = \frac{\text{mmol CO}_2}{\text{mmol O}_2} \quad \text{Ec. (12)}$$

Donde: CR = coeficiente respiratorio
 mmol CO_2 = Moles de CO_2 móvil (mmol CO_2)
 mmol O_2 = Moles de O_2 en el aire (mmol O_2)

4.7.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Tabla 6. Diseño experimental cuarta fase

Factores	Niveles	Combinaciones	Unidad experimental (UE)	Tratamientos	Réplicas	Total Unidades Experimental	Variables Respuesta
Tamaño	Entero No. 4 No. 6	Ent H-50 A ₁	Columna material húmedo	18	2	36	Alcaloides pH Mat. Seca CO ₂
		Ent H-50 A ₂					
		Ent H-50 A ₃					
		Ent H-60 A ₁					
		Ent H-60 A ₂					
		Ent H-60 A ₃					
Humedad	H-50 H-60	N _{0.4} H-50 A ₁					
		N _{0.4} H-50 A ₂					
		N _{0.4} H-50 A ₃					
		N _{0.4} H-60 A ₁					
		N _{0.4} H-60 A ₂					
		N _{0.4} H-60 A ₃					
Aireación	A ₁ -20 A ₂ -60 A ₃ -100	N _{0.6} H-50 A ₁					
		N _{0.6} H-50 A ₂					
		N _{0.6} H-50 A ₃					
		N _{0.6} H-60 A ₁					
		N _{0.6} H-60 A ₂					
		N _{0.6} H-60 A ₃					
Tiempo	1						

Se realizó un análisis de varianza usando el modelo lineal general con el uso del paquete estadístico MINITAB 14. Se utilizó un nivel de significancia $p < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA

5.1.1. Propiedades físicas de la semilla

La semilla de *Lupinus mutabilis* posee un color blanco opaco y una forma ovoide con longitudes variables en las tres dimensiones. El diámetro promedio ortogonal es de 7.5083 ± 0.4416 mm con un volumen calculado de $0.3368 \text{ cm}^3 \text{ semilla}^{-1}$, variando entre 0.2975 y 0.3722 cm^3 . Este tamaño de la semilla se considera intermedio comparado con el frijol y arveja que tienen un diámetro de 10.2 y 6.6 mm respectivamente (Codex Stand, 1989). La semilla de lupino posee un 17% más de diámetro en comparación con la semilla de soya (6.3 mm). El mayor tamaño de la semilla de lupino indica que puede proveer mayor cantidad de nutrientes por semilla mejorando el rendimiento en el procesamiento. La semilla está conformada por dos cotiledones y una radícula embrionaria equivalentes al 88.97% del peso total. Tienen un espesor promedio de 2.405 ± 0.26 mm y un color amarillo oscuro debido al contenido de grasas y carotenoides. El 11.03 % de la semilla está compuesta por un tegumento blanco y duro cuyo espesor promedio es 0.20 ± 0.06 mm, variando entre el borde longitudinal de 0.27 mm, transversal de 0.18 mm y superficial de 0.15 mm.

5.1.2. Composición química de la semilla

5.1.2.1. Análisis bromatológico

El lupino mostró un alto contenido de nutrientes principalmente proteína, grasas y extracto libre de nitrógeno (ELN) (Tabla 7). Los valores de proteína y grasa se incrementan en 9.73% y 10.58% respectivamente para los cotiledones. Estos valores son inferiores a los reportados en la literatura, donde se citan contenidos

de 51% de proteína en semillas (Caicedo *et al.*, 2001). El material analizado de *L. mutabilis* tuvo un contenido máximo de proteína de 49.22% en cotiledones. Los valores de semilla entera y cotiledones son superiores al de otras materias primas utilizadas en la industria alimentaria, como la soya que presenta 40% de este compuesto (Orf, 1988).

Tabla 7. Análisis proximal de semilla, cotiledón y tegumento de Lupino (*L. mutabilis*)

Nutrientes	<i>Lupinus mutabilis</i>		
	Semilla	Cotiledón	Tegumento
Semilla entera ₁	100	88.97±3.12	11.03±0.64
Humedad ₁	9.63±0.18	9.67±0.21	10.79±0.53
Proteína ₂	44.86±1.92	49.22±1.37	9.39±0.19
Grasa ₂	13.91±0.97	15.38±1.01	2.20±0.22
Ceniza ₂	5.52±0.12	5.89±0.10	2.55±0.09
Fibra bruta ₂	8.58±0.35	2.42±0.19	58.35±0.72
E. L. N. ₂	27.12±1.07	27.08±0.96	27.50±0.37

1 Porcentajes base parcialmente seca 2 Porcentajes en base seca

La grasa y el ELN presentaron valores de 13.91 y 27.12% en semillas y 15.38 y 27.08% en cotiledones, respectivamente. Estos resultados confirman que lupino es una leguminosa de alto potencial energético. La fracción fibrosa de la semilla se encuentra principalmente en el tegumento que contiene el 58.35% de este compuesto. Está formado por celulosa y hemicelulosa además de lignina (30.44%) la cual es responsable de la textura dura del tegumento. El valor de fibra detergente neutra (FDN) (75%) indica el adecuado valor nutritivo que el material podría tener para herbívoros y que contribuye a la calidad global del lupino (Tabla 8). El análisis elemental encontró que las semillas de lupino contienen 7.35% de nitrógeno total, 55.95% de carbono y 9.83% de hidrógeno. Con base en el contenido de cenizas (5.52%) se estima que el contenido de oxígeno equivale a 21.35%.

En la ceniza se encontró que las semillas contienen elevados niveles de fósforo, potasio y hierro. Sin embargo presenta bajo contenido de calcio y magnesio. Aunque la mayor parte de los minerales se encuentra en los cotiledones, el hierro

y el manganeso se encontraron mayormente en el tegumento. El calcio está predominante en el tegumento con una concentración de 38% respecto a otros minerales, mientras que en los cotiledones está aproximadamente el 1% (Tabla 9).

Tabla 8. Composición de fracción fibrosa de cotiledón y tegumento de Lupino (*L. mutabilis*).

Compuesto	<i>Lupinus mutabilis</i>	
	Cotiledón (%)	Tegumento (%)
FDN	75.06	75.55
FDA	67.6	68.04
Lignina	30.24	30.44
Celulosa	37.36	37.6
Hemicelulosa	7.46	7.51

Valores calculados en Base seca

Tabla 9. Composición mineral de cotiledón y tegumento de Lupino (*L. mutabilis*).

Minerales	<i>Lupinus mutabilis</i>	
	Cotiledón	Tegumento
Calcio ₁	0.04	0.57
Fósforo ₁	1.24	0.14
Magnesio ₁	0.35	0.27
Potasio ₁	1.67	0.42
Azufre ₁	0.38	0.08
Cobre ₂	10	6
Manganeso ₂	38	12
Zinc ₂	34	8
Hierro ₂	58	46

1. Porcentaje p/p 2. mg / kg
Valores calculados en Base seca

5.1.2.2. Presencia de sustancias tóxicas

Se han identificado aproximadamente 150 estructuras de alcaloides quinolizidínicos diferentes cuya presencia varía de acuerdo a la especie y a las condiciones de crecimiento de la planta (Wink, 1991). En los análisis realizados al *L. mutabilis* se encontraron cinco alcaloides mayoritarios que conforman el 90 %

de la fracción total: la lupanina, la esparteína, la tetrahidrorombifolina, la 4-hidroxilupanina y la 13-hidroxilupanina (Anexo 1). A diferencia de lo reportado por Hatzold *et al.* (1983), para la especie, se encontró en el material analizado que después de la lupanina es la esparteína la sustancia de mayor presencia, seguida por los demás alcaloides (Tabla 10). Los cambios en la proporción de metabolitos ocurren en respuesta a las condiciones propias del ambiente como defensa frente a los enemigos naturales (Wink and Twardowski, 1992).

Tabla 10. Contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) del Lupino (*L. mutabilis*)

Alcaloide	Tiempo Retención (min)	Concentración (mg AT gMS ⁻¹)
Esparteína	7.782	12.90±0.57
NI	10.309	0.20±0.01
NI	13.149	0.28±0.02
NI	13.657	0.22±0.00
Tetrahidrorombifolina	13.863	3.91±0.04
NI	14.328	0.06±0.00
NI	14.557	0.10±0.00
NI	14.853	0.05±0.00
Lupanina	15.536	26.55±0.39
4-hidroxilupanina	17.469	1.53±0.08
13-hidroxilupanina	21.379	1.01±0.09
Valores totales		46.81±1.79

5.1.3. Propiedades fisicoquímicas

5.1.3.1. Hidratación

La semilla de *L. mutabilis* está compuesta en 88.97% por los cotiledones y un 11.03 % por el tegumento. Tiene un contenido de humedad de 9.63% (Base parcialmente seca BPS) y 24 h después de sumergida en agua alcanza 64.32%, estado en el cual los cotiledones representan el 90.66% y el tegumento 9.34%. En estado parcialmente seco (9.67% BPS), los cotiledones presentan una estructura rígida. Al ser hidratados hasta 55% de humedad se tornan elásticos y en completa

hidratación (65%) el fenómeno de turgencia hace que se vuelvan quebradizos y sensibles a los esfuerzos mecánicos (Figura 1).

El tegumento seco es de color blanco, duro e impermeable con un 10.79% de humedad. En hidratación completa alcanza una humedad de 40.65% tornándose transparente y volviendo a su estado inicial al deshidratarse. Al estar húmedo su impermeabilidad disminuye permitiendo la hidratación de los cotiledones.

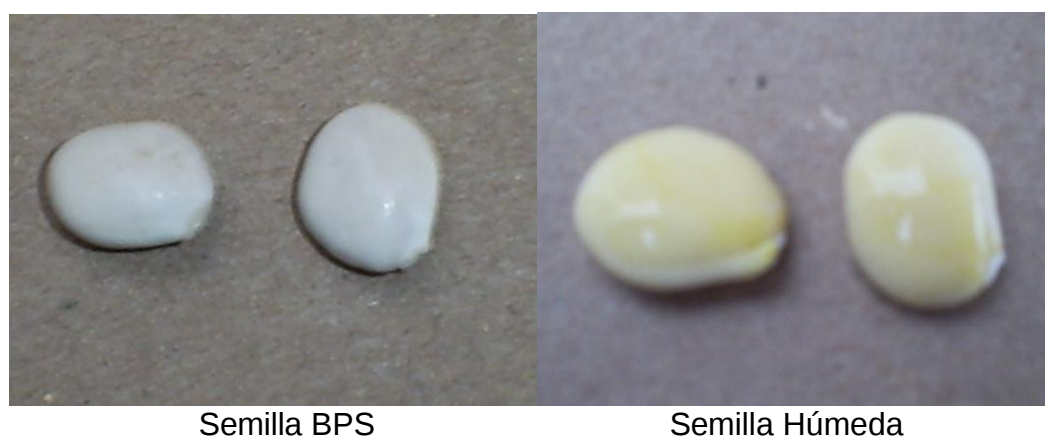


Fig. 1. Semilla parcialmente seca y completamente húmeda

5.1.3.2. Proceso de hidratación de semillas y cotiledones.

El incremento de la humedad fue más rápido en cotiledones que en las semillas enteras debido al tegumento que retrasa la absorción de agua (Figura 2). La hidratación de la semilla se inicia con un periodo de baja absorción observándose la aparición de rugosidades sobre el tegumento a las 6 h. Después de 8 h las semillas comienzan a ganar agua a una tasa constante, hasta que a las 18 h la semilla ganó 1.80 g de agua por cada gramo de materia seca. El valor de 64.32% de humedad fue constante y se le consideró como el límite máximo de hidratación que puede alcanzar la semilla. La hidratación de los cotiledones es más rápida y después de 6 h ya han absorbido 1.88 g H_2O g MS^{-1} . Esto equivale a una humedad de 65.32% considerado como máxima hidratación de los cotiledones.

5.1.3.3. Relación entre hidratación y tamaño de semillas.

El agua absorbida es almacenada en la estructura porosa de las semillas en los espacios de las paredes celulares, provocando un aumento en el volumen total y cambios en tamaño y estructura de las semillas. Para lograr las humedades de 40, 50 y 60%, se adicionó agua destilada ocasionando un incremento en las dimensiones ortogonales, diámetro y volumen de la semilla (Figura 3).

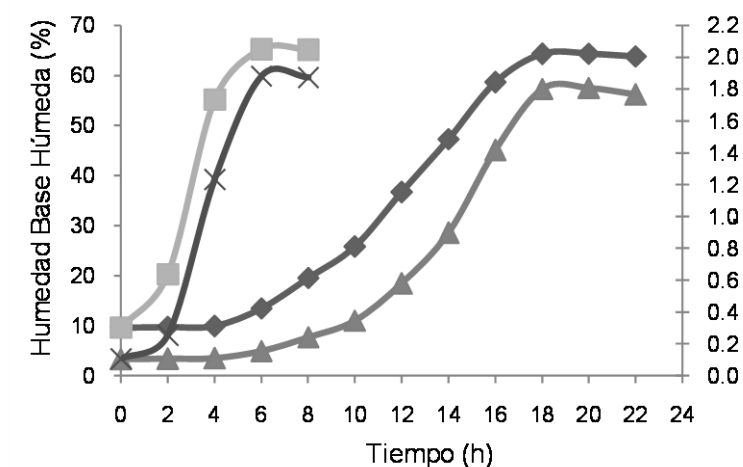


Fig. 2. Cinética de absorción de agua de semillas y cotiledones de *L. mutabilis*



A. Semillas BPS. B. Humedad 40%. C. Humedad 50%. D. Humedad 60%.

Fig. 3. Tamaño de la semilla en diferentes valores de hidratación

Una semilla cuyo diámetro promedio en base parcialmente seca es de 7.53 mm incrementa su diámetro en 15.26% cuando la humedad llega 40%, y en 23.04 y 24.93% cuando es de 50 y 60%, respectivamente. De igual manera, se observa un incremento de 34.18% en el volumen para semillas con 40% de humedad, y de 60.28 y 72.09% en semillas con 50 y 60% respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Incremento en el diámetro y el volumen de la semilla de Lupino (*L. mutabilis*)

Humedad (%)	Agua presente en Semilla (g agua g SS ⁻¹)	Dimensiones Promedio (mm)	Diámetro (mm)	Volumen (cm ³)
BPS (9.63 %)	0.1065	Long = 10.11 Prof = 8.12 Alt = 5.24	7.5320	0.3481
40	0.5601*	Long = 12.13 Prof = 10.00 Alt = 5.42	8.6811	0.4671
50	0.8935 *	Long = 13.14 Prof = 10.66 Alt = 5.70	9.2671	0.5580
60	1.3935 *	Long = 13.22 Prof = 10.73 Alt = 5.90	9.4117	0.5991

* Cantidad de agua adicional que se debe agregar a la semilla.

5.1.3.4. Relación entre la humedad y el pH

El pH de las semillas de lupino es ácido variando entre 5.6 y 5.8 y está relacionado con el contenido de agua en el grano. Los valores promediados de pH medidos en semillas con humedades de 40, 50 y 60% fueron de 5.67, 5.72 y 5.79 respectivamente. Este comportamiento se debe al contenido de proteínas que amortigua los cambios de pH. La variación de la humedad en los intervalos estudiados no provoca cambios considerables en esta propiedad.

5.2. INFLUENCIA DEL pH

5.2.1. Crecimiento del microorganismo

El análisis se hace en base al área del plato por ser un factor limitante del crecimiento (Figura 4). El diámetro del plato tiene 90 mm y un área de 63.61 cm².

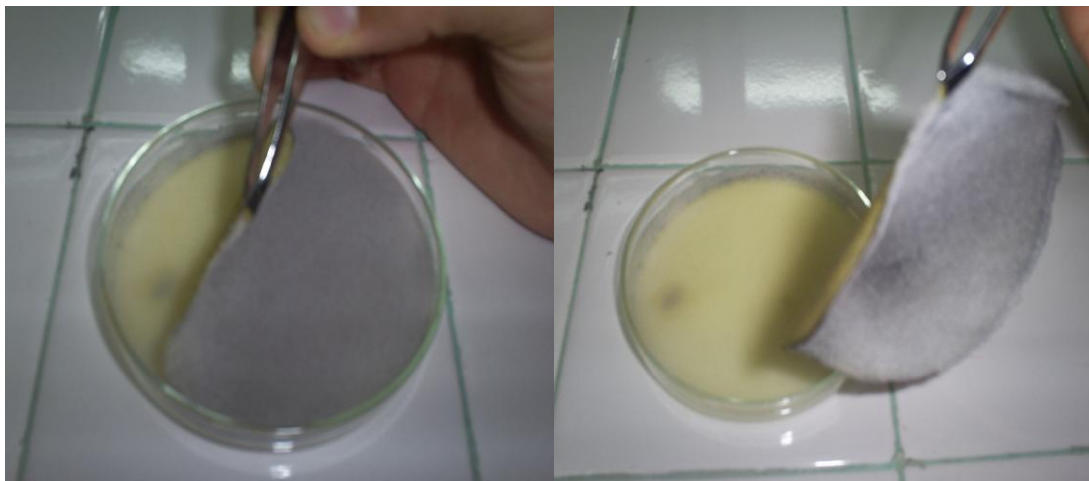


Fig. 4. Extracción de la biomasa fúngica de la superficie del agar

Se observaron diferencias en la cantidad de biomasa, la velocidad de crecimiento, el pH y en el tiempo de las fases de desarrollo. El crecimiento fue mayor para el agar lupino con pH de 5.5 (AL 5.5), con una cantidad de biomasa seca de 68.75 mg BS plato⁻¹ en 48 h. Este fue mayor que el registrado para el pH de 3.5 (AL 3.5) que tuvo un valor de 59.10 mg BS plato⁻¹. El valor en el agar PDA que fue de 53.10 mg BS plato⁻¹, ubicado por debajo de los agares con lupino. En AL 3.5 se observó un 11.29 % más de biomasa que en el agar PDA. Un 29.38 % más de crecimiento se observó en AL 5.5 respecto al agar PDA (Figura 5).

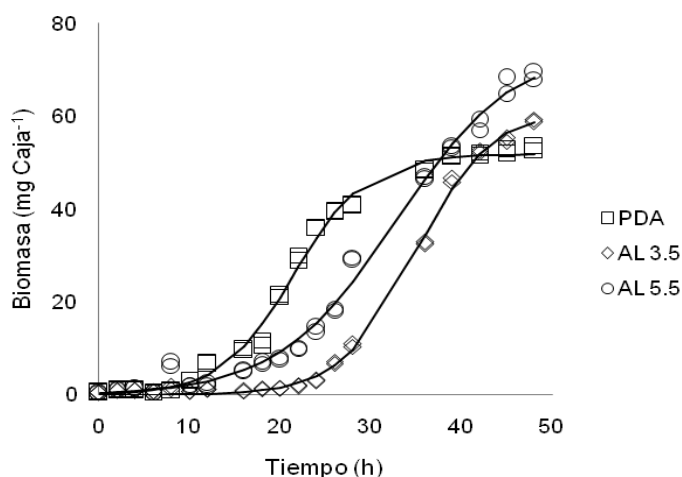


Fig. 5. Cantidad de biomasa por área de *R. oligosporus* en PDA y agar lupino a pH de 3.5 y 5.5.

El crecimiento del microorganismo fue mayor en los tratamientos de agar lupino, posiblemente debido a la mayor biodisponibilidad de nutrientes. En los medios estudiados no se observó inhibición causada por la presencia de los alcaloides. Entre los tratamientos se observó un 16.25 % más para AL 5.5, de lo que se concluye que el pH en el tiempo tiene incidencia en el hongo (Tabla 12). Los resultados son consecuentes con los estudios de Sparringa *et al.*, (2002), donde se concluyó que el pH está directamente relacionado con el crecimiento. A un pH de 5.8 hay mayor crecimiento y disminuye cuando el pH baja. Los resultados son aplicables al lupino cuya composición demostró ser óptima para el hongo.

Se determinó diferencias significativas en la tasa de crecimiento registrada en las 48 h de fermentación. La tasa de crecimiento en PDA fue de $5.07 \text{ mg BS h}^{-1}$. La máxima tasa de crecimiento para el AL 5.5 fue de $5.45 \text{ mg BS h}^{-1}$, 7.44 % por encima de la registrada para el PDA (Figura 6). Para el AL 3.5 fue $4.51 \text{ mg BS h}^{-1}$, 12.85 % menor que para el PDA. Entre los agares lupino se observa una diferencia del 21.2% más de velocidad de crecimiento para el agar con pH 5.5. Aparentemente el catabolismo de los nutrientes del agar lupino requiere de mayor tiempo a medida en que disminuye el pH del medio.

El tiempo en que se alcanzó la máxima velocidad de crecimiento fue diferente para los tratamientos. Mientras que para el PDA se alcanzó a las 20 h de fermentación, para el AL 5.5 se alcanzó a las 28 h. Se observó un crecimiento más lento para el tratamiento del AL 5.5 con respecto al PDA, que pudo deberse a los nutrientes de más difícil aprovechamiento para el microorganismo. Para el AL 3.5 se alcanzó hasta las 39 h, aparentemente el hongo experimentó dificultades de adaptación que retrasaron el consumo de nutrientes debido al pH. Esto se ha observado en experimentos con *Rhizopus* en los que se ha visto crecimientos lentos en medios con pHs bajos (Ikasari y Mitchell, 1996).

Tabla 12. Cantidad de materia seca consumida y de biomasa seca por unidad de área.

Tiempo (h)	Agar PDA		Agar Lupino 3.5		Agar Lupino 5.5	
	MSC _b (mg Plato ⁻¹)	BS A ⁻¹ _c (mg Plato ⁻¹)	MSC _b (mg Plato ⁻¹)	BS A ⁻¹ _c (mg Plato ⁻¹)	MSC _b (mg Plato ⁻¹)	BS A ⁻¹ _c (mg Plato ⁻¹)
0	0	0.57±0.11	0	0.55±0.07	0	0.55±0.07
2	1.62±0.18	1.10±0.14	5.45±0.54	1.01±0.07	2.15±0.22	1.05±0.07
4	1.39±0.23	1.01±0.14	3.28±0.34	0.95±0.07	3.56±0.23	1.55±0.21
6	3.55±0.37	0.55±0.07	1.22±0.12	0.75±0.07	3.90±0.38	0.50±0.05
8	7.30±0.66	1.00±0.09	4.62±0.26	1.55±0.35	5.56±0.12	6.70±0.56
10	13.37±0.90	3.15±0.21	1.09±0.06	0.75±0.08	11.31±0.52	2.05±0.21
12	18.20±0.67	6.95±0.35	7.61±0.64	1.20±0.14	20.42±1.55	2.35±0.21
16	30.70±2.92	9.95±0.35	2.31±0.21	0.90±0.08	28.67±2.51	5.15±0.21
18 _a	37.70±3.69	11.20±0.84	3.86±0.26	1.40±0.14	54.39±2.82	6.95±0.21
20 _a	51.62±4.28	21.35±0.21	10.37±0.80	1.45±0.08	65.17±2.44	7.90±0.28
22 _a	55.20±3.69	29.45±0.91	13.82±1.20	2.05±0.21	69.78±2.49	10.10±0.14
24 _a	62.10±1.69	35.95±0.07	30.12±0.38	3.10±0.14	74.02±5.18	14.10±0.84
26 _a	74.05±2.74	39.45±0.21	25.29±0.64	7.00±0.28	79.34±4.02	18.45±0.35
28 _a	79.12±1.75	40.85±0.21	59.13±5.14	10.70±0.42	90.35±3.46	29.35±0.35
36	89.06±3.75	48.45±0.07	99.73±7.30	32.75±0.35	101.27±2.19	46.70±0.28
39	95.02±4.72	51.30±0.14	105.60±6.07	46.30±0.56	110.27±1.93	53.25±0.35
42	96.71±0.94	51.90±0.56	112.67±7.81	52.50±0.28	113.54±3.96	58.20±1.55
45	102.99±0.21	52.35±0.63	114.01±6.69	55.00±0.56	115.79±2.52	66.55±2.61
48	106.37±3.66	53.10±0.56	116.68±10.34	59.10±0.42	128.45±0.74	68.75±1.06

a. Para el tratamiento agar lupino 3.5 estos puntos se tomaron en las 20, 22, 24, 26, 28 y 30 h.

b. Materia seca consumida

c. Biomasa seca por Área

Se observó que las fases de latencia, exponencial y estacionaria varían en los tres tratamientos. La fase de latencia en PDA no supera las 10 h de siembra, tiempo en el cual se observó la aparición del primer micelio. En AL 5.5 se observó este fenómeno a las 12 h y varió para el AL 3.5 después de 24 h. Los estudios muestran que el pH ácido favorece la germinación (Medwin y Grant, 1984), sugiriendo que se presentó dificultades en el consumo de nutrientes.

Para calcular la tasa de crecimiento específico (μ) se realizó un ajuste con la ecuación exponencial ($X=X_0 \cdot e^{\mu t}$), mediante el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo un R^2 de 0.9596, 0.9876 y 0.9585 para los tratamientos en PDA y los agares lupino 3.5 y 5.5 respectivamente. La duración de toda la fase de crecimiento exponencial en PDA fue de 12 h y tuvo una tasa de crecimiento específico (μ) de 0.1892 h^{-1} . En AL 5.5 esta fase tuvo una duración de 16 h con una μ de 0.1490 h^{-1} . Para el AL 3.5 fue de 17 h y se calculó una μ de 0.1688 h^{-1} . El crecimiento se facilita en el PDA y aunque la adaptación en AL 3.5 requiere mayor tiempo, el crecimiento se realizó a una tasa mayor que para el AL 5.5. La ecuación logística fue también usada pero la correlación fue menor siendo de 0.947, 0.715 y 0.926 para PDA y agar lupino 3.5 y 5.5 respectivamente.

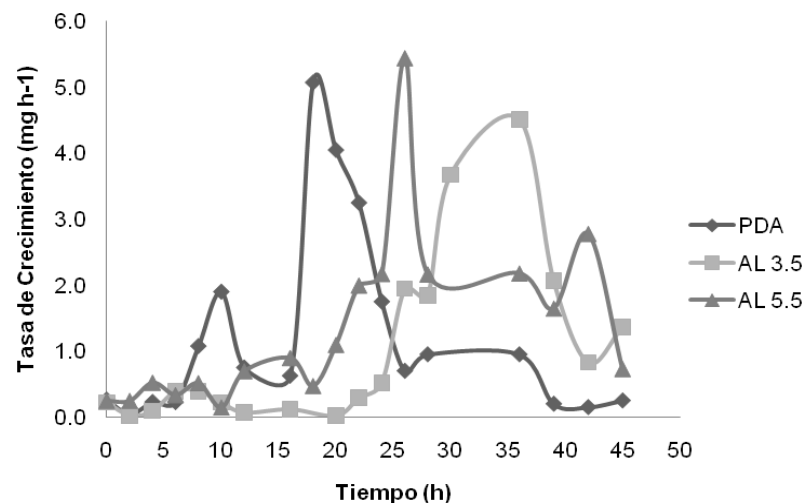


Fig. 6. Velocidad de crecimiento del *R. oligosporus* en PDA y agar lupino a pH de 3.5 y 5.5.

Una fase estacionaria se observó en el agar PDA al final de la fermentación que duró 6 h. Para el AL 5.5 la biomasa sigue incrementándose aunque a una velocidad menor, observándose una tendencia de desaceleración en las 3 h finales del proceso. Para el AL 3.5 se observó un crecimiento en la misma tendencia de AL 5.5 pero en tiempo posterior (Figura 6). En la gráfica de velocidad (Figura 6) también se puede observar para el AL 5.5 un punto de baja velocidad a las 40 h y un posterior incremento, sugiriendo una tendencia de metabolismo diáuxico también reportada por Santana *et al.*, (2002). De acuerdo a Nout and Kiers (2005), el hongo prefiere los ácidos grasos como fuente de carbono. Teóricamente en los medios hubo 11.99 ± 0.68 % de grasas, 38.38 ± 2.17 % de proteínas, 21.12 ± 1.9 % de carbohidratos entre otros nutrientes que el hongo pudo consumir simultáneamente y que provocó este comportamiento. Esta tendencia se observa en las últimas tres h para el AL 3.5 por lo cual es probable que continúe.

Para los tres experimentos en las 48 h no se observó signos de muerte tales como oscurecimiento o aplastamiento. La reducción del crecimiento se debió probablemente a la producción de amoníaco aunque la cantidad no fue suficiente para matar al microorganismo. La esporulación está relacionada con la madurez y el estrés experimentado por el microorganismo. Después de que el hongo ha invadido el sustrato comienza a ser visible la producción de esporas, lo que se presentó a las 36 horas en AL 5.5 y PDA. En estos medios fue donde la esporulación se presentó más rápido, mientras que en AL 3.5 se observó hasta las 39 h. Se puede concluir que la esporulación es un fenómeno que no está relacionado con alguna característica propia del lupino. El incremento del pH provocó condiciones desfavorables y la esporulación podría ser la respuesta a tales condiciones.

Las diferencias observadas en la cantidad de biomasa, las fases de crecimiento y la magnitud, permite concluir sobre el impacto que el pH tuvo para el *Rhizopus*. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el medio con pH 5.5 favoreció su crecimiento (Anexo 2).

5.2.2. Degradación de alcaloides

Aunque observó degradación de los alcaloides en ambos tratamientos, se presentaron diferencias significativas en la cantidad de alcaloides, tiempo y perfil.

La concentración de alcaloides (A) en AL 3.5 se incrementó pasando de 26.75 ± 1.07 mg A g MS⁻¹ a 28.33 ± 0.80 mg A g MS⁻¹. La cantidad de alcaloides totales (AT) en 10 g de materia seca de agar fermentado (MSF) se calculó multiplicando la concentración de alcaloides por la cantidad de materia seca presente en cada plato en el tiempo de muestreo (Tabla 13). Se calculó una reducción en la cantidad de alcaloides desde 14.740 ± 0.583 mg AT hasta 12.297 ± 0.351 mg AT plato⁻¹, lo que significa que se logró una detoxificación del 16.58 %. Un comportamiento diferente se apreció en el AL 5.5, en el cual se observó una notable reducción en la concentración pasando de 24.90 ± 1.34 mg A g MS⁻¹ a 11.72 ± 0.76 mg A g MS⁻¹. Por tanto el AL 5.5 pasó de tener 14.547 ± 0.785 mg AT a 5.348 ± 0.348 mg AT plato⁻¹ logrando una reducción de 10.102 mg equivalente a una detoxificación del 63.23 %.

La velocidad de eliminación de alcaloides fue mayor para el AL 5.5. Para éste la máxima velocidad se dio entre las 16 a 20 h a una tasa de 1.12 mg AT h⁻¹ plato⁻¹. En el AL 3.5 la máxima velocidad fue de 0.18 mg AT h⁻¹ plato⁻¹ y se dio en el intervalo de las 26 a 30 h. Las máximas tasas de degradación suceden para ambos tratamientos en la etapa inicial del crecimiento exponencial. (Anexo 3 a).

El perfil de los alcaloides eliminados presentó diferencias significativas para ambos tratamientos. La lupanina (LUP) se degradó hasta un 70.82 % en el AL 5.5, pasando de 10.174 ± 0.774 a 2.998 ± 0.275 mg LUP plato⁻¹. En el AL 3.5 la reducción de la lupanina fue menor pasando de 10.543 ± 0.765 a 8.807 ± 0.352 mg LUP plato⁻¹ lo que constituye una reducción de 16.46 %. Una reducción similar presentó la esparteína (ESP) en AL 5.5 que se redujo en un 62.32 % pasando desde 2.427 ± 0.185 a 1.065 ± 0.098 mg ESP plato⁻¹. La reducción fue menor en AL 3.5 la cual fue desde 2.683 ± 0.152 hasta 1.992 ± 0.080 mg ESP plato⁻¹, equivalente

a una eliminación de 25.75 %. La tetrahidrorombifolina (THR) no conservó la tendencia anterior ya que se degradó igualmente en ambos tratamientos. Para AL 5.5 el contenido pasó de 1.003 ± 0.076 a 0.525 ± 0.048 mg THR plato⁻¹ y para el AL 3.5 disminuyó desde 1.148 ± 0.065 hasta 0.687 ± 0.027 mg THR plato⁻¹. Esto equivale a una reducción de 47.61 y 40.12 % para los tratamientos de pH 5.5 y 3.5 respectivamente (Tabla 14).

Tabla 13. Contenido de alcaloides totales en agar lupino en pH 3.5 y 5.5 durante las 48 h de fermentación con *R. oligosporus*.

Agar Lupino pH 3.5						
Tiempo (h)	Materia Seca Agar (g MS Plato ⁻¹)	Concentración Alcaloides (mg A g MS ⁻¹)	Alcaloides Totales (mg A Plato ⁻¹)	Reducción Alcaloides Totales (%)	Tasa Reducción (mg.h ⁻¹ Plato ⁻¹)	pH
0	0.550	28.04±0.74	15.44±0.41	0		3.52±0.02
12	0.558	28.21±1.44	15.74±0.80	0.84	0.084	3.50±0.07
16	0.553	26.28±0.43	14.53±0.24	1.37	0.302	3.48±0.03
22	0.540	26.86±0.67	14.51±0.37	1.54	0.004	3.50±0.07
26	0.520	27.51±0.66	14.32±0.35	3.34	0.066	3.71±0.02
30	0.491	27.44±0.54	13.48±0.27	8.44	0.187	4.12±0.03
36	0.450	28.04±0.10	12.63±0.04	14.18	0.141	4.73±0.09
42	0.438	28.42±0.58	12.45±0.25	13.24	0.023	5.39±0.03
48	0.434	28.33±0.80	12.29±0.35	16.57	0.081	7.04±0.05
Agar Lupino pH 5.5						
0	0.584	24.90±1.69	14.54±0.98	0		5.51±0.02
12	0.564	25.60±1.00	14.44±0.56	0.72	0.008	5.49±0.01
16	0.556	24.78±2.57	13.78±1.43	5.25	0.165	5.42±0.02
20	0.519	17.91±0.61	9.29±0.31	36.07	1.120	5.54±0.04
24	0.510	17.48±1.40	8.91±0.71	38.69	0.095	6.59±0.05
28	0.494	16.16±2.12	7.98±1.04	45.11	0.233	6.68±0.01
36	0.483	14.54±0.90	7.02±0.43	51.69	0.119	6.76±0.03
42	0.471	13.96±0.58	6.57±0.27	54.79	0.075	6.85±0.01
48	0.456	11.72±0.37	5.34±0.16	63.23	0.204	7.15±0.09

Los alcaloides minoritarios son aquellos no identificados con la información disponible de espectros. Aquí están alcaloides derivados de los mayoritarios tales como la iso o hidroxilupanina y/o esparteína. La cantidad de estos disminuyó en el AL 3.5 pasando de 1.005 ± 0.099 a 0.810 ± 0.052 mg plato⁻¹. Para el AL 5.5 el contenido se redujo desde 0.942 ± 0.049 hasta 0.759 ± 0.057 mg plato⁻¹. Al igual que en la THR la degradación fue similar entre tratamientos de pH 3.5 y 5.5 con 19.40

y 19.45 % respectivamente. Pese a la reducción, entre las 16 y 24 h se observó un incremento en estos alcaloides principalmente en el AL 5.5. Esto podría deberse a reacciones intermedias de la degradación de los alcaloides principales similar a lo reportado por Hopper *et al.*, (1991) (Anexo 3 b).

Los ensayos no alcanzaron la reducción reportada por Jiménez *et al.*, (2007), donde se obtuvo una disminución en la concentración del 90 %. Diferencias tecnológicas independientes del pH existieron entre experimentos. La de mayor importancia fue que el hongo se sometió medios cuyos nutrientes estaban solubilizados haciéndolos más aprovechables. Sin la existencia de un metabolismo selectivo para los alcaloides, estos pasarían a formar parte de un banco común de sustancias que puede consumirse indiscriminadamente.

La descripción matemática del fenómeno de detoxificación se realizó con el uso de varias ecuaciones que relacionan las variables relacionadas en el proceso. La más simple de estas es una ecuación exponencial transformada $dD/dt = -\mu_D D$ con su forma integrada $D = D_0 e^{-\mu_D t}$, para calcular μ_D en ambos tratamientos. Los valores calculados de μ_D fueron 0.0044 y 0.0181 h^{-1} para los agares lupino 3.5 y 5.5 y un R^2 de 0.88 y 0.86 respectivamente. Los valores de μ_D muestran que la detoxificación ocurre lentamente en AL 3.5 ya que los enzimas segregados no afectan los alcaloides. Pese a la sencillez de la ecuación los valores de R^2 revelan que ésta proporciona una aproximación aceptable al fenómeno.

En conclusión los resultados obtenidos muestran la influencia considerable del pH en la actividad metabólica del microorganismo. Esta condición cambia el perfil de enzimas producidas y su actividad, por lo que la detoxificación cambia.

Tabla 14. Contenido de alcaloides: lupanina, esparteína, tetrahidrorombifolina y otros minoritarios, en agar lupino en pH 3.5 y 5.5 durante 48 h de fermentación con *R. oligosporus*.

Eliminación Alcaloides (AL 3.5)					Eliminación Alcaloides (AL 5.5)				
Tiempo (h)	Cantidad (mg A. Plato ⁻¹)				Tiempo (h)	Cantidad (mg A. Plato ⁻¹)			
	LUP	ESP	THR	Otros		LUP	ESP	THR	Otros
0	10.54±0.42	2.68±0.15	1.14±0.06	1.00±0.09	0	10.17±0.77	2.42±0.18	1.00±0.07	0.94±0.04
12	10.59±0.76	3.00±0.21	1.14±0.08	1.00±0.09	12	10.35±0.46	2.42±0.11	0.81±0.03	0.85±0.05
16	10.49±0.24	2.36±0.05	1.06±0.02	0.61±0.02	16	9.40±1.12	2.25±0.26	0.87±0.10	1.25±0.06
22	9.92±0.35	2.32±0.08	1.01±0.03	1.25±0.06	20	5.50±0.50	1.75±0.16	0.89±0.08	1.14±0.05
26	10.03±0.64	2.49±0.16	0.86±0.05	0.93±0.07	24	5.36±0.60	1.68±0.19	0.74±0.08	1.12±0.00
30	9.85±0.50	2.39±0.12	0.55±0.02	0.68±0.07	28	4.89±0.90	1.58±0.29	0.73±0.13	0.76±0.01
36	9.24±0.06	2.18±0.01	0.65±0.00	0.54±0.09	36	4.41±0.38	1.35±0.11	0.58±0.05	0.66±0.02
42	8.98±0.44	2.48±0.12	0.54±0.02	0.43±0.09	42	3.84±0.22	1.32±0.07	0.48±0.02	0.92±0.00
48	8.80±0.35	1.99±0.08	0.68±0.02	0.81±0.05	48	2.99±0.27	1.06±0.09	0.52±0.04	0.75±0.05

5.2.3. Consumo de sólidos totales

Los análisis químicos realizados al Lupino demostraron que su composición es adecuada el crecimiento del hongo. Los experimentos se realizaron en medios con exceso de sólidos totales para garantizar provisión de todos los nutrientes.

El consumo de materia seca se determinó estableciendo la diferencia de peso seco entre el inicial y el retirado en cada tiempo. Se presentaron diferencias estadísticas significativas para la materia seca consumida, tasa de consumo y rendimiento, en relación al pH y al tiempo. El consumo en AL 3.5 fue de 116.68 ± 10.35 mg plato⁻¹ y para AL 5.5 fue de 128.45 ± 3.74 mg plato⁻¹ en 48 h. La fermentación de AL 5.5 presentó un 10.09 % más en el consumo de sólidos totales con respecto a AL 3.5. El consumo para PDA fue de 106.37 ± 3.66 mg plato⁻¹ (Tabla 12). Este valor menor del PDA frente a los tratamientos de agar lupino, pudo deberse al tipo de nutrientes y a la mayor disponibilidad de estos en el Lupino.

La tasa máxima de consumo de materia seca fue mayor para el AL 3.5 equivalente a 16.91 mg h⁻¹ plato⁻¹, frente a 12.86 mg h⁻¹ plato⁻¹ para el AL 5.5. El hongo consume más sustratos, principalmente proteínas, cuando el pH es menor. Esto se observa en la duración de la fase de crecimiento para este medio.

La relación entre el crecimiento y consumo de sólidos puede observarse en los rendimientos ($Y_{(x/MS)}$), biomasa seca producida (BS) por materia seca consumida (MSC). El rendimiento en AL 5.5 fue de 0.5352 mg BS g MSP⁻¹, el cual es 5.69 % mayor que el AL 3.5 que fue de 0.5064 mg BS g MSP⁻¹. El rendimiento en AL 5.5 fue mayor en un 7.32 % que el calculado para el PDA que fue de 0.4991 mg BS g MSP⁻¹. Las diferencias entre los agares lupino y el PDA se debieron a la mayor disponibilidad y calidad de nutrientes de los primeros (Anexo 2).

5.2.4. Cambios en el pH

Se observaron diferencias significativas en el valor del pH para los tres tratamientos a consecuencias de las diferencias en los medios.

El pH de ambos tratamientos de agar lupino varió a lo largo del proceso siendo imposible mantenerlo estable durante el experimento. El pH tuvo una tendencia a incrementarse con valores máximos de 7.13 y 7.34 para el agar lupino a 3.5 y 5.5 respectivamente después de 48 h de fermentación (Figura 7).

El incremento en el pH se debió a los productos de la proteólisis que sucede en materias primas con alto contenido de proteína. En la fabricación del tempeh de soya el principal producto de la proteólisis es el amoníaco que incrementa la basicidad (Sparringa y Owens, 1999). El pH se incrementa a una tasa mayor para AL 3.5 que para AL 5.5 lo que coincide con el mayor consumo de sólidos.

El tratamiento AL 3.5 permaneció cercano a ese valor hasta la hora 22 y tarda 20 h más en superar 7.0. El AL 5.5 comenzó a subir en la hora 16 en un pH de 5.5 y superó el 7.0 después de 26 h. Un valor bajo de pH incrementa el consumo de proteínas estimulando la producción de amoníaco. Por el contrario la fermentación en PDA ocurre con tendencia inversa. El PDA tiene un pH de 5.8, que desciende en la hora 12 y baja hasta 4.6 en la hora 24 manteniéndose así hasta el final. Se evidencia la producción de ácidos orgánicos que provocan la acidificación del medio. Este metabolismo sucede por la composición del PDA que posee un bajo contenido de proteínas.

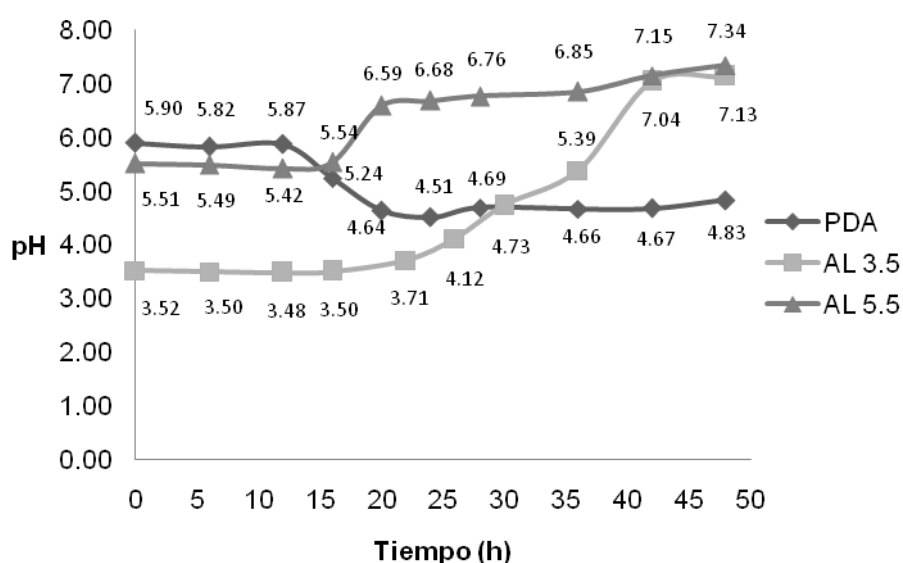


Fig. 7. Cinética de variación de pH en 48 h de fermentación con *R. oligosporus*.

5.2.5. Relación entre las características del medio y la degradación de alcaloides

5.2.5.1. Crecimiento y degradación

El micelio invadió la totalidad del AL 5.5 a las 16 h, tiempo en el cual se observó la mayor tasa de detoxificación. Se concluye que el crecimiento está relacionado con la detoxificación en este tratamiento. En el AL 3.5 se observó una tendencia similar aunque en menor magnitud. Sin embargo, no se observa relación entre los puntos de máxima degradación con el mayor crecimiento que se presentó las 39 y 28 h para pH 3.5 y 5.5 respectivamente.

Aunque el crecimiento presenta tendencias similares en ambos medios tiene un tiempo de ejecución y duración diferente que afecta la detoxificación (Figura 8). Los sistemas implicados en la degradación se desarrollan en la etapa inicial del crecimiento en donde el hongo segrega gran cantidad de enzimas para obtener nutrientes y energía. El tipo de sustancias consumidas dependen del pH lo cual explicaría las diferencias en la degradación entre ambos tratamientos.

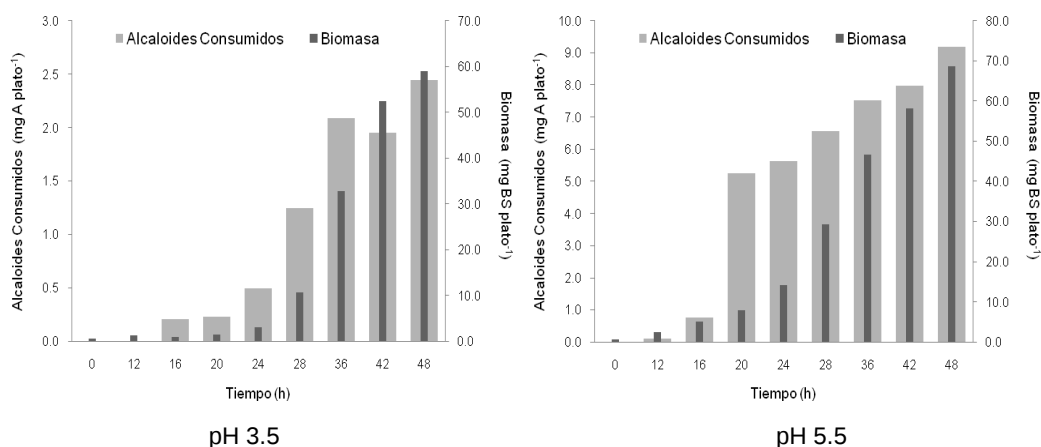


Fig. 8. Relación entre cantidad de biomasa de hongo y alcaloides consumidos en agar lupino 3.5 y 5.5.

Las enzimas responsables de la detoxificación están más activas dentro de las primeras 24 h. Miszkiewicz *et al.*, (2004) dividió la fermentación del *R. oligosporus* en varias etapas. Durante las primeras 24 h se producen lipasas, glucosidasas, manosidasas y galactosidasas, que están relacionadas con el metabolismo energético. A las hora 48 se detecta una mayor actividad de xilanasas, endoglucanasas, esterasas C4 y leucin arilamidasa, lipasa-esterasa

y valina arilamidasa. Durante todo el proceso en el sistema actúan enzimas tales como fosfatasa alcalina y ácida, además de naftol-AS-BI fosfohidrolasa. De lo anterior puede concluirse que en AL 5.5 las hidrolasas están involucradas en primera instancia en la degradación. Seguidamente el catabolismo para la obtención de energía permite aprovechar los átomos de carbono y nitrógeno de los alcaloides. En el tratamiento de pH 3.5 se observó un crecimiento que aunque similar al anterior no presentó la misma tasa de detoxificación. Aparentemente el metabolismo proteolítico en este tratamiento no tuvo la misma incidencia.

La cantidad de biomasa seca (BS) se relacionó con el contenido de alcaloides eliminados mediante la ecuación del rendimiento ($Y_{(x/D)}$). En el AL 5.5 fue necesario 6.42 mg BS para degradar 1 mg de alcaloides mientras que en AL 3.5 este fue de 16.00 mg BS mg A^{-1} . En AL 5.5, $Y_{(x/D)}$ fue menor que en AL 3.5, evidenciando que se requiere más biomasa para detoxificación en pH bajo.

Para describir matemáticamente la detoxificación en relación al crecimiento se utilizó la ecuación de definición del rendimiento ($Y_{(x/D)}$):

$$(X_2 - X_1) = Y_{(x/D)}(D_1 - D_2) \quad \text{Ec. (13)}$$

Donde X_2 = Cantidad de biomasa (mg B plato^{-1})
 X_1 = Cantidad de biomasa Inicial (mg B plato^{-1})
 $Y_{(x/D)}$ = Rendimiento cantidad de biomasa por alcaloides consumidos (mg B mg A^{-1})
 D_1 = Contenido inicial de alcaloides (mg A plato^{-1})
 D_2 = Contenido de alcaloides (mg A plato^{-1})

Los valores predichos por esta ecuación tienen un R^2 de 0.78 y 0.76 para los medios con pH 3.5 y 5.5. Los valores de correlación indican que la utilización de los rendimientos totales como coeficiente y el crecimiento en esta ecuación no presentan un buen nivel de acercamiento al proceso de fermentación para predecir la detoxificación. Sin embargo, la sencillez de la ecuación que relaciona dos variables que se incrementan inversamente, presenta una correlación aceptable que permite inferir que el crecimiento y la detoxificación están relacionados.

La ecuación de Luedeking-Piret (Ec. 5) también se utilizó para describir la detoxificación en relación al crecimiento (Soto-Cruz, *et al.*, 2002). Para el AL

3.5 se logró un ajuste con un R^2 de 0.82 y valores de α de 0.1263 y β de -0.0053. Para el AL 5.5 se obtuvo un α de 0.3418, β de -0.0152 y un R^2 de 0.80. Ambos valores de α indican que la detoxificación está relacionada con la etapa de crecimiento, lo que confirma las observaciones realizadas sobre los datos obtenidos. El mayor valor para α en el AL 5.5 indica una mayor incidencia en la detoxificación derivada de las diferencias en el crecimiento. La fase de crecimiento en pH 5.5 pese a que se realizó más lentamente duró más tiempo, circunstancia que pudo contribuir a la detoxificación. Por el contrario para el AL 3.5 la fase Lag duró mayor tiempo y posteriormente creció a mayor velocidad lo cual incidió poco en la detoxificación. Los valores negativos de β indican la baja incidencia de la fase estacionaria. La interpretación de los valores del modelo de Luedeking-Piret permite llegar a conclusiones las cuales ya se había llegado por el análisis de los datos experimentales. (Anexo 4).

5.2.5.2. Consumo de sólidos y degradación

El consumo de materia seca se realizó en tiempos diferentes entre los tratamientos evidenciando las variaciones causadas por el pH inicial (Figura 9). Las tasas máximas de consumo de materia seca se dan a las 16 y 28 h en los tratamientos con pH 5.5 y 3.5 respectivamente, las cuales coinciden con los valores máximos de consumo de alcaloides. Se podría inferir que las reacciones de degradación estarían dentro de las de consumo de nutrientes y evidentemente su actividad de detoxificación fue mayor a pH de 5.5. Probablemente los alcaloides fueron utilizados para la obtención de energía y la síntesis de compuestos.

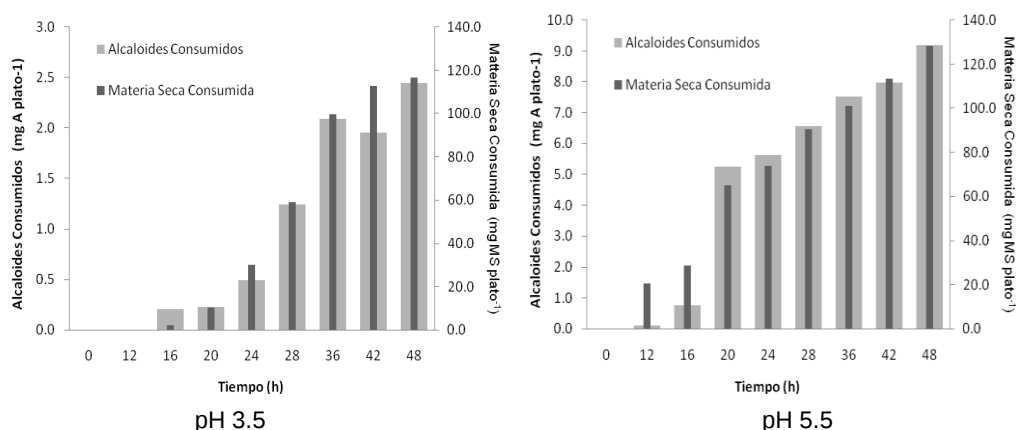


Fig. 9. Relación entre cantidad de materia seca y alcaloides consumidos en agar lupino 3.5 y 5.5.

Con los valores de alcaloides totales degradados y materia seca consumida se calculó el rendimiento $Y_{(D/MS)}$ obteniéndose valores de 0.0276 y 0.0718 mg A mg MS^{-1} para 3.5 y 5.5 respectivamente. La ecuación de rendimiento se tomó para calcular D_2 y establecer la correlación con los valores experimentales:

$$(D_1 - D_2) = Y_{(D/MS)}(MS_1 - MS_2) \quad \text{Ec. (14)}$$

Donde MS_2 = Contenido de material seca (mg MS plato⁻¹)
 MS_1 = Contenido inicial de material seca (mg MS plato⁻¹)
 $Y_{(D/MS)}$ = Alcaloides consumidos por material seca consumida (mg A mg MS^{-1})
 D_1 = Contenido inicial de alcaloides (mg A plato⁻¹)
 D_2 = Contenido de alcaloides (mg A plato⁻¹)

Esta ecuación presentó altos niveles de correlación para ambos tratamientos, en AL 3.5 el R^2 fue de 0.93 y para AL 5.5 el R^2 fue de 0.97. El valor de $Y_{(D/MS)}$ relaciona bien ambas magnitudes y permite observar que pese a que el consumo de sólidos es alto para ambos tratamientos, la detoxificación es menor en el AL 3.5. Se puede concluir que el consumo de materia seca tiene más relación con la detoxificación y por tanto es un parámetro de mayor precisión para describir este fenómeno (Anexo 4).

5.2.5.3. El pH y la degradación

El principal incremento en el pH del AL 5.5 se observó entre las 16 a 20 h, tiempo que coincide con la mayor detoxificación y consumo de sólidos. Las reacciones enzimáticas de la detoxificación se desarrollan a un pH de 5.5 lo que demuestra las diferencias bioquímicas con AL 3.5. Aparte de la reacción inicial de hidroxilación de la lupanina, no se ha identificado rutas metabólicas específicas para la degradación de alcaloides. Probablemente la degradación haga parte del catabolismo de otros compuestos, importantes en el inicio del crecimiento para la obtención de energía y la formación de biomasa. Wang y Hesseltine (1965), identificaron picos de actividad a pHs de 3.0 y 5.5, de lo cual podría inferirse que las enzimas en pH 5.5 podrían relacionarse ya que se requieren sustancias necesarias para el crecimiento. El metabolismo eminentemente proteolítico del pH 3.5 parece no tener mayor incidencia en la detoxificación.

La glucoamilasa α -1,4-glucano glucohidroxilasa es una enzima alimentaria producida por el *Rhizopus* (Manjunath *et al.*, 1983). Esta estaría relacionada con la hidroxilación de la lupanina nombrada por Toczko *et al.*, (1963) y explicaría la menor degradación de la esparteína por la especificidad de la reacción (Hopper *et al.*, 1991). En segunda instancia se produce glucoamilasas que podrían intervenir en la reacción (Sukara y Doelle, 1989) y actúan en pHs que están alrededor del valor de óptimo crecimiento del hongo. Las lipasas podrían estar involucradas en la biodegradación de los alcaloides. Estas enzimas se producen en pH cercanos a 5.5 (Nahas, 1988), lo cual podría explicar los niveles de detoxificación logrados en el tratamiento de pH 5.5.

5.3. LA HUMEDAD Y EL TAMAÑO DE PARTÍCULA CON AIREACIÓN ESTÁTICA

5.3.1. Descripción del medio de fermentación

Se observó que las variaciones en la humedad y el tamaño de partícula cambiaron las condiciones del medio afectando el crecimiento y la detoxificación (Tabla 15). El lecho tuvo un diámetro de 4.3 centímetros y con una altura que cambió de acuerdo al tratamiento. Se observaron cambios en la densidad debidos a la altura del lecho, la cantidad de masa y el tamaño de partícula, aunque la materia seca inicial fue constante en los tratamientos. Por tanto se puede concluir que el material quebrantado presentó mejores condiciones físicas de área para el crecimiento.

5.3.2. Crecimiento observado

Se presentaron diferencias visibles en el crecimiento debidas a las variaciones entre tratamientos para el medio H-40 y los medios H-50 y H-60. En H-40 el desarrollo del hongo fue escaso en las primeras 24 h, aunque hubo micelio al interior del lecho que provocó compactación. Hasta las 48 h se observó el medio completamente cubierto de micelio (Figura 10). El escaso micelio se debió a que el agua no fue suficiente para sustentar el desarrollo del hongo aunque la actividad acuosa fue de 0.96 ± 0.001 . Se observó oscurecimiento y la formación de textura elástica debido al calentamiento. Además se observó

aplastamiento del micelio al final del proceso, lo que puede interpretarse como un signo de muerte. La esporulación fue escasa y se hizo visible después de las 40 h. Pese a la baja humedad el crecimiento incrementó el pH por la proteólisis y reducción de materia seca por la producción de CO₂.

Tabla 15. Características iniciales del lecho de fermentación

Tratamiento	Material Húmedo Inicial (g)	Volumen Total Lecho (cm ³)	Altura (cm)	Densidad d Lecho (g/cm ³)	Humedad Inicial (%)	a _w Inicial
H-40 E	36.26±0.37	71.15	4.9	0.50	42.41±0.13	0.96
H-50 E	44.44±0.01	82.77	5.7	0.53	54.86±0.24	0.98
H-60 E	56.55±2.27	95.84	6.6	0.59	64.57±0.30	0.99
H-40 Q	36.30±0.24	76.96	5.3	0.47	44.66±0.10	0.96
H-50 Q	43.74±2.71	88.58	6.1	0.49	54.99±0.82	0.98
H-60 Q	56.51±2.43	100.20	6.9	0.56	64.82±0.27	0.99

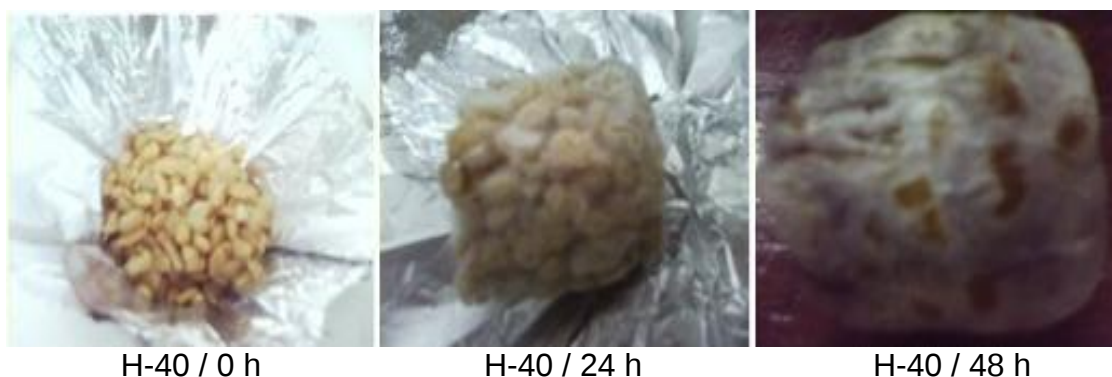


Fig. 10. Crecimiento del *R. oligosporus* en cotiledones enteros con 40% de humedad en 0, 24 y 48 h de fermentación

Entre H-50 y H-60 la cantidad del micelio no tuvo diferencias visibles la parte superior y longitudinal (Figura 11). En relación al tamaño de partícula tampoco se presentan diferencias visibles observándose un crecimiento uniforme en ambos tamaños. La complejidad del medio imposibilitó hacer mediciones del crecimiento aunque con lo observado se puede afirmar que se presentó un desarrollo adecuado en los tratamientos H-50 y H-60.

En el interior del lecho H-50 y H-60 se presentó un comportamiento similar al del exterior (Figura 12). Aunque en cotiledones enteros se observó uniformidad se observaron ligeras diferencias en los quebrantados, que pudieron deberse a la aglomeración. La tendencia a compactarse se presentó en el medio de

mayor humedad y partículas pequeñas. Pese a estas condiciones no se observó en H-50 y H-60 signos de crecimiento anormal.

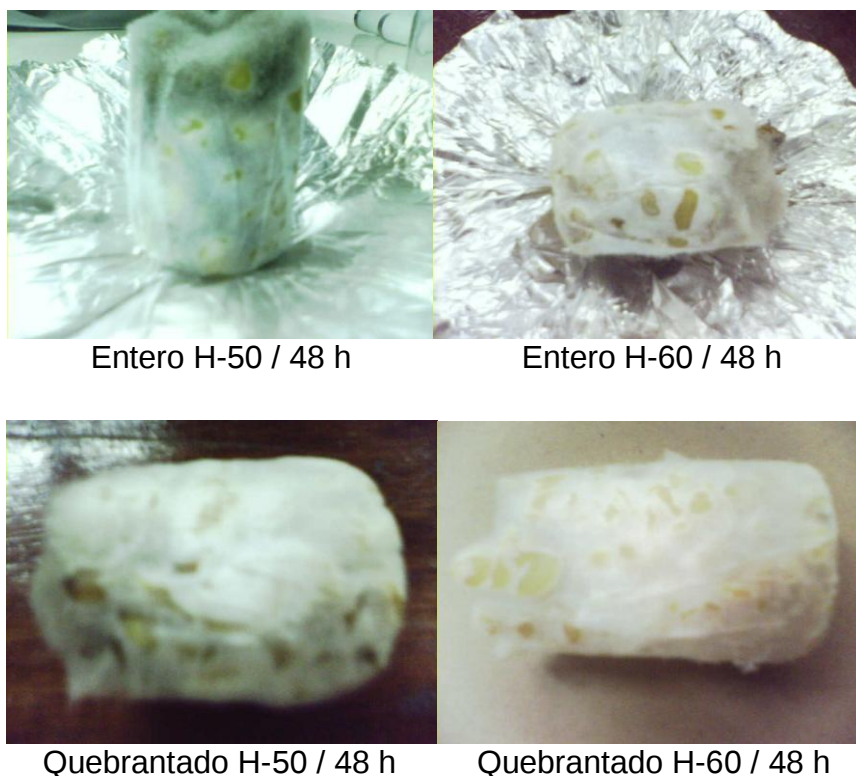


Fig. 11. Crecimiento del *R. oligosporus* en cotiledones enteros y quebrantados 50 y 60% de humedad en 48 h de fermentación.

La esporulación se presentó después de las 40 h de fermentación principalmente en la parte superior de los lechos (Figura 11). La cantidad de esporas visibles fue variable en relación a la humedad, observándose una mayor proporción en los medios H-50 que en los H-60 y muy poca en H-40. No se observaron diferencias en relación al tamaño de partícula.

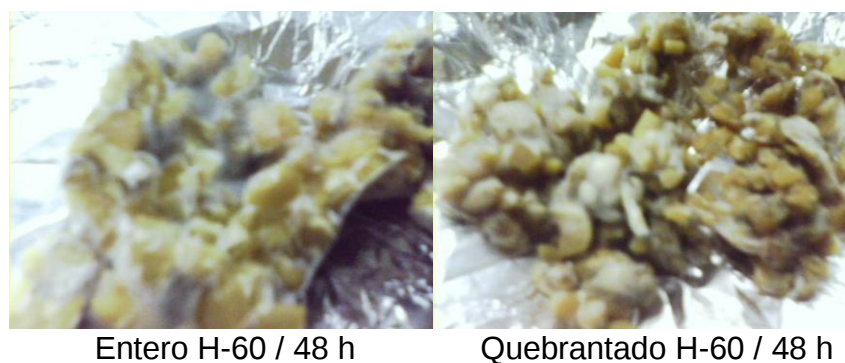


Fig. 12. Crecimiento del *R. oligosporus* en el lecho interno de cotiledones enteros y quebrantados con 60% de humedad en 48 h de fermentación.

5.3.3. Variación en el pH

La variación en el pH del medio es reflejo de la intensidad del proceso fermentativo (Figura 13). El incremento de pH en H-40 fue menor que el realizado en humedades superiores. Aparentemente la baja humedad inicial disponible y el tratamiento térmico, cambia las propiedades del material dificultando el crecimiento del hongo (Tabla 16). Hasta las 24 h de fermentación no hay diferencias considerables debido al escaso crecimiento. A partir de este punto se observó un incremento del pH siendo ligeramente mayor para la semilla quebrantada. Los cambios se observaron en las 36 y 48 h de fermentación llegando finalmente a un nivel de 6.6 en ambos tamaños.

Se presentó una mayor intensidad para H-60 y se notaron pequeñas diferencias con H-50. También se observaron diferencias entre los medios enteros y quebrantados siendo mayor para el segundo. La cinética de variación del pH es similar a la reportada por Han *et al.*, (1999) para el sistema de fermentación con lecho estático. El mayor tamaño de partícula disminuyó el área para el crecimiento, reduciendo la actividad metabólica. Estos valores son comparables a los de la elaboración de Tempeh reportados por Sparringa y Owens (1999a), lo cual demuestra que no hay inhibiciones por la presencia de los alcaloides. La alcalinización del medio se debe a la producción de amonio como consecuencia de la proteólisis. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en AL 5.5 demostrando su reproducibilidad.

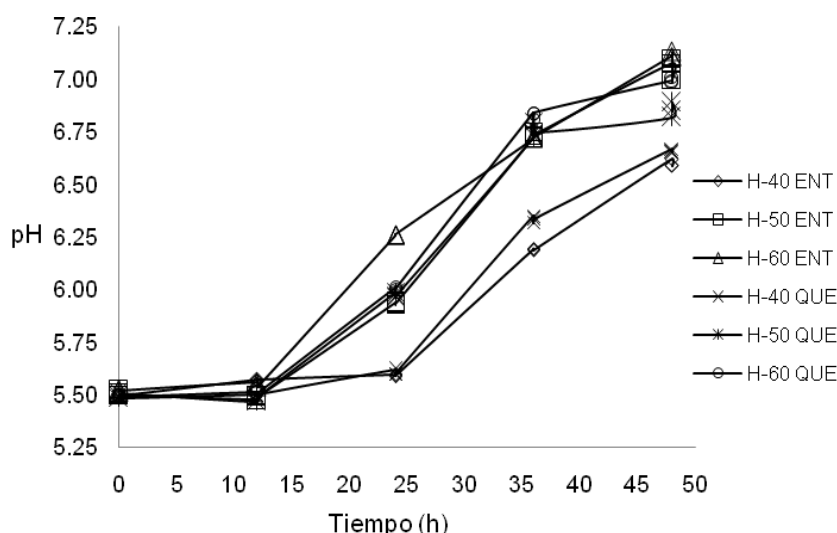


Fig. 13. Variación del pH durante 48 h de fermentación con *R. oligosporus*.

El pH puede relacionarse con las fases de crecimiento, actividad que se evidencia a partir de las 12 h. A las 24 h está en la fase de crecimiento. Entre las 36 a 48 h el pH cambia a una menor tasa llegando a una fase estacionaria. La mayor intensidad observada en el medio quebrantado y con humedades (superiores al 50%) permite concluir que la actividad metabólica es mayor. Los valores en H-40 se debieron a la escasa cantidad de agua que disminuyó el crecimiento e incrementó la concentración de amoníaco.

Tabla 16. Variación en el pH del medio durante el proceso de fermentación

HORA	H-40 ENT	H-50 ENT	H-60 ENT	H-40 QUE	H-50 QUE	H-60 QUE
0	5.50±0.00	5.51±0.01	5.52±0.00	5.49±0.00	5.49±0.01	5.49±0.00
12	5.57±0.00	5.48±0.01	5.55±0.01	5.49±0.00	5.48±0.01	5.50±0.00
24	5.59±0.00	5.93±0.00	6.26±0.00	5.60±0.01	5.97±0.00	6.00±0.01
36	6.19±0.00	6.73±0.01	6.72±0.00	6.33±0.01	6.75±0.03	6.83±0.01
48	6.60±0.01	7.05±0.05	7.11±0.01	6.66±0.00	7.11±0.03	7.35±0.01

5.3.4. Cambios en el contenido de humedad-materia seca

La fermentación provoca cambios en el medio que se observan en la materia seca. La mayor disminución fue en los tratamientos H-50 y H-60 frente a H-40, en medios enteros y quebrantados (Tabla 17). Se observó una reducción que está por encima del 4% en quebrantados H-60 y H-50 (Figura 14). En los enteros H-60 y H-50 disminuyó de 4.1 y 3.8% respectivamente. Los H-40 mostraron un consumo de 2.1 y 2.5% para entero y quebrantado. En H-50 y H-60 la disminución de la materia seca comenzó a las 12 h, lo cual coincide con el inicio de la fase de crecimiento y que continuó a una tasa constante poco antes de las 48 h. Estos valores son menores a los registrados por Ruiz-Teran y Owens (1996), que reportan una reducción del 10 % en 32 h. Sin embargo se ha registrado en soya una reducción promedio del 3 % (Zamora y Vean, 2008). Tales resultados indican la variabilidad del proceso para la soya, que podrá reproducirse al lupino.

Pese a tener una A_w de 0.96 los medios H-40 mostraron un comportamiento diferente por la baja humedad. Una lenta fase exponencial se observa a las 24

h y hasta las 48 h. El consumo de materia seca fue menor al de los medios más hidratados, reflejando limitaciones por la baja humedad.

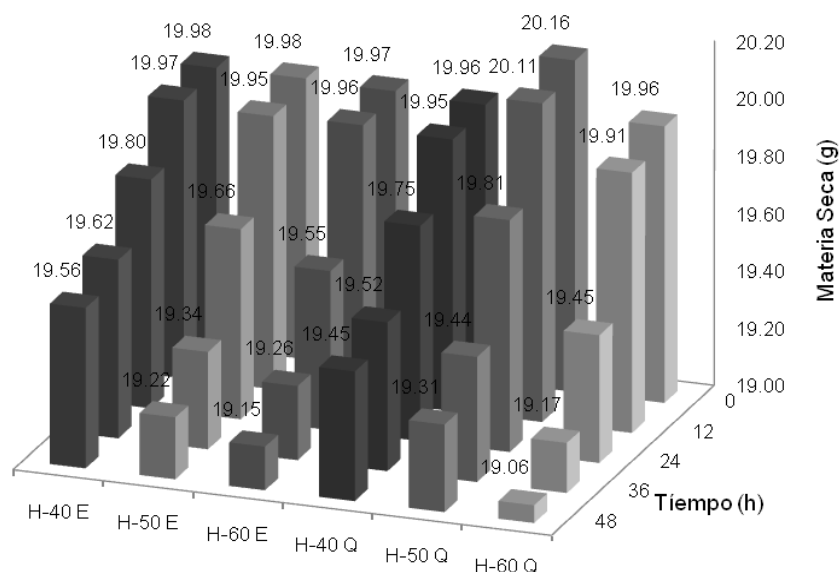


Fig.14. Reducción en el contenido de materia seca en 48 h de fermentación

En todos los medios la humedad se incrementó a valores por encima a los iniciales (Figura 15). La deshidratación sucede en lechos con aireación forzada (Rahardjo, 2005) y sin aireación, la humedad creció por la formación de agua metabólica o la disminución proporcional de la materia seca. Este comportamiento fue independiente del tamaño de partícula ya que son pocas las diferencias entre los medios entero y quebrantado.

Tabla 17. Contenido de materia seca durante las 48 h de fermentación con *R. Oligosporus*.

Tiempo (h)	H-40 Ent (%)	H-50 Ent (%)	H-60 Ent (%)	H-40 Que (%)	H-50 Que (%)	H-60 Que (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.05±0.00	0.14±0.02	0.07±0.01	0.08±0.02	0.23±0.04	0.29±0.03
24	0.90±0.12	1.59±0.21	2.09±0.16	1.07±0.35	1.73±0.15	2.60±0.12
36	1.78±0.09	3.21±0.44	3.58±0.33	2.23±0.30	3.57±.42	3.96±0.39
48	2.10±0.61	3.82±0.33	4.11±0.51	2.57±0.49	4.22±0.71	4.52±0.69

En conclusión la humedad en los ensayos en aireación estática permanece constante durante el proceso y se garantiza a lo largo del mismo. Aunque la

actividad acuosa inicial fue superior a 0.9 en el tratamiento H-40, la cantidad de agua no fue suficiente para sostener el crecimiento. Por tanto el agua en el medio es un factor limitante para el desarrollo de la fermentación.

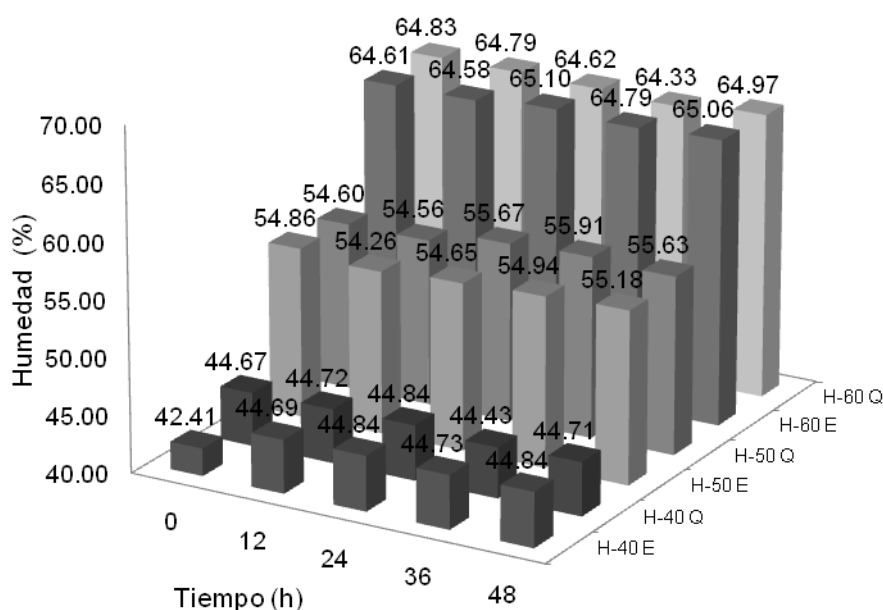


Fig. 15. Variación de la humedad en la fermentación con *R. oligosporus*.

5.3.5. Cambios en el contenido de materia orgánica

Los cambios en la materia orgánica se producen por la obtención de energía y biomasa, produciéndose dióxido de carbono y amoníaco (Sparringa y Owens, 1999b; Feng *et al.*, 2007). Su variación se midió por diferencia con el peso de las cenizas (Figura 16).

Se identificaron diferencias significativas entre los medios de mayor humedad frente a H-40. En el material quebrantado H-60 se determinó un máximo consumo de materia orgánica de 5.05, 4.68 y 2.75% para H-50 y H-40 respectivamente. En cotiledones enteros H-50 y H-60 hay consumo de 4.15 y 4.45% respectivamente. Un consumo de 2.14% se registró para partículas enteras H-40. Se concluye que la reducción de materia orgánica es mayor cuando la humedad del medio garantiza un adecuado crecimiento.

La reducción de tamaño de partícula provoca un mayor consumo de materia orgánica para los tres medios. En el medio H-40 se incrementó el consumo de materia orgánica en un 28.4 %. Además de la mayor disponibilidad de área, se mejoró la disponibilidad de agua y nutrientes para el hongo. En los medios H-50 y H-60 el incremento fue de un 12.73 % y 13.4 % respectivamente. El mayor consumo se observó en los cotiledones quebrantados por lo que se evidencia que el tamaño tiene mayor influencia que la humedad.

Los cambios más significativos se observan en el extracto etéreo y en la proteína ya que el *R. oligosporus* tiene preferencia en los lípidos para la obtención de energía (Nout y Kiers, 2005). Como se muestra en la tabla 18 se presentó una reducción en la concentración de extracto etéreo presente en las cotiledones enteras del 2.29% para H-60 y de 1.3% para el medio H-50. En el medio con 40% de humedad no hubo reducción pero se observó una disminución del extracto libre de nitrógeno. En los cotiledones quebrantados H-40 se alcanzó una reducción de 0.49% y la reducción llega al 3.27 % para H-60 y 2.47 para H-50. El consumo de lípidos en el lupino puede realizarse como se ha referenciado, principalmente después de las 24 h hasta el 6 % en 72 h (De Reu *et al.*, 1994). Esto contribuye a la disminución de los lípidos y al incremento proporcional del contenido de proteínas (Nout y Rombouts, 1990).

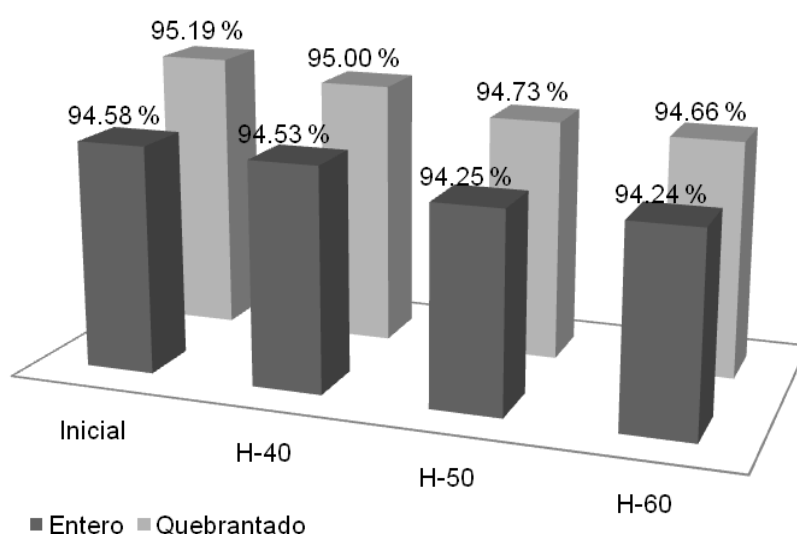


Fig. 16. Contenido porcentual de materia orgánica en cotiledones enteros y quebrantados en tres niveles de humedad después de 48 h de fermentación.

La proteína se incrementó proporcionalmente en la medida que hay más agua en el medio (Tabla 18). Para H-60 quebrantado se experimentó un incremento de 2.82 % y de 1.89 % para H-50. En los medios enteros se experimentó un incremento de 2.24 % para H-60 y de 1.12 % para H-50. El valor en H-40 es menor que los anteriores calculándose un incremento de 0.28 % para enteros y de 0.73 % para quebrantados. El incremento en el contenido de proteína presenta valores similares a la fermentación de la soya (Wang *et al.*, 2008). Además es probable que se provoque el incremento de aminoácidos libres y proteínas solubles similar a lo que ocurre en la fermentación con soya (Yokotsuka, 1991).

Tabla 18. Análisis proximal de cotiledones enteros y quebrantados después de 48 h de fermentación

Cotiledones Enteros				
Nutriente (%)	Inicial	H-40	H-50	H-60
Ceniza	5.56±0.16	5.81±0.11	6.09±0.19	5.90±0.09
Extracto etéreo	16.18±1.10	16.46±0.94	14.88±1.15	13.89±1.01
Fibra cruda	2.98±0.25	2.96±0.18	3.07±0.21	4.01±0.19
Proteína	48.64±1.66	48.66±1.15	50.06±1.31	51.18±1.42
E.L.N.	26.33±0.97	26.12±0.88	24.90±0.71	25.02±0.79
Cotiledones Quebrantados				
Nutriente (%)	Inicial	H-40	H-50	H-60
Ceniza	5.11±0.21	5.65±0.12	5.83±0.14	6.17±0.16
Extracto etéreo	17.58±0.98	17.09±0.77	15.11±0.79	14.31±0.82
Fibra cruda	2.20±0.11	2.71±0.17	3.36±0.13	3.90±0.09
Proteína	47.49±1.87	48.22±1.85	49.38±1.54	50.31±0.98
E.L.N.	27.62±1.02	26.33±0.90	27.32±1.22	25.31±1.16

5.3.6. Cambios en el contenido de alcaloides

La concentración de alcaloides en los cotiledones presentó diferencias significativas durante la fermentación disminuyendo a medida en que se incrementa la humedad (Tabla 19) (Anexo 5). Entre H-40 y H-60 de cotiledones enteros se observó una diferencia en la concentración de alcaloides de 16.75 % después de 48 h. Esto se atribuye al mayor contenido de agua que facilita la difusión de los alcaloides y de los enzimas, circunstancia que se ha demostrado en otros estudios (Geisseler *et al.*, 2011). A menor crecimiento de micelio menor actividad enzimática, que sumada a una menor difusión intraparticular, explicaría la menor detoxificación en H-40. Sin embargo la

actividad enzimática también se presenta en medios con bajos contenidos de humedad (Doyle *et al.*, 2006), puesto que se observa que la concentración de alcaloides baja. En conclusión el crecimiento que se presentó en H-40 produjo la suficiente cantidad de enzimas para degradar estos alcaloides.

Una tendencia diferente se presentó entre H-50 y H-60 donde solo se observa una diferencia de 3.20 %. Esto evidencia la importancia de la humedad y a la vez indica que su exceso no contribuye proporcionalmente en el incremento de la detoxificación. Estudios acerca del crecimiento y actividad enzimática microbiana han llegado a conclusiones similares en relación a la humedad (Geisseler *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la actividad enzimática fue mayor en niveles de 50 % aunque el crecimiento fue mayor a 60 % (Ikasari y Mitchel, 1994). Se puede inferir que en H-50 el hongo cuenta con una cantidad de agua que garantiza el crecimiento y la detoxificación en unos niveles ligeramente por debajo a los obtenidos en H-60.

Una tendencia similar se observó en los cotiledones quebrantados, con una diferencia de 17.14 % entre H-40 y H-60 y una diferencia de 2.83 % entre H-50 y H-60. Esto ratifica que el exceso de agua no incrementa proporcionalmente la detoxificación (Figura 6).

El objeto del quebrantamiento fue mejorar el alcance del micelio, tratando de mantener un equilibrio entre la porosidad y la tendencia del material a apelmazarse para garantizar suficiente aireación. Esta propiedad afectó la concentración de alcaloides, puesto que entre partículas enteras y quebrantadas H-60, se calculó una diferencia de 6.32 % después de 48 h. De igual forma la diferencia entre los tratamientos H-50 fue de 6.69 % y entre los H-40 es de 5.93 %. Los valores revelan que la reducción del tamaño de partícula tiene un efecto significativo en la degradación de los alcaloides. El efecto es mayor cuando la humedad está por encima del 50 % ya que fue en H-50 y H-60 donde el efecto del tamaño fue mayor que el de la humedad. Por tanto, mediante el quebrantamiento a la mitad, fue posible obtener una reducción adicional de 6.5 %. Partículas más pequeñas incrementan el área del lecho para crecimiento aumentando la cantidad de enzimas y la detoxificación, lo cual ya se había observado en otras aplicaciones (Nandakumar *et al.*, 1996).

La reducción de alcaloides para enteros y quebrantados en H-50 fue en promedio de 17.0 % más que para H-40. Una baja humedad hace que la detoxificación sea más lenta y por tanto, en una humedad igual o mayor a 50 %, habrá una mayor detoxificación. Entre H-40 y H-50 el efecto de la humedad fue mayor que el de la reducción de tamaño. El agua en suficiente cantidad es indispensable para que haya detoxificación. Pese a que se ha reportado que la disminución en el tamaño mejora la actividad enzimática (Zadrazil y Kumar, 1995), para los medios con alta humedad no se apreciaron grandes diferencias, por lo que se puede concluir que los sistemas estudiados no se ajustan a este regla. Los efectos combinados entre humedad y tamaño revelan que su influencia es significativa para la detoxificación. El tamaño de partícula tuvo un mayor efecto que la humedad cuando esta última se encuentra en cantidad suficiente para el hongo. Esta circunstancia estaría relacionada con la combinación de una mejor movilidad molecular, una mayor área para el crecimiento y el ablandamiento de la partícula que facilita la penetración.

La tendencia de disminución de la concentración es similar para los seis tratamientos con un máximo para H-60 quebrantado. Como se había concluido en los experimentos en agar, la degradación de los alcaloides se realiza mayoritariamente en la fase de crecimiento. Esta fue desde las 12 hasta las 40 h a una tasa casi constante, tendencia que se observó también en los cotiledones.

La cantidad de alcaloides totales en cada unidad experimental se calculó multiplicando la materia seca en cada punto con su respectiva concentración. Para H-40 entero y quebrantado se tuvo una eliminación de 400.53 y 457.44 mg por unidad experimental (frasco) respectivamente y 521.37 y 594.59 mg frasco⁻¹ para H-50. En cotiledón entero desde H-40 hasta H-50 se presentó un 30.17% más en la detoxificación que fue similar para quebrantados con un incremento de 29.98% (Figura 17). En H-60 se eliminó las mayores cantidades con 569.93 y 596.15 mg frasco⁻¹ para enteros y quebrantados respectivamente, siendo los mayores. Entre H-50 y H-60 para entero y quebrantado la degradación fue 4.5% mayor para la segunda. La reducción de tamaño mejoró la detoxificación en 5.93, 6.69 y 6.32 % para H-40, H-50 y H-60 respectivamente.

La detoxificación en todos los tratamientos se presentó en una mayor proporción durante las primeras 24 h, aunque la degradación se continúa realizando hasta las 48 h a una tasa menor. Los resultados de las primeras 24 h de fermentación son similares a los obtenidos por Jiménez *et al.*, (2007), que obtuvo un 46 % de eliminación, confirmando que las enzimas de la degradación se producen en la fase de crecimiento exponencial.

Tabla 19. Cinética de variación de los alcaloides quinolizidínicos presentes en los cotiledones de Lupino fermentados con *R. oligosporus*.

Tiempo (h)	H-40		H-50		H-60	
	Concentración (mg A g MS ⁻¹)	Cantidad (mg A frasco ⁻¹)	Concentración (mg A g MS ⁻¹)	Cantidad (mg A frasco ⁻¹)	Concentración (mg A g MS ⁻¹)	Cantidad (mg A frasco ⁻¹)
Cotiledones Enteros						
0	42.64±1.20	851.52±23.89	42.74±0.52	853.58±10.48	44.41±3.50	886.87±69.92
24	31.60±0.41	630.14±8.24	28.41±0.44	563.73±8.71	27.88±1.75	553.44±34.80
48	22.65±0.88	450.99±17.49	16.91±0.20	332.20±3.96	16.15±0.33	316.94±6.42
Cotiledones Quebrantados						
0	43.25±0.95	863.19±19.03	43.58±0.69	878.16±13.94	42.33±1.56	845.00±31.22
24	28.36±0.25	565.54±4.93	29.57±0.11	592.01±2.13	24.34±0.18	482.82±3.66
48	20.41±2.38	405.75±47.37	14.33±0.63	283.57±12.49	12.72±0.13	248.86±2.54

Aunque hay diversas referencias de la actividad antimicrobiana de los alcaloides (Wink, 1984; Tyski *et al.*, 1988; De la Vega *et al.*, 1996), no se han identificado registros de inhibición para el *R. oligosporus*. Por los resultados obtenidos no se observa sensibilidad del hongo frente a estas sustancias.

5.3.6.1. Cambios por cada alcaloide

En los cotiledones se observó un comportamiento con una tendencia similar a los experimentos en agar (Tabla 20) (Anexo 5). La lupanina fue el alcaloide más degradado llegando a un porcentaje del 77.91% en cotiledones quebrantados y con una diferencia de 5.22% para los enteros. El incremento en la degradación de la lupanina por el aumento de la humedad entre H-50 y H-60 fue de 4.51 y 0.04% más para enteros y quebrantados respectivamente. En H-40 la degradación de la lupanina se dio en una proporción mayor que en humedades superiores, siendo la mayor para los cotiledones quebrantados donde estuvo por el orden del 61% de degradación.

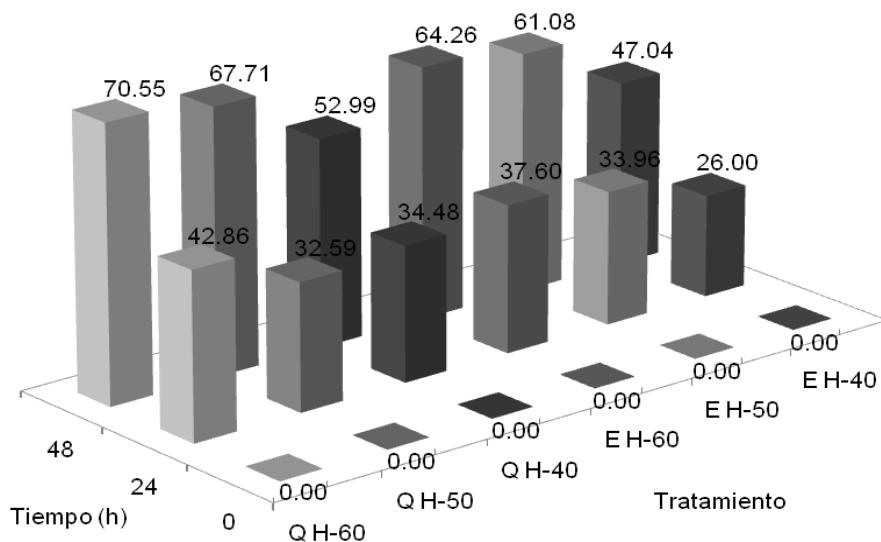


Fig. 17. Porcentaje de reducción en la cantidad de alcaloides totales en cotiledones de Lupino durante 0, 24 y 48 h de fermentación con *R. oligosporus*.

Un comportamiento similar se presentó para la esparteína que tuvo una máxima detoxificación en material quebrantado H-60 con un 69.35%, seguido con un 63.05% para enteros. En este alcaloide se observó un bajo porcentaje de degradación en ambos tratamientos H-40 cuyas detoxificaciones promediaron en 40%. Las limitaciones de agua afectaron la degradación de esta sustancia. Al igual que para la lupanina la diferencia de degradación entre los tratamientos H-50 y H-60 para la esparteína no supera el 1.3%.

La tetrahidrorombifolina (THR) alcanza una máxima eliminación de 76.55 % en material quebrantado H-60. Al igual que con la esparteína, en la THR se observó bajos niveles de eliminación en el tratamiento H-40 con valores de 41 y 57 % para enteros y quebrantados. La degradación de estos alcaloides es más afectada que otros por la menor disponibilidad de agua.

La 4-hidroxilupanina presentó una baja degradación en comparación con los demás alcaloides. La máxima eliminación se situó en H-60 quebrantado llegando a un 40.1 %. Una de las razones de su baja eliminación podría ser a la reducción de la lupanina cuya degradación incrementa continuamente la cantidad de hidroxilupanina. Estudios han demostrado que la hidroxilación es

una de las primeras reacciones en la degradación de la lupanina provocada por *pseudomonas* (Toczko *et al.*, 1963) lo cual podría realizarse por el hongo.

En los alcaloides minoritarios se presentaron bajos niveles de degradación en todos los tratamientos. Al contrario de los medios de mayor humedad, se observó que la mayor degradación se presentó en H-40 con un promedio para ambos del 31 %. Los tratamientos H-50 y H-60 en material quebrantado están por el orden del 23 y 27 % de degradación. De igual manera para material entero se obtuvo una eliminación de solamente un 21 y 20 % respectivamente para los mismos medios. Los bajos porcentajes de eliminación podrían deberse a la reacción de hidroxilación de la lupanina, que podría incrementar la cantidad de estas sustancias. Por otra parte los alcaloides pueden ser de difícil eliminación para el hongo. Por la carencia de información que respalde alguna de estas teorías, no es posible hacer conclusiones sobre la detoxificación.

Tabla 20. Cantidad de alcaloides totales presentes en el medio de fermentación durante las 48 h.

Tiempo (h)	Semilla Entera			Semilla Quebrantada		
	H-40 (mg A frasco ⁻¹)	H-50 (mg A frasco ⁻¹)	H-60 (mg A frasco ⁻¹)	H-40 (mg A frasco ⁻¹)	H-50 (mg A frasco ⁻¹)	H-60 (mg A frasco ⁻¹)
Lupanina						
0	453.43±34.92	428.48±10.37	487.72±33.82	498.37±36.13	557.58±13.47	467.66±4.84
24	313.29±2.30	285.94±19.83	271.21±4.61	306.56±19.51	273.85±8.68	239.32±6.93
48	189.42±10.88	136.33±0.35	133.19±8.59	192.00±23.79	123.37±10.53	103.29±5.60
Esparteína						
0	203.07±6.21	254.00±2.64	225.19±28.07	215.35±8.41	192.63±4.16	211.85±6.38
24	155.91±0.81	155.06±11.26	167.42±23.54	143.70±0.25	137.42±8.58	125.99±0.44
48	130.09±10.51	96.50±0.17	83.21±0.21	115.91±2.35	62.04±1.03	64.93±4.78
Tetrahidrorombifolina						
0	73.80±4.93	72.05±4.40	67.37±3.83	74.42±4.64	78.25±2.12	75.34±2.02
24	47.44±3.37	28.53±2.41	21.53±0.66	41.68±3.06	37.93±1.70	28.54±2.03
48	42.93±4.45	18.12±2.29	17.96±1.62	31.60±3.00	22.19±2.00	17.66±1.90
4-Hidroxilupanina						
0	39.40±0.59	38.51±0.61	38.51±0.17	37.90±4.64	39.96±1.65	39.70±4.64
24	39.15±0.94	35.39±1.05	34.80±2.99	33.07±4.63	33.71±2.73	30.21±2.35
48	34.47±1.48	25.86±2.27	28.72±2.65	26.88±2.71	26.81±2.29	23.78±2.46
Alcaloides Minoritarios						
0	81.81±0.49	70.52±6.53	68.09±1.70	56.10±5.93	64.06±4.17	70.31±0.41
24	74.35±2.45	58.81±3.59	58.47±4.32	57.07±5.98	55.14±3.26	58.76±2.52
48	54.08±2.02	55.39±3.77	53.86±3.41	39.36±3.51	49.16±3.28	51.10±2.00

5.4. LA HUMEDAD, EL TAMAÑO DE PARTÍCULA CON AIREACIÓN FORZADA

5.4.1. Caracterización de los lechos de fermentación

La fermentación se realizó en columnas de vidrio con volumen útil de reactor⁸ es de 34.55 cm³ (Figura 18). Se hizo los lechos con cotiledones hidratados con una cantidad de materia seca varió entre tratamientos por la humedad y el tamaño de partícula (Tabla 21). A menor contenido de agua y/o mayor tamaño de partícula más cantidad de materia seca en el reactor. Entre H-50 y H-60 enteros hubo una diferencia de materia seca más para H-50 de 1.8828 g. La diferencia respectiva fue de 1.2531 y 1.7921 g de materia seca, para los tamaños No 4 y No 6 respectivamente. La diferencia entre partículas enteras y No 4 fue en promedio de 0.54 g, mientras que para No 4 y No 6 la diferencia fue de 2.08 g. Una menor diferencia en la materia seca se presentó en los tratamientos de mayor tamaño en razón de la menor porosidad. También se midió la densidad observándose que ésta disminuyó en la medida en que el tamaño de partícula es menor.



Fig. 18. Columnas rellenas con material en partículas quebrantadas y enteras, en tiempo inicial de fermentación

5.4.2. Observaciones sobre el crecimiento

El crecimiento fue similar a lo registrado en los experimentos en agar y medio sin aireación forzada. Se observó homogeneidad transversal y longitudinal en

⁸ Se define como “volumen útil” el espacio real que el lecho de partículas utiliza dentro de la columna.

toda la columna en los medios H-50 y H-60 (Figura 19). A las 24 h el hongo invadió completamente ambos medios observándose además esporulación.

Tabla 21. Contenido promedio de materia seca y densidad inicial del lecho de fermentación en columnas

Lecho Hum	Entero		No. 4		No. 6	
	Materia seca Inicial (g)	Densidad (g / cm ³)	Materia seca Inicial (g)	Densidad (g / cm ³)	Materia seca Inicial (g)	Densidad (g / cm ³)
H-50	14.17±0.17	0.81±0.01	13.15±1.34	0.75±0.07	11.34±0.32	0.66±0.02
H-60	11.97±0.84	0.87±0.06	11.90±0.79	0.84±0.05	9.55±0.31	0.67±0.02

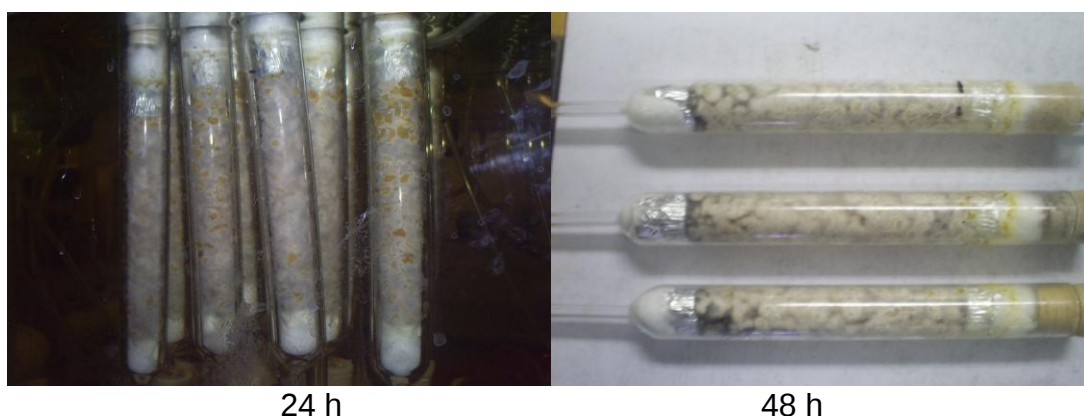


Fig. 19. Crecimiento en las 24 y 48 h de fermentación

Aunque la esporulación se hizo visible al final del proceso, las observaciones en microscopio muestran esporas a las 24 h (Figura 20). La esporulación se presentó desordenadamente y su control es difícil. Gracias a observaciones microscópicas se determinó que hay una adecuada propagación al interior del lecho, con un crecimiento homogéneo sobre toda la superficie de la partícula.

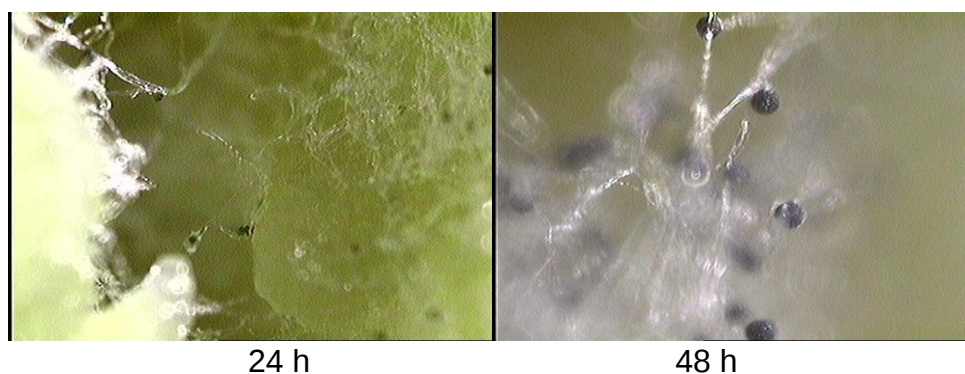


Fig. 20. Observación microscópica de la esporulación durante el proceso de fermentación

5.4.3. Comportamiento de la humedad en el sistema

En todos los tratamientos se experimentó un incremento de la humedad que fueron ligeramente superiores para H-50 (Tabla 22). En los medios H-50 se estableció un incremento promedio de 3.76 % y en los H-60 de 3.60 %. Esto pudo deberse primero, a la capacidad higroscópica de los cotiledones y segundo, la producción de agua metabólica. El agua producida por el hongo es proporcional a la cantidad de materia seca consumida.

Se observó mayores porcentajes de humedad en el tratamiento de menor tamaño de partícula. Esto pudo deberse a la mayor área disponible tanto para la formación de agua metabólica como para el contacto con el aire húmedo. No se observó algún efecto de la aireación sobre la humedad del medio, ya que no se pudo observar una tendencia en particular.

Tabla 22. Porcentaje de humedad en el medio después de 48 h de fermentación

Aireación (ml min ⁻¹)	Entero		No. 4		No. 6	
	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60
Inicial ₁	49.95±0.11	60.02±0.81	49.23±0.04	59.45±1.83	50.70±0.63	59.18±1.72
20	50.40±0.33	61.34±0.42	52.91±1.29	61.51±0.19	52.13±0.71	62.84±0.29
60	50.50±0.83	61.01±0.47	51.93±0.19	61.13±0.45	53.06±0.32	63.51±1.17
100	50.28±0.57	61.63±0.67	52.30±0.83	60.56±0.83	52.96±0.18	61.69±1.34

₁ Humedad tomada al inicio del proceso de fermentación en medio inoculado

La humedad permaneció sobre el nivel de estudio hasta la finalización, pese a los reportes sobre la pérdida de agua en lechos con aireación forzada (Rahardjo, 2005). No se registró deshidratación en los medios ni siquiera en los de mayor aireación. La formación de agua metabólica y su retención dentro del material permitió mantener estos niveles.

5.4.4. Respiración del hongo

El hongo por su metabolismo aerobio estricto, requiere una provisión de oxígeno constante. La alimentación de este se realizó a través de la inyección de aire húmedo, que además moviliza el CO₂. La producción de CO₂ y consumo de O₂ se monitoreó para estudiar la fermentación y el metabolismo del hongo.

5.4.4.1. Punto máximo de producción de CO₂

Se observaron diferencias significativas en los tratamientos de 50 y 60 % de humedad. Los puntos máximos de producción de CO₂ se presentaron en promedio para los tratamientos H-60 a las 19.28±0.51 h, mientras que para H-50 se presentó a las 21.14±1.01 h (Figura 21a). Para H-50 tarda 1.86 h más que para H-60, lo cual puede explicarse con la humedad que mejora el crecimiento. Se identificó un segundo punto de incremento de producción de CO₂ que fue poco perceptible⁹ especialmente en alta aireación. Su presencia podría sugerir un metabolismo diáuxico el cual ha sido reportado por Santana *et al.*, (2002) en la degradación de alcaloides en extractos acuosos de *Lupinus albus*. El exceso de nutrientes en los cotiledones, hacen que la producción de CO₂ sea casi constante después del primer punto máximo, razón que hace poco perceptible el segundo punto. Este se presentó entre las 30 y 40 h de fermentación y su baja intensidad, variabilidad en el tiempo y la composición del medio, dificultan hacer mayores precisiones sobre este comportamiento.

5.4.4.2. Concentración de CO₂ en el sistema

La concentración de CO₂ disminuyó lentamente después del punto máximo en todos los tratamientos en las 48 h (Figura 21a). La concentración máxima de CO₂ se alcanzó en la aireación de 20 ml min⁻¹, con 2.33%, valor que no presenta riesgos de toxicidad para el hongo de acuerdo a los estudios (Nout y Kiers, 2005). En aireaciones superiores se acumuló CO₂ en concentraciones por debajo del 1% lo que no representa riesgos para el hongo (Tabla 23).

La mayor concentración de CO₂ se presentó en cotiledones quebrantados No 6 y H-60. El quebrantamiento hasta No. 6 incrementó el área de crecimiento sin afectar la aireación del medio. En H-60 la concentración fue mayor que en H-50, con diferencias adicionales de 17.25, 4.25 y 9.24%, para partículas enteras, No 4 y No 6 respectivamente (Tabla 23). Al igual que los experimentos sin aireación forzada, el proceso es afectado por la humedad y el tamaño.

⁹ Estos valores no son gráficamente perceptibles y se evidencian solamente por la revisión detallada de los datos.

5.4.4.3. Cantidad de CO₂ producido

Se identificaron diferencias significativas en la producción de CO₂ por las variaciones en el tamaño de partícula, humedad y aireación.

Tabla 23. Porcentaje de concentración de CO₂ en su punto máximo de producción

Aireación (ml min ⁻¹)	Entero		No. 4		No. 6	
	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60
A-20	1.87	2.19	1.68	1.75	2.13	2.33
A-60	0.29	0.39	0.57	0.51	0.62	0.75
A-100	0.21	0.23	0.27	0.34	0.23	0.35

La cantidad de CO₂ producido fue mayor en H-60, con una diferencia a favor en cotiledones enteros del 4.98% y en No. 4 de 9.35%. Para el No. 6 el aumento fue de 20.87%. La mayor producción de CO₂ se presentó en los tratamientos con mayor humedad y con partícula más pequeñas (Figura 21b).

La producción de CO₂ también se incrementó proporcionalmente por la reducción en el tamaño de partícula que aumentó el área para el crecimiento. En cotiledones enteros el CO₂ producido fue de 51.99 mg CO₂ g MSI⁻¹, cantidad que se incrementó hasta 80.48 28.49 mg para el tamaño No. 4. En tamaño No. 6 el CO₂ llegó a un valor máximo promedio de 111.41 mg de CO₂ g MSI⁻¹. Es evidente que los efectos provocados a consecuencia de la reducción de tamaño de partícula son mayores que los que causados por el incremento en la humedad. Estos efectos combinados mejoran la captación de nutrientes incrementando la mineralización. Esto también se había observado en medios sin aireación forzada donde el tamaño fue más representativo que la humedad.

La cantidad de CO₂ producido también fue afectada por la aireación. Entre 20 y 60 ml min⁻¹ no se observaron diferencias significativas con valores alrededor de los 50, 82 y 121 mg CO₂ g MSI⁻¹ en cotiledones enteros, No. 4 y No. 6 respectivamente. El CO₂ producido en 100 ml min⁻¹ bajó proporcionalmente con el tamaño de partícula. En cotiledones enteros la cantidad permaneció casi invariable en las tres aireaciones pero disminuyó en partícula No 4 y bajó más en No. 6 (Tabla 24). La ocurrencia de variaciones metabólicas se ha reportado en fermentación sólida cuando la aireación forzada es alta (Spier *et al.*, 2007).

Tabla 24. Cantidad de CO₂ producido en la fermentación de cotiledones de Lupino por *Rhizopus oligosporus*

Dióxido de Carbono												
Aireación (ml min ⁻¹)	Entero				No. 4				No. 6			
	H-50		H-60		H-50		H-60		H-50		H-60	
	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	CO ₂ (mg g MSI ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
A-20	47.91±0.93	0.28±0.01	50.51±1.67	0.19±0.01	82.75±6.15	0.23±0.01	83.85±5.08	0.24±0.04	109.22±8.35	0.41±0.01	140.87±5.08	0.52±0.03
A-60	52.22±5.01	0.28±0.05	52.48±4.75	0.16±0.01	74.06±2.57	0.20±0.01	88.73±2.77	0.22±0.01	97.66±3.44	0.40±0.02	138.88±7.36	0.57±0.02
A-100	52.05±4.90	0.33±0.05	56.78±4.74	0.17±0.01	73.95±1.56	0.18±0.01	75.23±4.64	0.21±0.01	95.76±5.16	0.40±0.05	86.08±4.72	0.56±0.01
Porcentaje de Mineralización (%)												
Aireación (ml min ⁻¹)	Entero		No. 4		No. 6		No. 6		No. 6		No. 6	
	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60
A-20	2.34±0.05	2.46±0.08	4.04±0.49	4.09±0.25	5.33±0.02	6.87±0.71						
A-60	2.55±0.24	2.56±0.23	3.61±0.13	4.33±0.14	4.76±0.17	6.77±0.36						
A-100	2.54±0.13	2.77±0.23	3.61±0.08	3.67±0.28	4.67±0.25	4.20±0.23						

La disminución en la actividad enzimática puede afectar más a partículas pequeñas y un exceso de oxígeno puede afectar la fase de fermentación anaerobia que realiza el *Rhizopus* después de las 24 h.

Con la gráfica de producción de CO₂ (Anexo 6), se determinó las fases Lag de los tratamientos. El medio con tamaño entero duró en promedio 15.77 ± 0.17 h y presentó cambios insignificantes en relación a la humedad y la aireación. Esto no se reprodujo en los tratamientos con cotiledones quebrantados. Para el medio No. 4 H-50 esta fase tuvo una duración de 13.17 ± 0.23 h, 0.81 h más que H-60, cuyo valor fue de 12.36 ± 0.29 h. De igual forma para el tamaño No. 6 H-50, fue de 11.79 ± 0.45 h y para H-60 fue de 10.96 ± 0.50 h. El tamaño de partícula cambió la duración de esta fase, presentándose una diferencia de 3 y 4.4 h más para cotiledones enteros frente a No. 4 y No. 6 respectivamente. Entre los quebrantados la diferencia fue de 1.39 h más para las partículas No. 4, lo que evidencia mejores condiciones del medio cuando las partículas son pequeñas. En los medios más húmedos la fase duró menos mostrando una mejor adaptación del hongo. La aireación redujo la duración de la fase en todos los tratamientos, no obstante, la magnitud fue menor a 1 hora. La máxima diferencia observada fue de 0.98 h entre el entero y No. 6 con H-60. Con esto se demuestra la baja incidencia de la aireación, así como la mayor influencia del tamaño y la humedad en la duración de esta fase.

La producción de CO₂ en la fase de crecimiento se caracterizó mediante el cálculo de las tasas de crecimiento específico (μ) (Tabla 24). Se utilizó la ecuación logística presentando R² que fluctuaron entre 0.98 y 0.99 en todos los tratamientos. El valor de μ se incrementa en los tratamientos de mayor humedad y se observó los valores más altos en los experimentos de tamaño No. 6. Una vez más se evidencia la influencia del tamaño de partícula en el crecimiento del hongo y su actividad respiratoria.

Se calculó el grado de mineralización del carbono presentado en el proceso (Tabla 24). El valor más alto se obtuvo en el tratamiento con tamaño No. 6 y H-60 el cual llega al 6.87 %. La aireación donde se logró ese nivel es de 20 ml min⁻¹, aunque hubo pocas diferencias con 60 ml min⁻¹ donde la mineralización solo disminuye en un 1.36 %. Sin embargo la diferencia en 100 ml min⁻¹, está

por el orden del 38 % lo que evidencia el efecto inhibitor del exceso de aireación.

5.4.4.4. Oxígeno consumido

El oxígeno consumido en una fermentación con *Rhizopus*, depende del área disponible para el crecimiento (Oostra *et al.*, 2001). Por tanto, a menor tamaño de partícula habrá una mayor oxigenación del medio y se registrará un mayor consumo. En los resultados se observó que el consumo se triplicó desde el medio con cotiledones enteros hasta en material quebrantado No. 6 (Tabla 25). A mayor superficie disponible se facilitará el crecimiento y el consumo de las fuentes de carbono, requiriendo para esto una mayor cantidad de oxígeno.

El consumo de oxígeno en relación a la humedad y tamaño de partícula presentó variaciones entre H-50 y H-60 similares a las observadas con el dióxido de carbono. En el tamaño entero y No. 4 se presentaron valores menores debidos posiblemente a que la mineralización fue menor por la dificultad del hongo para aprovechar los nutrientes en partículas grandes. En No. 6 los valores mayores permiten concluir sobre la interrelación entre la humedad y el tamaño de partícula y sus efectos sobre el hongo.

El consumo de oxígeno en A-20 y A-60 no presentó diferencias significativas. Esto revela la poca influencia que estos tratamientos tuvieron sobre la cantidad de oxígeno captada por el hongo. En A-100 se observó una reducción en el oxígeno captado, lo que permite inferir que un exceso de aire no mejora la captación de oxígeno. Esto pudo deberse a que la excesiva aireación arrastra el agua de la superficie la cual es necesaria para que el hongo tome el oxígeno.

Otro factor importante está relacionado con el tiempo de máximo consumo. En todos los tratamientos este se presentó en el intervalo de las 23 y 28 h, siendo posterior al del CO₂. En este tiempo se observó toda la superficie del lecho completamente cubierta de la primera capa de micelio, la cual respira en su totalidad y explicaría la máxima captación en esta etapa del proceso.

5.4.4.5. Coeficiente respiratorio (CR)

El coeficiente respiratorio (mmol CO_2 producido / mmol O_2 consumido) está relacionado con el metabolismo celular (Figura 21c). De esto puede concluirse el tipo de sustrato utilizado, su nivel de oxidación y el efecto de las condiciones de cultivo (Beaudin *et al.*, 1996).

El CR no presentó variaciones significativas en relación al tamaño de partícula y la humedad, reflejando que el hongo aprovechó los nutrientes de igual manera en los medios. En relación a la aireación se observó una ligera disminución en el valor del coeficiente para el tratamiento A-100. Esto confirma que el exceso de aireación afectó la cantidad de oxígeno captado y por tanto se limitó el aprovechamiento de las fuentes de carbono disponibles.

Las gráficas del CR vs tiempo (Figura 21c) muestran que este tiende a disminuir después de las 20 h en todos los tratamientos. Esto evidencia la gran cantidad de fuentes de carbono presentes en los cotiledones para el crecimiento y mantenimiento de la biomasa. En general las fermentaciones presentaron pocas diferencias en su tendencia. Esto evidencia un proceso un proceso estable donde el aprovechamiento de las fuentes de carbono es constante. La uniformidad en el consumo de nutrientes pudo deberse a la afinidad del hongo frente a estos componentes.

5.4.5. Variación en la relación humedad-materia seca

La humedad puede variar de acuerdo a la fase gaseosa que rodea el medio y por las reacciones bioquímicas que se producen dentro de éste.

Se observó un incremento en la humedad en todos los medios. La magnitud varía en función del tamaño con un incremento del 1.54 % para el medio de cotiledones enteros. En quebrantados se observó un incremento del 4.53 y 4.93 % para los No. 4 y No. 6 respectivamente. La humedad se incrementó en una mayor cantidad en la medida en que el tamaño de partícula disminuye.

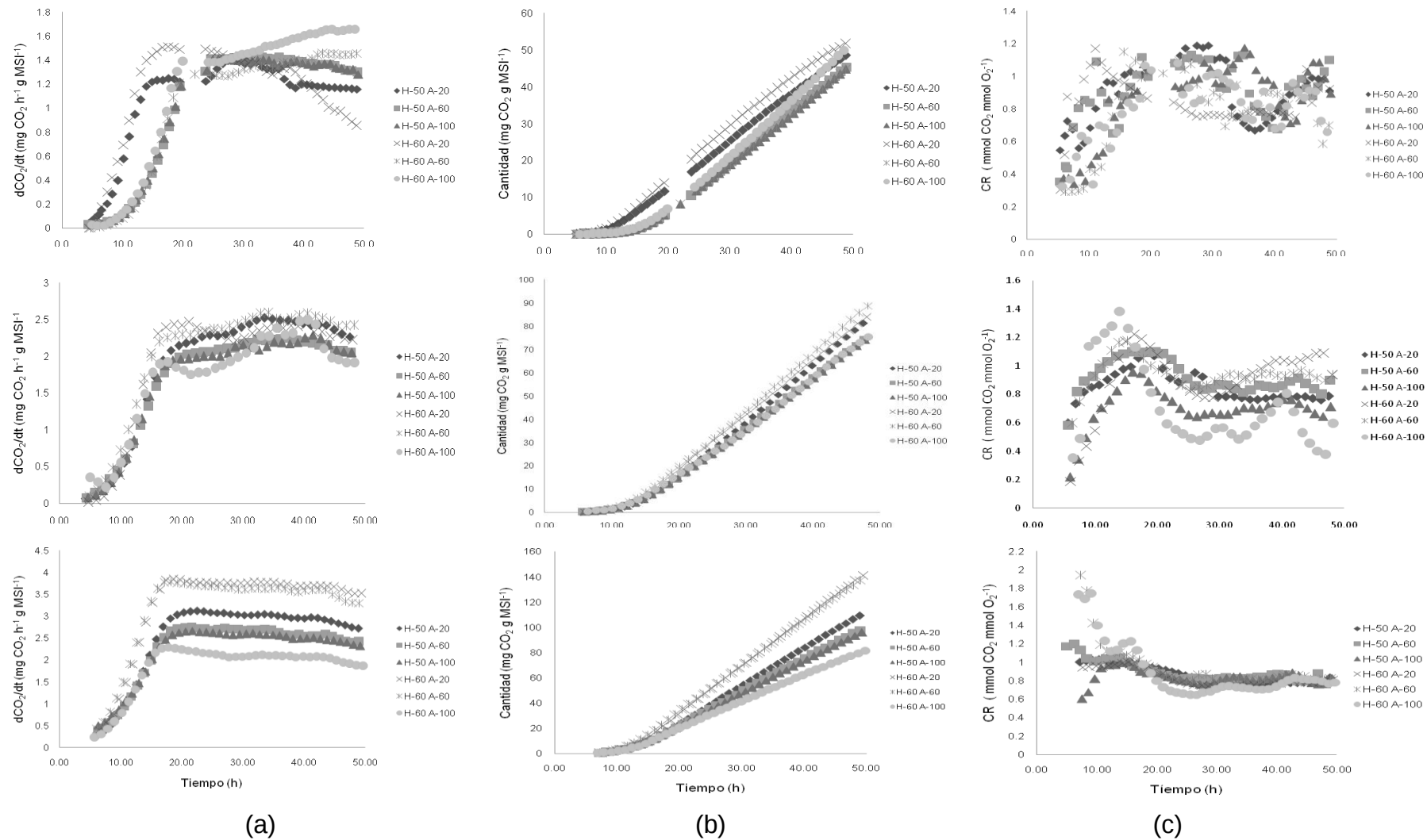


Fig. 21. Concentración de CO_2 (a), producción total de CO_2 (b) y coeficiente respiratorio (c) en 48 h de fermentación con *R. oligosporus* para los medios de cotiledones enteros, Tyler No. 4 y No. 6.

El incremento en la humedad puede relacionarse con la aireación del medio (Tabla 26). Los medios aireados a una tasa de 100 ml min^{-1} , registraron una menor humedad que los menos aireados. Pese a la saturación el exceso de aireación pudo arrastrar la humedad de la superficie de la partícula, circunstancia que explicaría este comportamiento.

El contenido de materia seca presentó un máximo valor de reducción de 5.57 % para el medio con tamaño No. 6, H-60 y A-60. Todos los valores de reducción fluctúan alrededor de los porcentajes de mineralización calculados por el CO_2 producido (Tabla 24). Otras sustancias se evaporan en el proceso, sin embargo, su medición es difícil por estar en baja cantidad. En conclusión la mayor reducción de la materia seca sucede a menor tamaño de partícula. La variación por la aireación tiene una significación menor, lo que implica que la reducción solamente está en función del tamaño.

5.4.6. Variación en la concentración y cantidad de alcaloides

La concentración de alcaloides disminuyó para todos los tratamientos. Las diferencias significativas pueden atribuirse a la humedad, al tamaño de partícula y al nivel de aireación.

Para todos los tratamientos se obtuvo una disminución en la concentración superior al 50 %. El valor máximo de reducción fue del 75 % en el tratamiento de tamaño No. 6, H-60 y A-60 (Tabla 27). La disminución en la concentración llegó al 70 % solamente en H-60, de alta aireación y No. 6. Los tratamientos H-50 alcanzaron una disminución superior al 60 % solo en los medios quebrantados. En H-50 de partículas enteras se presentaron niveles inferiores al 60 % con una caída en A-20 que llegó hasta el 52 %.

La humedad tuvo un efecto significativo en la disminución de la concentración con una diferencia en promedio del 12 % más para el tratamiento más húmedo. Los porcentajes de incremento en la degradación para H-50 y H-60 fue de 6.87, 5.84 y 7.72 % en partículas enteras, No. 4 y No. 6 respectivamente. La humedad ha demostrado ser importante en la detoxificación, no obstante esta no es mejorada proporcionalmente por la presencia de un exceso de agua.

Tabla 25. Cantidad de oxígeno consumido y coeficiente respiratorio promedio en el proceso de fermentación con *R. oligosporus*.

Aireación (ml min ⁻¹)	Entero				No. 4				No. 6			
	H-50		H-60		H-50		H-60		H-50		H-60	
	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)	O ₂ (mg g MSI ⁻¹)	CR (mmol CO ₂ mmol O ₂ ⁻¹)
A-20	39.37±0.88	0.90±0.05	41.31±0.96	0.83±0.07	71.36±5.24	0.85±0.10	69.02±3.42	0.90±0.09	95.24±1.48	0.86±0.09	126.22±7.90	0.83±0.09
A-60	33.89±2.25	0.93±0.03	37.49±3.60	0.83±0.08	59.90±3.21	0.92±0.08	68.97±5.01	0.94±0.10	89.06±7.88	0.90±0.10	114.99±9.29	0.95±0.05
A-100	26.69±1.99	0.89±0.02	43.99±4.74	0.79±0.06	65.53±4.07	0.70±0.06	53.62±2.67	0.71±0.08	80.27±2.27	0.83±0.07	75.91±4.75	0.88±0.07

Tabla 26. Contenido de humedad y reducción de materia seca de los medios, punto inicial y después de 48 h de fermentación.

Humedad (%)						
Aireación (ml min ⁻¹)	Entero		No. 4		No. 6	
	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60
Inicial	49.95±0.11	60.02±0.81	49.23±0.04	59.45±1.83	50.71±0.63	59.19±1.72
A-20	50.28±0.57	61.63±0.67	52.91±1.29	61.51±0.19	52.13±0.71	62.84±0.29
A-60	50.40±0.33	61.34±0.42	51.93±0.19	61.13±0.45	53.06±0.32	63.51±1.17
A-100	50.50±0.83	61.01±0.47	52.30±0.83	60.56±0.83	52.96±0.18	61.69±1.34
Reducción de Materia Seca (%)						
Aireación (ml min ⁻¹)	Entero		No. 4		No. 6	
	H-50	H-60	H-50	H-60	H-50	H-60
A-20	2.25±0.20	2.19±0.25	3.32±0.42	3.39±0.27	4.05±0.30	5.24±0.26
A-60	2.44±0.22	2.59±0.21	4.28±0.52	4.32±0.44	4.60±0.69	5.57±0.95
A-100	2.72±0.50	3.43±0.30	4.04±0.23	4.30±0.64	4.51±0.55	5.10±0.85

El agua mejora los fenómenos difusivos requeridos para la movilidad molecular tanto de alcaloides como de las enzimas que los degradan.

Se observó que la concentración de alcaloides disminuye cuando el tamaño de partícula es menor. Para H-50 se calculó un incremento entre enteros hasta No. 4 y No. 6 de 7.55 y 2.35 % y para H-60 un incremento de 5.62 y 5.93 %. La reducción de tamaño es positiva para la degradación de alcaloides y al igual que experimentos anteriores su incidencia fue mayor que la humedad. Sin aireación, se había determinado la inconveniencia de hacer reducciones por debajo de No. 4. No obstante los valores de reducción de alcaloides revelan que en el No. 6 con aireación la degradación es mejorada. Sin embargo, las mayores diferencias de reducción se observan desde la partícula entera hasta el No. 6, y la reducción desde No 4 a No. 6 tiene una menor significación. Esto implica que al igual que la humedad, una reducción de tamaño excesiva no presenta avances contundentes en la degradación.

Con respecto a la aireación se observó la más baja disminución en la concentración de alcaloides en A-20. Pese a que se presentó un crecimiento adecuado, aparentemente la mayor concentración de CO₂ en estos medios afectó el desempeño del hongo en la eliminación. Por el contrario, los medios con más aireación presentaron una mayor disminución con porcentajes

ligeramente superiores para A-60 en relación a A-100. Esto podría sugerir que la degradación de los alcaloides depende de la aerobiosis del sistema. La reducción en la actividad enzimática por exceso de aireación se ha reportado lo cual podría explicar estos resultados (Spier, *et al.*, 2007). Aunque la diferencia observada es pequeña, puede inferirse que después de los 100 ml min⁻¹, la aireación comienza a jugar un papel negativo en la degradación.

La reducción de alcaloides totales en el medio se calculó como el producto de la concentración de alcaloides y la materia seca. Esto ubicó al tratamiento A-60, H-60 con partículas No. 6, como aquel donde se observó la mayor detoxificación. Estos resultados se ubican 7 puntos porcentuales por encima de la reducción obtenida en medios sin aireación. Se debe tener en cuenta que los ensayos sin aireación forzada se realizaron en partículas No. 4, medios en los cuales para el experimento con aireación se obtuvieron valores similares. Se puede concluir sobre la poca incidencia que tiene la aireación forzada en la degradación de alcaloides. El sistema de fermentación en columnas que favoreció la acumulación de CO₂, pudo provocar los resultados de los niveles A-20 bajando la detoxificación. La degradación de alcaloides es parte de un metabolismo aerobio que es afectado por las altas concentraciones de CO₂.

La relación entre la cantidad de CO₂ y los alcaloides totales puede expresarse a través del rendimiento $Y_{(CO_2/D)}$. Este se incrementa a medida que el tamaño de partícula disminuye. El valor de $Y_{(CO_2/D)}$ para H-60 es en promedio de 1.99±0.10, 2.82±0.07 y 3.69±0.13 mg CO₂ mg AT⁻¹ para partículas enteras, No. 4 y No. 6 respectivamente. El valor de Y refleja que la mineralización y la detoxificación ocurren a ritmos diferentes. Esto comprueba la inexistencia de un metabolismo específico para el catabolismo de los alcaloides y que las enzimas actúan sobre los alcaloides en paralelo al consumo de otras sustancias.

5.4.6.1. Disminución por cada alcaloide

La degradación de los alcaloides presentó diferencias en relación lo visto en experimentos con aireación estática. Se observó mayores niveles de eliminación en los tratamientos con partículas quebrantadas No. 6.

Tabla 27. Variación en la concentración y la cantidad de alcaloides después de 48 h de fermentación con *R. oligosporus*

Cotiledones Enteros							
Tratamiento	Concentración				Cantidad Totales		
	Totales (mg AT g MSI ⁻¹)	Identificados (mg A g MSI ⁻¹)	No Identificados (mg A g MSI ⁻¹)	Reducción (%)	Inicial (mg A columna ⁻¹)	Final (mg A columna ⁻¹)	Detoxificación (%)
INICIAL	44.02±5.10	40.19±4.45	3.83±0.65	0.00			
H-50 A-20	21.04±0.83	19.50±0.78	1.54±0.05	52.20	625.00±12.45	291.74±11.51	53.32
H-50 A-60	17.78±0.96	16.52±0.90	1.26±0.06	59.61	630.63±4.49	248.23±13.40	60.64
H-50 A-100	18.04±0.59	16.64±0.52	1.40±0.07	59.02	616.18±14.07	246.11±8.05	60.06
H-60 A-20	17.58±0.67	16.21±0.65	1.37±0.02	60.06	627.52±8.88	244.43±9.32	61.05
H-60 A-60	14.96±0.42	13.62±0.40	1.34±0.02	66.02	497.12±41.45	164.60±4.62	66.89
H-60 A-100	14.65±0.63	13.46±0.59	1.19±0.04	66.72	542.59±27.70	175.56±7.55	67.64
Cotiledones No. 4							
INICIAL	44.89±5.08	40.82±4.62	4.07±0.46	0.00			
H-50 A-20	18.15±0.44	16.85±0.41	1.30±0.03	59.57	564.27±28.02	218.91±5.31	61.20
H-50 A-60	17.18±0.82	15.79±0.72	1.39±0.10	61.73	567.74±69.61	209.42±10.00	63.11
H-50 A-100	16.87±0.95	15.58±0.86	1.29±0.09	62.42	657.69±31.93	238.26±13.42	63.77
H-60 A-20	15.01±0.79	13.88±0.73	1.13±0.06	66.56	534.79±26.83	171.51±9.03	67.93
H-60 A-60	13.75±0.22	12.42±0.20	1.33±0.02	69.37	572.46±35.93	167.76±2.68	70.69
H-60 A-100	14.50±0.44	13.34±0.42	1.16±0.02	67.70	610.23±35.56	192.81±5.85	68.40
Cotiledones No. 6							
INICIAL	45.97±4.35	42.77±6.88	3.20±0.29	0.00			
H-50 A-20	18.08±1.04	16.68±0.95	1.40±0.09	60.67	529.71±13.32	197.24±11.35	62.77
H-50 A-60	16.73±0.82	15.70±0.76	1.23±0.06	63.17	511.32±6.45	179.34±8.69	64.93
H-50 A-100	16.46±1.50	15.11±1.44	1.35±0.06	64.19	514.95±19.95	175.76±16.02	65.87
H-60 A-20	15.05±0.90	14.05±0.87	1.00±0.03	67.26	449.41±14.51	137.06±8.20	69.50
H-60 A-60	11.18±1.22	10.15±1.20	1.03±0.02	75.68	444.73±10.69	100.83±11.00	77.33
H-60 A-100	12.52±0.41	11.41±0.37	1.11±0.04	72.76	420.14±15.64	109.62±3.59	73.91

La máxima reducción para la lupanina se observó en los tratamientos A-60, H-60 en partículas No. 6, con una degradación del 79% (Tabla 28). Se observó valores de detoxificación superiores al 60% en la mayoría de tratamientos solo con valores inferiores en A-20. La aireación insuficiente parece afectar la degradación de este alcaloide.

Para la esparteína se observó una degradación máxima del 63% que se presentó en el menor tamaño de partícula, máxima humedad y A-60. Es el alcaloide menos degradado de todos los experimentos con valores alrededor del 55%. Esto también se presentó en medios sin aireación, aparentemente, la degradación de la esparteína es limitada frente a los demás alcaloides.

Tabla 28. Variación en la cantidad de cada alcaloide por unidad experimental después de 48 h de fermentación con *R. oligosporus*

Cotiledones Enteros									
Tratamiento	Lupanina (mg Lup columna ⁻¹)			Esparteína (mg Esp columna ⁻¹)			THR (mg THR columna ⁻¹)		
	Inicial	Final	Detoxificación (%)	Inicial	Final	Detoxificación (%)	Inicial	Final	Detoxificación (%)
H-50 A-20	318.32±35.07	157.80±10.40	50.43	147.94±17.04	81.67±3.88	44.80	64.17±6.82	17.19±0.28	73.21
H-50 A-60	321.19±35.38	125.93±7.54	60.79	149.28±17.19	81.39±3.21	45.47	64.75±6.88	16.06±0.42	75.21
H-50 A-100	313.83±34.57	127.42±6.91	69.40	145.86±16.80	74.62±3.00	48.84	63.27±6.72	11.60±0.27	81.67
H-60 A-20	319.61±35.21	131.81±9.32	58.76	148.54±17.11	77.03±4.45	48.14	64.43±6.84	10.57±0.28	83.60
H-60 A-60	253.19±27.89	77.46±2.86	69.41	117.67±13.55	59.86±1.65	49.13	51.04±5.42	6.05±0.22	88.14
H-60 A-100	276.35±30.44	86.28±2.88	68.78	128.44±14.79	66.75±2.76	48.03	55.71±5.92	5.75±0.36	89.68
Cotiledones No. 4									
H-50 A-20	288.86±32.68	116.15±1.57	59.79	136.13±15.46	68.39±1.21	49.76	50.91±5.78	6.75±0.36	86.73
H-50 A-60	290.64±32.88	113.49±3.66	60.95	136.97±15.56	65.34±1.71	52.30	51.22±5.82	6.46±0.12	87.39
H-50 A-100	336.69±38.09	130.36±6.21	61.28	158.67±18.02	73.58±5.23	53.63	59.34±6.74	7.63±0.56	87.15
H-60 A-20	273.77±30.97	90.38±8.57	66.99	129.02±14.65	56.90±1.37	55.90	48.25±5.48	4.46±0.23	90.76
H-60 A-60	293.05±33.16	87.36±1.83	70.19	138.11±15.69	56.73±2.56	58.92	51.65±5.87	2.81±0.37	94.57
H-60 A-100	312.39±35.34	103.98±3.06	66.71	147.22±16.72	65.02±1.99	55.83	55.06±6.25	2.66±0.40	95.17
Cotiledones No. 6									
H-50 A-20	276.44±40.45	98.29±2.07	64.44	133.09±17.98	66.33±2.73	50.16	48.74±6.57	7.31±0.87	78.23
H-50 A-60	266.84±39.04	95.76±3.71	64.11	128.47±17.35	62.60±3.07	51.27	47.05±6.34	6.67±0.11	85.82
H-50 A-100	268.73±39.32	97.38±3.84	63.76	129.38±17.47	57.66±2.56	55.43	47.38±6.39	3.42±0.64	92.79
H-60 A-20	234.53±34.31	74.59±6.74	68.20	112.91±15.25	48.54±2.00	57.01	41.35±5.57	1.91±0.36	95.38
H-60 A-60	232.09±33.96	47.89±1.98	79.37	111.74±15.09	44.77±1.62	63.52	40.92±5.51	1.98±0.18	95.15
H-60 A-100	219.26±32.08	53.41±5.95	75.64	105.56±14.26	41.94±1.05	60.27	38.66±5.21	2.10±0.18	94.56

Tabla 28. Continuación...

Cotiledones Enteros									
Tratamiento	4-HLup (mg HL columna ⁻¹)			13-HLup (mg HL columna ⁻¹)			Minoritarios (mg columna ⁻¹)		
	Inicial	Final	Detoxificación (%)	Inicial	Final	Detoxificación (%)	Inicial	Final	Detoxificación (%)
H-50 A-20	25.27±2.70	8.46±0.69	66.53	14.91±1.56	5.27±0.28	64.66	54.38±2.13	21.35±0.69	60.73
H-50 A-60	25.50±2.72	5.03±0.14	80.29	15.04±1.58	2.23±0.14	85.15	54.87±2.15	17.59±0.84	62.94
H-50 A-100	24.92±2.66	8.46±0.27	66.05	14.70±1.54	4.91±0.27	86.58	53.61±2.10	19.10±0.95	64.37
H-60 A-20	25.37±2.71	4.45±0.14	82.47	14.97±1.57	1.53±0.28	89.78	54.60±2.14	19.05±0.28	65.11
H-60 A-60	20.10±2.15	4.51±0.22	77.56	11.86±1.24	1.98±0.11	83.30	43.25±1.69	14.74±0.22	65.91
H-60 A-100	21.94±2.34	1.56±0.12	92.90	12.94±1.36	0.96±0.12	92.59	47.21±1.85	14.26±0.48	69.79
Cotiledones No. 4									
H-50 A-20	19.86±2.26	6.15±0.48	69.03	17.35±2.01	5.79±0.48	66.63	51.16±5.78	15.68±0.36	69.35
H-50 A-60	19.98±2.28	3.05±0.24	84.75	17.45±2.02	4.14±0.37	76.25	51.48±5.82	16.94±1.22	67.08
H-50 A-100	23.15±2.64	3.81±0.56	83.53	20.22±2.34	4.66±0.28	76.95	59.63±6.74	18.22±1.27	69.45
H-60 A-20	18.82±2.14	5.48±0.23	70.86	16.44±1.91	1.37±0.23	91.66	48.49±5.48	12.91±0.69	73.37
H-60 A-60	20.15±2.30	3.42±0.24	83.05	17.60±2.04	1.22±0.12	93.07	51.90±5.87	16.23±0.24	68.74
H-60 A-100	21.48±2.45	3.99±0.66	81.43	18.76±2.18	1.73±0.13	90.79	55.33±6.25	15.42±0.27	72.12
Cotiledones No. 6									
H-50 A-20	22.82±3.11	5.56±0.55	75.61	11.75±1.61	1.20±0.22	89.79	36.87±3.34	15.27±0.98	68.58
H-50 A-60	22.02±3.00	1.64±0.11	92.11	11.35±1.56	0.64±0.11	84.40	35.59±3.23	13.03±0.64	63.39
H-50 A-100	22.18±3.02	1.27±0.21	93.19	11.43±1.57	1.82±0.21	84.11	35.85±3.25	14.42±0.64	59.79
H-60 A-20	19.36±2.64	1.82±0.09	90.59	9.97±1.37	1.09±0.18	89.04	31.28±2.84	9.11±0.27	70.89
H-60 A-60	19.16±2.61	1.31±0.18	93.01	9.87±1.35	0.90±0.09	90.86	30.96±2.81	9.29±0.18	69.99
H-60 A-100	18.10±2.47	1.49±0.09	91.77	9.32±1.28	0.96±0.10	89.67	29.25±2.65	9.72±0.35	66.77

Para la tetrahidrorombifolina (THR) se observaron valores altos de degradación registrándose el 95%. Esta situación es particular ya que en experimentos sin aireación se observó una menor degradación. La eliminación fue mejorada en presencia de mayor cantidad de oxígeno, indicando que la aerobiosis del medio mejora su degradación.

Un comportamiento similar se observó con la 4-hidroxilupanina que mostró más detoxificación que en medios sin aireación, logrando una eliminación del 93%. Un comportamiento similar se observó en la 13-hidroxilupanina con un 90%, lo que permite deducir sobre el efecto del oxígeno en la degradación. Como se ha reportado el *Rhizopus* tiene varias etapas que comprenden una aerobia y una fermentativa (Miszkiewicz *et al.*, 2004). La primera se caracteriza por una aerobiosis donde se favorece la degradación de los alcaloides. Esta es prolongada y permite la mayor degradación de los alcaloides, retrasando la etapa de fermentación donde la degradación es baja. La hidroxilación de la lupanina podría mejorarse con la extensión de la etapa aerobia.

Finalmente en los alcaloides no identificados se presentó una degradación de alrededor del 65% en las partículas más pequeñas y de mayor humedad. Estos alcaloides tuvieron una degradación intermedia respecto a los demás alcaloides. Esto se observó ligeramente por debajo en los experimentos sin aireación. Se puede inferir que hay alcaloides cuya biodegradación es más compleja y no se adaptan a las rutas metabólicas del hongo.

5.5. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS: EFECTO DEL TIEMPO, TAMAÑO DE PARTÍCULA Y TEMPERATURA EN LA DETOXIFICACIÓN

La fermentación en tempeh puede realizarse durante 24, 36 o 48 h dependiendo de las condiciones de elaboración. En el lupino se ha reportado que la fermentación con *R. oligosporus* elimina porcentajes del 90 % en 48 h y en cotiledones enteros (Jiménez *et al.*, 2007), razón por la los experimentos se planearon a ese tiempo. Sin embargo, no se alcanzaron estos niveles de degradación, razón por la cual se decidió hacer estudios después de las 48 h. Para esto se hicieron medios con las características donde se presentó la

mayor reducción en la concentración de alcaloides en las 48 h. Se prepararon columnas para una cinética por triplicado de 96 h, con medio con 60 % de humedad, un tamaño No. 6 y una aireación de 60 ml min⁻¹.

5.5.1. Respiración del hongo durante 96 h

La producción de dióxido de carbono mostró variaciones de la fermentación durante las 96 h (Figura 22). La cantidad de CO₂ producido en cada hora (dCO₂/dt) disminuyó en un 38.32 % después de las 48 h. Esta reducción puede ser respuesta a un agotamiento de las fuentes de carbono útiles para el hongo, aunque, los cotiledones sean una fuente elevada de nutrientes. Otra causa probable es la disminución de la actividad metabólica y la ocurrencia de procesos anaerobios (Rajardjo, 2005). Finalmente la disminución en la respiración puede deberse al cambio en el metabolismo inicialmente aerobio, transformándose a anaerobio al interior de la partícula cuando la aireación es bloqueada por la acumulación de micelio sobre la superficie. Aunque la autólisis puede presentarse para la supervivencia de las capas superiores, las inferiores al interior dependen de la fermentación anaerobia. (Anexo 6).

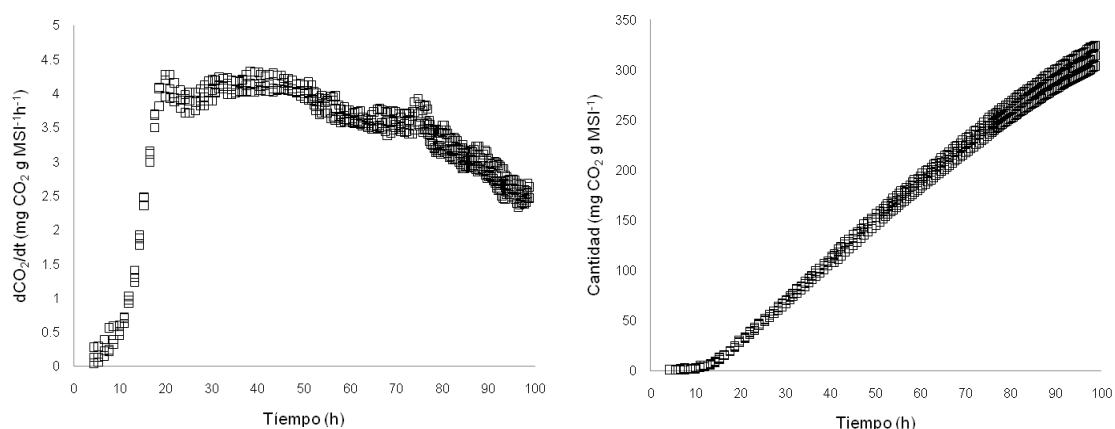


Fig. 22. Cantidad de dióxido de carbono producido durante 96 h de fermentación

La máxima producción de CO₂ lograda en las 96 h fue de 313.88 mg g MSI⁻¹ que equivale a una mineralización de 15.31 %. Se calculó una μ promedio de 0.4795 h⁻¹ que es similar a los valores obtenidos para los experimentos en 48 h. La mineralización se incrementa desde el 2.44, 7.05 y 11.56 % que corresponde a una producción de CO₂ de 49.97, 144.60 y 236.95 mg CO₂ g MSI⁻¹ en las 24, 48 y 72 h respectivamente.

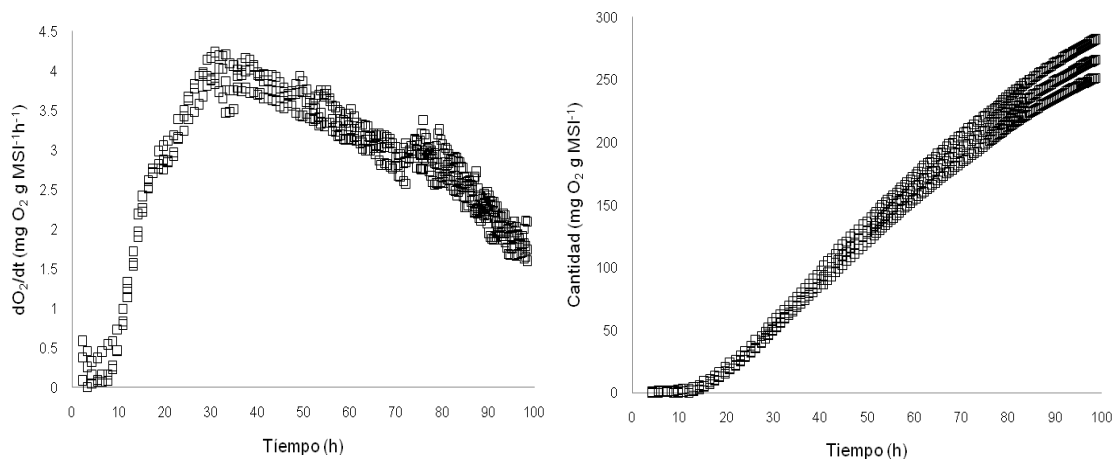


Fig. 23. Cantidad de oxígeno consumido durante 96 h de fermentación

El oxígeno siguió una tendencia similar a la producción de CO_2 , variando principalmente en el tiempo en el cual se alcanzó el máximo consumo (Figura 23). Para el oxígeno este punto fue a las 31 h, 11 horas después del punto máximo del CO_2 , que se presentó a las 20 h. A las 30 h se observó en la gráfica de CO_2 un segundo incremento correspondiente a otro punto máximo que significa el consumo de otra fuente de carbono. La coincidencia con el máximo del oxígeno, implica que la oxidación de materia orgánica en este momento demanda una mayor captación de oxígeno.

El coeficiente respiratorio presentó un comportamiento similar a lo ya observado hasta las 48 h (Figura 24). Posteriormente el CR se incrementó en promedio desde 0.9 hasta 1. Esta variación se produce por el cambio metabólico, que se caracterizó por la disminución en la producción de CO_2 debido posiblemente al consumo de otras fuentes de carbono.

5.5.2. Variación en el pH

La variación en el pH es similar a lo observada en experimentos anteriores hasta 48 h tanto en agar como en cotiledones (Figura 25). La hidrólisis proteica provoca la producción de amoníaco lo que conlleva al incremento del pH. El valor de pH que inició con 5.48 ± 0.01 alcanzó un valor de 6.78 ± 0.08 en las

primeras 24 h, período en el cual se presentó el incremento más fuerte. Hasta las 48 h con un incremento menor en comparación al anterior se llegó a 7.11 ± 0.09 . En la hora 72 se obtuvo un pequeño incremento llegando a un pH de 7.20 ± 0.05 y a la hora 96 el pH se ubicó en 7.32 ± 0.06 . La velocidad de incremento del pH después de la hora 24 es lenta, y superior a 7 finalizando las 96 h, el pH se constituye en un inhibidor del crecimiento.

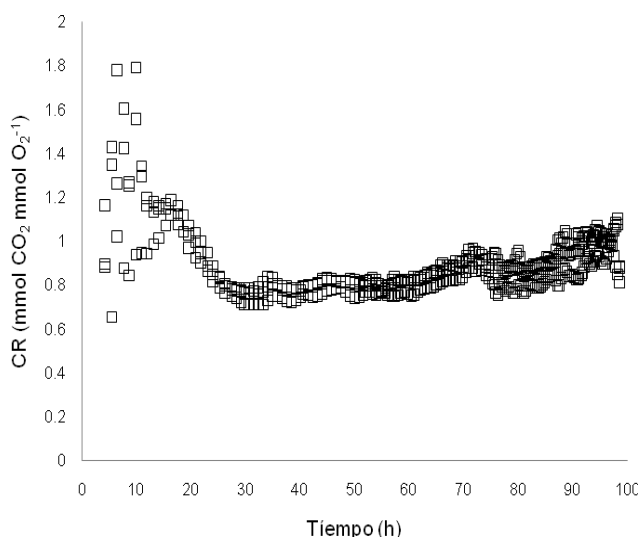


Fig. 24. Evolución del coeficiente respiratorio durante 96 h de fermentación

Las razones del comportamiento del pH después de las 24 h, serían la desaceleración del crecimiento y el metabolismo provocado por el mismo incremento del pH en la proteólisis. La incapacidad de los tratamientos químicos para detener su incremento sin control, podría constituir un fenómeno de inhibición del crecimiento por los productos amoniacaes generados.

Adicional a la utilización de ácido para tratar de controlar el pH, se realizaron pruebas preliminares utilizando sulfato de amonio (1, 1.5 y 2 %). Los resultados negativos obtenidos demostraron la imposibilidad para contener el incremento del pH. El pH está relacionado con el crecimiento y la degradación, por tanto sus variaciones afectan la velocidad de detoxificación después de las 24 h.

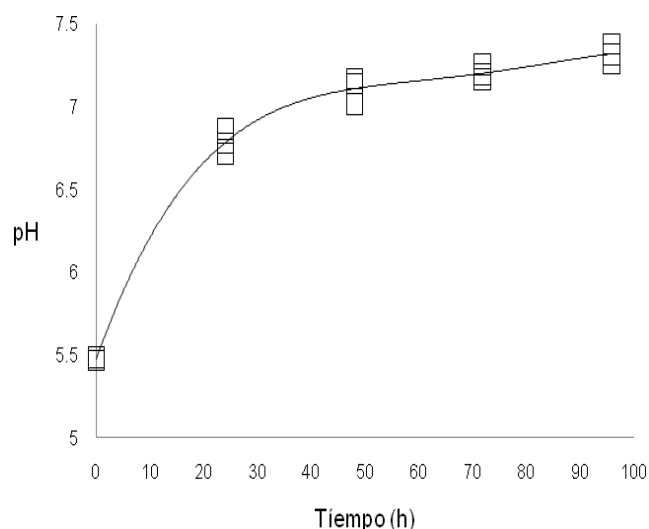


Fig. 25. Variación del pH en el tiempo durante 96 h de fermentación

5.5.3. Variación en la detoxificación

La concentración de los alcaloides presentó un comportamiento similar a lo observado durante las primeras 48 h. La mayor tasa de degradación se observó durante las primeras 24 h y cuando se llegó a las 48 se alcanzó el 72 % de reducción. En las siguientes 24 h la concentración continuó bajando en un 7.25 %. Hasta completar las 96 h se observó una pequeña disminución equivalente a 1.05 %. Se puede afirmar que es probable que la degradación de los alcaloides se reduzca a su mínima tasa y comience su detención después de las 72 h (Tabla 29). (Anexo 7)

La cantidad de alcaloides totales pasó desde 589.47 a 90.40 mg A columna⁻¹, que representa una detoxificación del 84 %. El alcaloide más eliminado fue la THR llegando a un 97 %, para el que se observó una reducción continua en los 96 h. De igual forma para la 4-HLup se que registró altos niveles de degradación con un 93 %, aunque se incrementó en las 72 h. Lo mismo se observó en la 13-Hlup que presentó un ligero incremento en la hora 72 y terminó a las 96 h con una reducción del 87 %. La hidroxilación de la lupanina en su degradación puede ser la razón por la que se presenta el comportamiento oscilante en las hidroxilupaninas.

La lupanina llegó a un 87 % de eliminación a una velocidad creciente hasta la hora 72. La mayor degradación se presentó en las primeras 48 h y hasta las 72 h se observó el 11.92 % de degradación lo que explicaría la acumulación en las hidroxilupaninas que están pendientes de ser eliminadas. Posteriormente se presentó una disminución del 1.51 %, que refleja la rebaja drástica en la detoxificación después de las 72 h.

El alcaloide menos eliminado es la esparteína que llegó después de 96 h a una eliminación del 72 %. Este comportamiento ha sido permanente en los experimentos evidenciando que este alcaloide es la sustancia que más dificultad presenta para su degradación.

Los alcaloides minoritarios tienen un comportamiento diferente. Se observó una degradación total del 82 % en 96 h, aunque hubo ligeros incrementos en las 48 y 72 h. Estos pueden ser derivados de la degradación de los alcaloides mayoritarios, fenómeno observado en los demás experimentos.

Los puntos de máxima producción de CO₂ se presentaron aproximadamente a las 18 h de fermentación. Esto coincide con el tiempo donde se logró la mayor detoxificación que estuvo dentro de las primeras 24 h. Por tanto el metabolismo de mineralización de la materia orgánica está implicado directamente en la degradación de los alcaloides.

Los datos de alcaloides totales se ajustaron con la ecuación de Luedeking-Piret con base en la producción de CO₂ en las 96 h (Soto-Cruz, *et al.*, 2002). Se obtuvo un R² de 0.84 y los valores de α y β fueron de 2.411 y -0.132 respectivamente. El valor de α confirma la relación directa entre la degradación de los alcaloides y la producción de CO₂ cuyo incremento es análogo a la etapa de crecimiento. Posterior a esta etapa la degradación fue muy lenta y al final incipiente, lo que se refleja en los valores de β . Resultados similares para ambas variables se obtuvieron en los experimentos con agar reflejando la congruencia de los resultados de ambos experimentos.

Frente a los resultados obtenidos por Jiménez *et al.* (2007), se presentaron diferencias y similitudes. El perfil de alcaloides en la muestra fue diferente a lo que se obtuvo en nuestro análisis. Posiblemente aunque sea la misma especie

de *Lupinus mutabilis* los experimentos pudieron realizarse en ecotipos diferentes. Entre las similitudes estuvieron la disminución de la concentración de alcaloides totales durante la fermentación que equivale al 86 %. Esta reducción se reportó durante 48 h, mientras que el 84 % reportado en los presentes experimentos se logró después de 96 h. Diferencias en la preparación del medio pueden ser las responsables de las variaciones. El 91 % de eliminación reportado por Jiménez *et al.* (2007), se calculó desde los procesos previos realizados para el acondicionamiento de los cotiledones (remojo y cocción). En nuestros experimentos la disminución de alcaloides provocada por estos tratamientos fue imperceptible ya que los procesos de acondicionamiento fueron diferentes. No se presentaron pérdidas de alcaloides por remojo y el tratamiento térmico fue de solamente 5 min, tiempo en el cual no se pudieron detectar diferencias significativas.

5.5.4. Relación entre producción de CO₂, alcaloides consumidos y detoxificación

El estudio de 96 h reveló que la detoxificación se produce a una tasa constante durante las primeras 24 h (Figura 26). A partir de este tiempo no se observa la misma tasa de detoxificación llegando en la parte final una fase estacionaria. Sin embargo se observó que la producción de dióxido de carbono continúa incrementándose a una tasa constante hasta las 96 h. La detoxificación es favorecida en la primera parte del crecimiento del hongo y en las etapas posteriores, la biomasa presente continúa mineralizando la materia orgánica, pero con una baja detoxificación. Los alcaloides consumidos fue mayor a las 24 h y después de este tiempo se observó una caída gradual.

Pese a que la fermentación continuó activa durante todo el periodo del ensayo, la detoxificación tuvo una tendencia a disminuir. Por lo tanto tiempos prolongados de fermentación no contribuyen proporcionalmente con la detoxificación. Por el contrario afectan sensiblemente el contenido de materia seca de los cotiledones ya que esta se pierde a través de la mineralización.

Tabla 29. Cinética de variación en la concentración y cantidad de alcaloides durante 96 h de fermentación con *R. oligosporus*

Concentración de Alcaloides									
Tiempo (h)	Totales (mg AT g MSI ⁻¹)	Identificados (mg A g MSI ⁻¹)	No Identificados (mg A g MSI ⁻¹)	Disminución (%)	THR (mg THR g MSI ⁻¹)	4 HLup (mg HL g MSI ⁻¹)	13 HLup (mg HL g MSI ⁻¹)	Esparteína (mg E g MSI ⁻¹)	Lupanina (mg L g MSI ⁻¹)
0	47.32±3.36	46.39±3.32	0.93±0.04	0.00	4.10±0.40	1.52±0.17	0.91±0.10	13.09±0.57	26.77±1.79
24	23.24±2.10	22.32±2.02	0.92±0.08	50.89	0.62±0.05	0.22±0.01	0.34±0.06	8.29±0.37	12.84±1.17
48	13.17±1.46	13.03±1.43	0.14±0.03	72.17	0.14±0.02	0.13±0.01	0.15±0.01	4.91±0.29	7.69±0.55
72	9.74±1.05	9.51±1.02	0.23±0.03	79.42	0.13±0.01	0.19±0.02	0.25±0.02	4.71±0.35	4.23±0.54
96	9.24±0.84	9.03±1.20	0.21±0.04	80.47	0.11±0.02	0.12±0.01	0.14±0.03	4.53±0.27	4.12±0.52
Cantidad de Alcaloides									
Tiempo (h)	Totales (mg AT Colum ⁻¹)	Identificados (mg A Colum ⁻¹)	No Identificados (mg A g Colum ⁻¹)	Detoxificación (%)	THR (mg THR Colum ⁻¹)	4 HLup (mg HL Colum ⁻¹)	13 HLup (mg HL Colum ⁻¹)	Esparteína (mg E Colum ⁻¹)	Lupanina (mg L Colum ⁻¹)
0	589.47±41.86	577.90±41.36	11.57±0.50	0.00	51.09±4.98	18.88±2.12	11.33±1.25	163.08±7.10	333.51±22.30
24	286.58±25.90	275.22±24.91	11.37±0.99	51.38	7.67±0.62	2.74±0.12	4.25±0.74	102.24±4.56	158.32±14.43
48	145.82±16.16	144.32±15.83	1.50±0.33	75.26	1.59±0.22	1.48±0.11	1.71±0.11	54.42±3.21	85.12±6.09
72	104.54±11.27	102.08±10.95	2.46±0.32	82.27	1.45±0.11	2.08±0.21	2.64±0.21	50.54±3.76	45.38±5.80
96	90.40±12.13	88.33±11.74	2.07±0.39	84.66	1.08±0.20	1.16±0.10	1.40±0.29	44.36±2.64	40.33±5.09

5.5.5. Efecto de un menor tamaño de partícula en la detoxificación

El tamaño de partícula afecta la eliminación de alcaloides en todos los tratamientos. Entre los tamaños entero, No. 4 y No. 6 se presentaron diferencias en la disminución de la concentración equivalentes a 4.71 y 4.43% respectivamente. Evidentemente se observó un mayor nivel de degradación en el medio con el menor tamaño de partícula. No obstante, se realizaron ensayos preliminares en columna con partículas de menor tamaño al No. 6. Para esto se estandarizó en tamaño No. 12 con H-60 y A-60. El experimento se realizó en columnas de 1 cm de diámetro en las condiciones de temperatura estandarizadas para todos los experimentos.

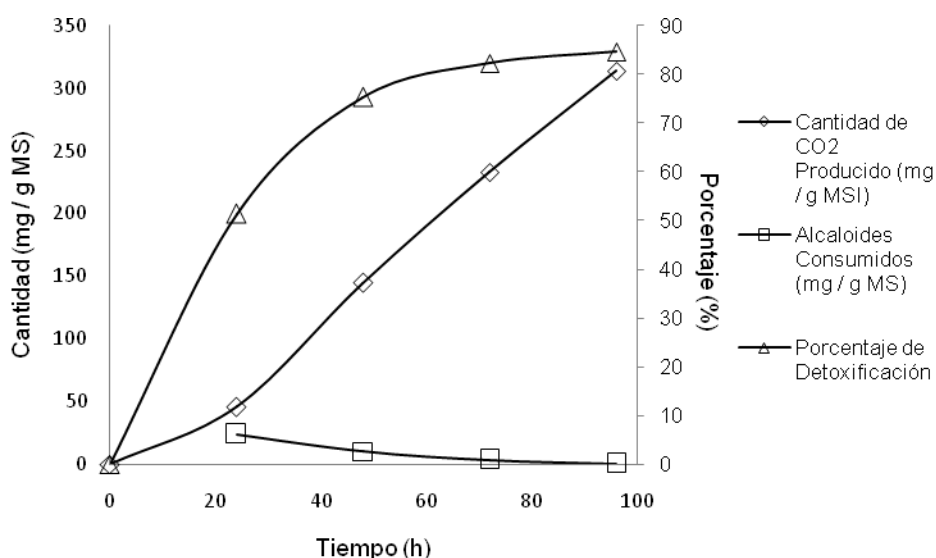


Fig. 26. Relación entre producción de CO₂, alcaloides consumidos y detoxificación

Los resultados demostraron que el menor tamaño de partícula afecta la disminución en la concentración de los alcaloides. Comparando las concentraciones obtenidas después de 96 h en los medios No. 6 y No. 12, se observó un 13.53% más de concentración para el medio No. 12. La concentración en este medio pasó de 44.02 ± 5.1 mg AT g MSI⁻¹ a 10.49 ± 1.07 mg AT g MS⁻¹; frente a 9.24 ± 0.84 mg AT g MS⁻¹ obtenido para el medio No. 6. Este resultado pudo deberse a las limitaciones de crecimiento en el interior del lecho. Las partículas de menor tamaño a un elevado contenido de humedad se compactan fácilmente impidiendo el crecimiento. Por tanto se concluyó que el

tamaño de partícula No. 6 es adecuado para el crecimiento del hongo y en este se obtiene la mayor reducción de alcaloides.

5.5.6. Efecto de una mayor temperatura en la detoxificación

Un ensayo de fermentación se realizó en columnas con partículas enteras y quebrantadas No. 4, durante 48 h y a 30° C. La biodegradación de los alcaloides se observó en ambos tratamientos, no obstante, los niveles se encontraron muy por debajo de lo que se había obtenido en los experimentos previos. La concentración inicial de alcaloides fue de 40.10 ± 3.05 mg AT g MS⁻¹ y finalizó en 35.04 ± 0.79 mg AT g MS⁻¹ para semillas enteras y de 30.26 ± 0.54 mg AT g MS⁻¹ para el material quebrantado. La eliminación para las primeras fue de 12.60% mientras que para las segundas se calculó una eliminación del 24.52%. Esos niveles están muy por debajo de experimentos anteriores, en los cuales se ha superado el 70 % de eliminación. Probablemente la biodegradación de los alcaloides se limitó por el estrés generado por el exceso de temperatura y se evidenció en el microorganismo por el escaso crecimiento de micelio y por la excesiva esporulación.

6. CONCLUSIONES

El proceso de fermentación cambia con las condiciones del proceso. En orden de importancia el pH, el tamaño de partícula y la humedad influyen en la detoxificación. La aireación contribuye a la degradación de alcaloides minoritarios. En el sistema no se observaron signos de inhibición a causa de los alcaloides. Aunque las condiciones para el hongo fueron óptimas, la detoxificación no alcanza a los niveles de consumo alimentario, debido a la dificultad para controlar efectivamente las variaciones sufridas por el medio.

Los valores de pH estudiados permiten el crecimiento del hongo y el consumo de materia seca en diferentes fases. En pH 3.5 la detoxificación se reduce a una tercera parte de lo logrado en el pH de 5.5 y es la lupanina la sustancia más degradada. Aunque no hay evidencia contundente que esclarezca la ruta metabólica seguida en el proceso de degradación, la detoxificación puede estar relacionada con el catabolismo de los glúcidos cuya máxima actividad se encuentra en pH 5.5 y en las primeras 24 h.

El tamaño de partícula tiene una mayor incidencia que la humedad en la degradación de los alcaloides y en el crecimiento, aunque ambas son determinantes en el proceso. La fermentación requiere que el medio tenga una humedad mínima del 50 % y partículas con tamaño entre 5 y 5.7 mm. En la fermentación hay una disminución aproximada del 5 % de materia seca. No se evidenciaron signos de inhibición del crecimiento que puedan ser atribuidos a los alcaloides en esta concentración.

El tamaño de partícula tiene una mayor incidencia que la humedad en la degradación de los alcaloides y en el crecimiento, aunque ambas son determinantes en el proceso. La fermentación requiere que el medio tenga una humedad mínima del 50 % y partículas con tamaño entre 5 y 5.7 mm. En la fermentación hay una disminución aproximada del 5 % de materia seca. No se evidenciaron signos de inhibición del crecimiento que puedan ser atribuidos a los alcaloides en esta concentración.

La aireación forzada tiene un aporte limitado en la eliminación de los alcaloides. Mientras la atmósfera del reactor provea de oxígeno y evacúe el CO₂ la detoxificación continuará. No obstante la presencia de oxígeno en una mayor proporción contribuye a la degradación de los alcaloides minoritarios. Sin embargo, el exceso de aireación contribuye a la hidratación del medio y aumenta la mineralización. La lupanina y la esparteína, se degradan de similar forma a los medios sin aireación. La THR y las hidroxilupaninas incrementan su degradación por la mayor disponibilidad de oxígeno en el medio.

La detoxificación puede relacionarse mejor con el consumo de materia seca y la ecuación puede utilizarse para predecir el comportamiento del proceso. Los valores de α y β de la ecuación de Ludueking-Piret confirman que la detoxificación sucede en la etapa de crecimiento concordando con las observaciones experimentales.

La fermentación posterior a las 48 h tiene un beneficio limitado en la detoxificación. La degradación de los alcaloides disminuye después de las primeras 48 h. En el proceso se reduce excesivamente el contenido de materia seca afectando el rendimiento, la calidad nutricional y organoléptica.

La fermentación de los cotiledones de lupino con el *R. oligosporus*, podría considerarse como una alternativa de detoxificación parcial. El mejoramiento de la detoxificación está en la identificación de las rutas metabólicas implicadas en el proceso. Esto permitirá diseñar estrategias de mejoramiento de las expresiones genotípicas o fenotípicas relacionadas con la degradación de los alcaloides.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adawy, TA, El, Rahma, EH, AA, Bedawey, El, Gafar, AF, (2001). Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*. 74, 455-462.
- Agropanorama, (2012). Producción mundial de soja 2011/12. Disponible en <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Soja.htm>
- Angel-Cuapio, RA, Hernández-Rodríguez, BE, Favela-Torres, E, (2002). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de Lipasas por hongos termotolerantes. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- ASAE, (American Society of Agricultural Engineers), (1986). Method of determining and expressing fineness of feed material by sieving. Hahn R.H. y Rosentreter E. E. (eds.), 3ra Edition. Asae Standards S319.1.
- Avelup Ltda., (2007). Derivados de Lupino alimentos de excelentes cualidades nutritivas. Documento disponible en <http://www.avelup.cl/index.html>
- Bartolome, B, Estrella, I, Hernandez, MT, (2000). Interaction of low molecular weight phenolics with protein (BSA). *Food Chemistry Toxicology*.
- Beaudin, N, Caron, RF, Legros, R, Ramsay, J, Lawlor, L, Ramsay, B, (1996). Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost science & utilization*. 4, (2)
- Bernal de Ramírez, I, (1994). Análisis de alimentos. Academia Colombina de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. *Colección Julio Carrizosa Valenzuela No.2*. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia.
- Blanner, LJ, Flengmark, P, Gylling, M, Itenov, K, (2002). Lupin seed (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*) as a protein source for fermentation use. *Industrial Crops and Products*. 18, 199-211.
- Butler, WH, Ford, GPT, Creasy, DM, (1996). A 90-day feeding study of Lupin (*Lupinus angustifolius*) flour spiked with lupin alkaloids in the rat. BIBRA International, Woodmansterne Road, Carshalton, Surrey SM5 4DS, UK.
- Caicedo, C, Peralta, E, Villacrés, E, Rivera, M, (2001). Postcosecha y mercado de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. INIAP, publicación miselánea No. 105. Quito Ecuador.
- Cochrane, VW, (1958). *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. p 524.
- Codex stand, (1989). Norma del Codex para Legumbres. Documentos disponibles es <http://www.codexalimentarius.net>.

De la Vega, RMP, Gutierrez, C, Sanz, R, Calvo, LM, Robredo, C, De la Cuadra, M, Muzquiz, M, (1996). Bactericide-like effect of *Lupinus* alkaloids. CIT-INIA, Alcala de Henares, Spain.

De Reu, JC, Ramdaras, D, Rombouts, FM, Nout, MJR, (1994). Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. Food Chemistry. 50, 171-175.

Dinero: Diario de Negocios, (2007). El chocho expande su mercado. Publicado el 20 de febrero del 2007. Quito, Ecuador.

Dini, I, Schettino, O, Dini, A, (1998). Studies on the constituents of *Lupinus mutabilis* (Fabaceae). Isolation and characterization of two new isoflavonoid derivatives. Journal Agriculture Food Chemistry. 46, 5089-5092.

Doyle, J, Pavel, R, Barness, G, Steinberger, Y, (2006). Cellulase dynamics in a desert soil. Soil Biology & Biochemistry. 38, 371-376.

DuPont, MS, Muzquiz, M, Estrella, I, Fenwick, GR, Price, KR, (1993). Relationship between the sensory properties of Lupin seed with alkaloid and tannin content. Journal Science Food Agriculture. 65, 95-100.

Feng, X, Mei, L, Thomas, O, Schnürer, J, (2007). Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. International Journal of Food Microbiology. 113, 133-141.

Figuroa Gómez, RM, Reynoso, MM, Reyes Velázquez, WP, (2005). Evaluación del uso de alcaloides derivados del *Lupinus* como fungicida en el control de *Fusarium verticillioides*. Laboratorio de Residuos Tóxicos II, Depto de Salud Pública, CUCBA, UDG. México

FAO, Food Agriculture Organization, (2007). Tarwi o Chocho, (*Lupinus mutabilis*). Documento disponible en http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap03_1_3.htm

Geisseler, D, Horwath, WR, Scow, KM, (2011). Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. Pedobiologia. 54, 71-78.

Greiner, R, (2001). Properties of phytate-degrading enzymes from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *Amiga*). In AEP (Eds.), Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products. Fourth European conference on grain legumes. Cracow, Poland

Gross, R, (1982). El cultivo y la utilización del Tarwi. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal, No 36, Roma, Italia.

Gross, R, Von, Baer, E, Koch, F, Marquard, R, Trugo, LA, Wink, M, (1988). chemical composition of a new variety of the andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. *Inti*) with low-alkaloid content. Journal of Food Composition and Analysis. 1, 353-361.

Gross, R, Koch, F, Malaga, I, De Miranda, AF, Schoeneberger, H, Trugo, LC, (1989). Chemical composition and protein quality of some local andean food sources. *Food Chemistry*. 34, 25-34.

Haddad, J, Greiner, R, Allaf, K, (2006). Effect of instantaneous controlled pressure drop on the phytate content of lupin. *LWT*. 40, 448-453.

Han, B, Kiers, JL, Nout, RMJ, (1999). Solid-Substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus spp.* comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88, 2, 205-209.

Hatzold, T, Elmadfa, I, Gross, R, Wink, M, Hartmann, T, Witte, L, (1983). Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemical*. 31, 934-930.

Hawthorne, W, (2006). Pulses nutritional value and their role in the feed industry. Grains Research and Development Corporation. Australia.

Hernández, L, Ana, N, Bautistas, BS, Velásquez del Valle, MG, (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Fitotecnia*. 30, 2, 119-123.

Holker, U, Lenz, J, (2005). Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*. 8, 301-306.

Hopper, DJ, Rogozinski, J, Toczko, M, (1991). Lupanine hydroxylase, a quinocytochrome c from an alkaloid-degrading *Pseudomonas sp.* *Biochemistry Journal*. 279, 105-109.

Ikasari, L, Mitchell, DA, (1994). Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10, 320-324.

Ikasari, L, Mitchell, DA, (1996). Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19, 171-175.

INDAP, (2007). Productores de lupino finalizan con éxito experiencia de encadenamiento productivo. Disponible en www.indap.gov.cl o en www.chilepotenciaalimentaria.cl.

ILC, International Lupin Conference, (2005). Feed & Food, Grain specifications and suppliers. Documento disponible en <http://www.lupins.org/feed/>

Jacobsen, SE, Mujica, Á, (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Real de Agricultura y Veterinaria, Taastrup, Dinamarca. Universidad Nacional del Altiplano, Perú.

Jacobsen, SE, Sherwood, S, (2002). Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Cultivo de Granos Andinos en Ecuador. Ediciones Abaya-yala.

Jennessen, J, Nielsen, KF, Houbraken, J, Lyhne, EK, Schnürer, J, Frisvad, JC, Samson, RA, (2005). Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1833-1840.

Jiménez-Martínez, C, Hernández-Sánchez, H, Álvarez-Manilla, G, Robledo-Quintos, N, Martínez-Herrera, J, Dávila-Ortiz, G, (2001). Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 421-428.

Jiménez-Martínez, C, Hernández-Sánchez, H, Dávila-Ortiz, G, (2007). Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species of *Lupinus* and soybean seeds by the effect of *Rhizopus oligosporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1315-1322.

Jurus, AM, Sundberg, WJ, (1976). Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybeans in Tempeh. *Applied and Environmental Microbiology*. 2, 284-287.

Kuswanto, KR, (2004). Industrialization of tempe fermentation. Gadjah Mada University. Indonesia.

López De Romana, G, Graham, GG, Morales, E, Massa, E, Maclean, WC, (2007). Protein quality and oil digestibility of *Lupinus mutabilis*: metabolic studies in children. *Journal of Nutrition.org*. 1, 773-778.

Luedeking, R, Piret, EL, (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1, 393-412.

Manjunath, P, Shenoy, BC, Rao, MR, (1983). Review: fungal glucoamylases. *Journal of Applied Biochemistry*. 5, 235-260.

Martínez-Covalada, HJ, González-Duitama, ED, (2005). La cadena de oleaginosas, grasas y aceites en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Observatorio Agrocalendas Colombia.

Medwin, RD, Grant, DW, (1984). Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. *Applied and Environmental Microbiology*. 48, 6, 1067-1071.

MINAGRICULTURA, Ministerio de Agricultura del Perú, (2008). Estadísticas Nacionales de Producción Agropecuaria. Disponible en www.portalagrario.gob.pe

MINCOMER, Ministerio de Comercio Industria y Turismo de Colombia, (2011). Importaciones Colombianas y Balanza Comercial, Reporte Enero-Octubre 2011. Disponible en www.portalagrario.gov.co

Miskiewicz, H, Bizukoje, M, Rozwandowicz, A, Bielecki, S, (2004). Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in

solid state fermentations. Electronic journal of Polish agricultural universities Biotechnology. 7, 1.

Mitchell, DA, Von-Meien, OF, Krieger, N, (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. Biochemical Engineering Journal. 13, 137–147.

Mitchell, DA, Von-Meien, OF, Krieger, NH, Dalsenter, FD, (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 17, 15-26.

Mitchell, DA, Srinophakun, P, Krieger, N, Von Meien, OF, (2006). Group II bioreactors: forcefully-aerated bioreactors without mixing. En: Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovic, M. (Eds.), Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation. Springer, Heidelberg. 77-94

Muzquiz, M, Burbano, C, Cuadrado, C, De La Cuadra, C, (1993). Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas, I: Alcaloides. Investigacion Agropecuaria: Produccion de Proteina Vegetal, 8, 3.

Muzquiz, M, Burbano, C, Pedrosa, MM, Folkman, W, Gulewicz, K, (1999). Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides Preparative method for their isolation and purification. Industrial Crops and Products. 19, 183–188.

Muzquiz, M, Pedrosa, MM, España Varela, AJ, Guillamón, E, Goyoaga, C, Cuadrado, C, Burbano, C, (2006). Factores no-nutritivos en fuentes proteicas de origen vegetal. Su Implicación en Nutrición y Salud. Brazilian Journal of Food Technology, III JIPCA.

Nagel, FJI, (2002). Process control of solid-state fermentation; Simultaneous control of temperature and moisture content. Tesis postgrado en biotecnología, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Nahas, E, (1988). Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. Journal of General Microbiology. 134, 227-233.

Nandakumar, MPM, Thakur, S, Raghavarao, KSMS, Ghildyal, NP, (1996). Substrate particle size reduction by *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 18, 121-125.

Navas, MG, Melendez, IM, Santamaria, FP, (1995). Contenido de aminoácidos de fracciones proteicas de chocho amargo y desamargado. Instituto de Investigaciones Tecnológicas e Industriales.

Navas, MG, Melendez, IM, Santamaria, FP, (1996). Contenido de ácidos grasos en aceite de chocho y otras grasas y aceites vegetales. Instituto de Investigaciones Tecnológicas e Industriales.

Nigam, P, Robinson, T, (2004). Solid-State fermentation: An Overview. University of Ulster, India. Marcel Dekker, Inc.

Nout, MJR, Rombouts, FM, (1990). Recent developments in tempe research. Journal of Applied Bacteriology. 69, 609-633.

Nout, MJR, Tuqel, G, Brimer, L, (1995). Microbial degradation of amygdalin of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*). International Journal of Food Microbiology. 24, 407-412.

Nout, MJR, Kiers, JL, (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. Journal of Applied Microbiology. 98, 789–805.

Oostra, J, Le-Comte, EP, Van-den, HJC, Tramper, J, Rinzema, A, (2001). Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 75, 1, 13-24.

Orf, JH, (1988). Modifying soybean composition by plant breeding. En. L. McCann. Proceedings: Soybean Utilization Alternatives. University of Minnesota. 131, 16–18.

Pal Vig, A, Walia, A, (2001). Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fibre and phytic acid in rapeseed (*Brassica napus*) meal. Bioresource Technology. 78, 309-312.

Palacios, J, Ortega, R, (1998). Efecto del tiempo de remojo, cocción y lavado sobre el contenido de alcaloides y proteína en chocho (*Lupinus mutabilis* S). Facultad de Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ecuador. Disponible en http://www.idrc.ca/library/document/index_e.html.

Panther, KE, (2005). Toxins in Foods; natural toxins of plant origin. CRC Press LLC. United States of America.

Pirt, SJ, (1975). Principles of microbe and cell cultivation. 1st ed. Blackwell Scientific Publications. London.

Popenoe, H, King, SR, (1989). Lost crops of the Incas. Advisory Commilttee, on technology innovation. National Academic Press. Washington DC.

Rahardjo, YSP, (2005). Fungal mats in solid-state fermentation. Tesis doctoral, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Reddy, NR, Pierson, MD, (1994). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. Food Research International. 27, 281–290.

Rivera-Burbano, ME, Ramírez-Vela, G, (1986). Utilización de la harina de Tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet.) desamargada en la alimentación de pollos de engorde. Facultad de ciencias pecuarias. Universidad de Nariño.

Roldán-Luna, D, Navarro, M, Hugo, E, (1997). Competitividad de la cadena de oleaginosas, aceites y grasas vegetales y animales. Republica de Colombia,

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA – ACT Colombia.

Rose, AH, (1982). Fermented foods. Economic microbiology, 7. Academic Press.

Roussos, S, Perraud-Graine, I, (1996). Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. 13, 341-348.

Ruiz-Teran, F, Owens, JD, (1996). Chemical and enzymic changes during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. Journal of the Science of Food and Agriculture, 71, 523-530.

Sánchez-Bazalar, Z, (2006). Tarwi, otra maravilla peruana. Documento disponible en <http://golpedegato.blogspot.com/2006/09/tarwi-otra-maravilla-peruana.html>.

Sanchez, MC, Altares, P, Pedrosa, MM, Burbano, C, Cuadrado, C, Goyoaga, C, Muzquiz, M, Jimenez-Martinez, C, Davila-Ortiz, G, (2005). Alkaloid variation during germination in different lupin species. Food Chemistry. 90, 347–355.

Santana, MCF, Pinto, T, Fialho, MA, Sá-Correia, I, Empis, MAJ, (2002). Bacterial removal of quinolizidine alkaloids and other carbon sources from a *lupinus albus* aqueous Extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 2318-2323.

Santos, CN, Ferreira, RB, Teixeira, AR, (1997). Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45, 3821-3825.

Schöneberger, H, Ildefonso, C, (1981). Determinación de factores antinutritivos del lupino. I. hemaglutininas. Proyecto Lupino, Inf. N° 4:109-120, Instituto De Nutrición, Lima.

Schoeneberger, H, Gross, R, Cremer, HD, Elmadfa, I, (2007). Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. JN The Journal Of Nutrition. 112, 70-76.

Serrano-Gutiérrez, E, (2004). Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino blanco (*Lupinus albus*) en dietas extruidas para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): efectos sobre los índices productivos y la composición de ácidos grasos en el músculo. Tesis de grado presentada para optar al grado de Licenciado en Ciencias de la Acuicultura. Universidad de Temuco. Chile.

Soccol, CR, (1992). Physiologie et metabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. Doctorat These. Universite de Technologie de Compiègne.

Soto-Cruz, O, Favela-Torres, E, Saucedo-Castaneda, G, (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera*

elsdenii cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress*. 18, 193-200

Sousa, IMN, Mitchell, JR, Hill, SE, Beirao da-Costa, ML, (1994). Texturization by extrusion-cooking of lupin flour and lupin protein isolates. In: Neves Martins J.M. and Beirao da Costa M.L. (eds). *Advances in Lupin Research*. 7th International Lupin Conference. 529–533.

Sparringa, RA, Owens, JD, (1999a). Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 25, 677–681.

Sparringa, RA, Owens, JD, (1999b). Inhibition of the tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, by Ammonia. *Letters in Applied Microbiology*. 29, 93-96.

Sparringa, RA, Kendall, M, Westby, A, Owens, JD, (2002). Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 329-337.

Spier, MR, Greiner, UK, Ralf, G, Rodriguez-Leon, JÁ, Carvalho, JC, Woiciechowski, AL, Soccol, CR, (2007). Relation between respirometric data and amylolytic enzyme production by SSF in column-type bioreactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5, 67.

Steinkraus, KH, (1996). *Handbook of indigenous fermented foods*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker.

Sukara, E, Doelle, HW, (1989). A one-step process for the production of single cell protein and amyloglucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30, 135-140.

Swan-Djien, K, (1982). *Indigenous fermented foods*. *Fermented Foods. Economic microbiology*, vol. 7. Academic Press.

Tapia, ME, (1982). *El medio, los cultivos y los sistemas agricolas en los Andes del sur del Perú*. Pisa. IICA CIID, Cusco, Perú.

Thomas, XM, Feng, L, Ostefeld-Schnürer, J, (2007). Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 133-141.

Toczko, M, Brzeski, W, Ka kolewska-Baniuk, K, (1963). Microbial degradation of lupanine: V. Identification of 17-hydroxylupanine, *Bull. Academy Polish of Science Cl. II*. 11, 161- 164.

Tyski, S, Markiewicz, M, Gulewicz, K, Tardowski, T, (1988). The effect of lupine alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains. *Journal of Plant Physiology*. 133, 240-242.

Varzakas, T, (1998). *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. *Process Biochemistry*. 33, 7, 741-747.

Villacrés, E, Peralta, E, Cuadrada, L, Revelo, I, Abdo, RS, (2008). Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho, *Lupinus Mutabilis* Sweet. Primera edición. Editorial Grafistas; Quito Ecuador. Boletín Técnico 133, 22.

Viniegra González, G, Favela Torrez, E, Aguilar, C, Romero Gómez, S, Díaz Godínez, G, Augur, C, (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13, 157-167.

Von Baer, E, Groos, R, (1983). Sweet strains of *Lupinus mutabilis*. *Z. Pflanzenzuecht*. 91, 334-337.

Wang, HL, Hesseltine, CW, (1965). Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 11, 727-732.

Wang, HL, Doris I, Ruttle, L, Hesseltine, CW, (2008). protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. *Jn.nutrition.org*. 22, 109-114.

Weng, XY, Sun, JY, (2006a). Biodegradation of free gossypol by a new strain of *Candida tropicalis* under solid state fermentation: Effects of fermentation parameters. *Process Biochemistry*. 41, 1663-1668.

Weng, XY, Sun, JY, (2006b). Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 32, 226-232.

Wink, M, (1984). Chemical defence of *Leguminosae*. are quinolizidine alkaloids part of the antimicrobial defence system of lupines. *Z. Naturforschung*. 39, 548-552.

Wink, M, (1991). *Lupinus mutabilis*: Composition and potential applications of quinolizidine alkaloids. Institute für Pharmazeutische Biologie; Universität Heidelberg.

Wink, M, Twardowski, T, (1992). Allelochemical properties of alkaloids. effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. 129-150.

Wink, M, (1994). The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. Institute für Pharmazeutische Biologie. Universität Heidelberg.

Yokotsuka, T, (1991). Proteinaceous fermented foods and condiments prepared with koji molds. In *Handbook of Applied Mycology*, eds Arora, D.K., Mukerji, K.G. & Marth, E.H. 329-373.

Zadrazil, F, Kumar, PA, (1995). Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white rot fungi. *Bioresour Tchnology*. 54, 85-87.

Zamora-Burbano, Á, Arturo-Perdomo, D, Echeverry-Potosí, S, Ortega-David, E, (2011). Ácidos grasos presentes en las semillas de lupino andino (*Lupinus mutabilis*) de Pasto (Colombia). VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos CIBIA VIII.

Zamora, AF, Field, ML, (1979). Nutritive quality of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chick peas (*Cicer arietinum*). Journal of Food Science. 44, 928-929.

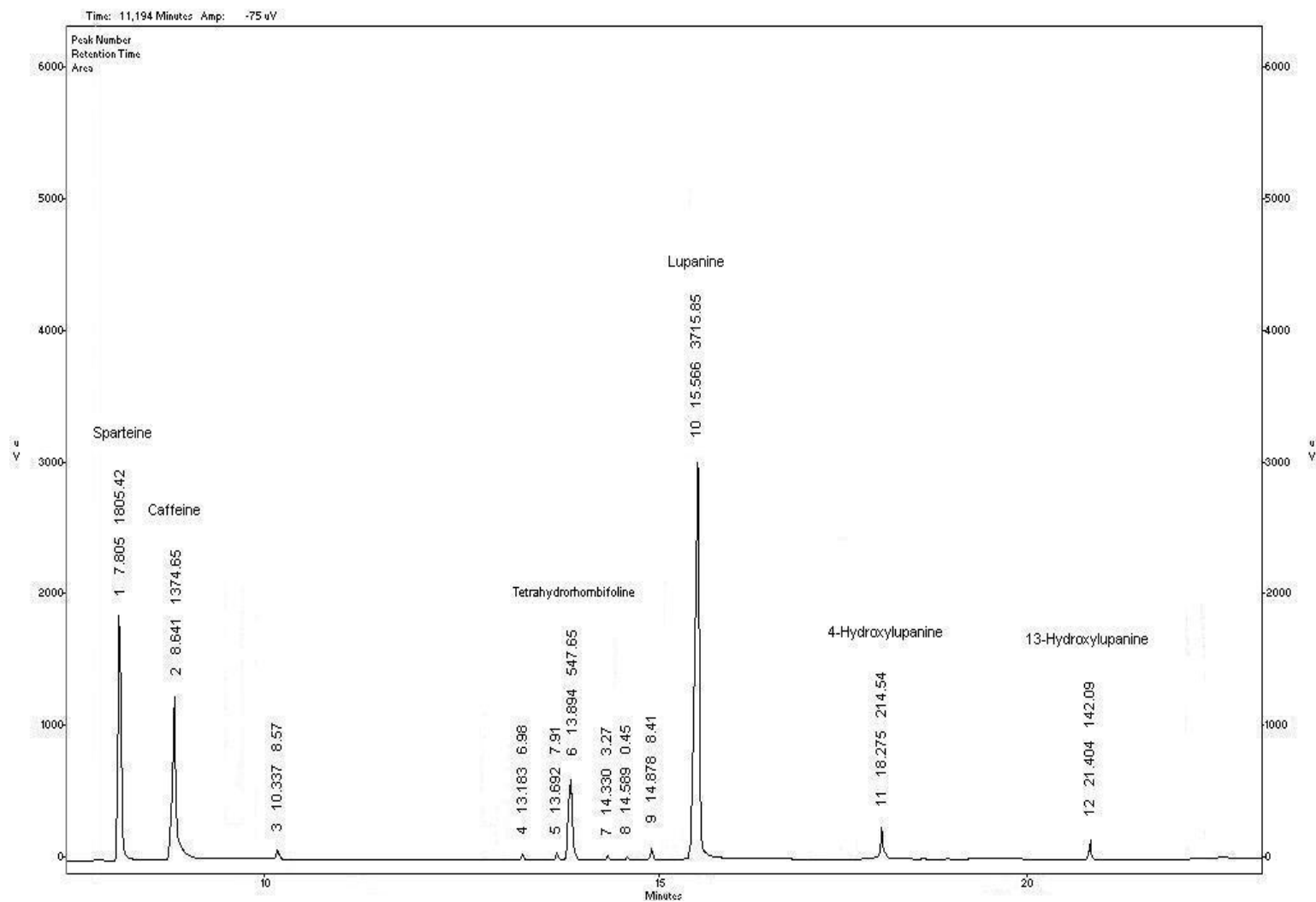
Zamora RG, Veum, AL, (2008). The nutritive value of dehulled soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Rhizopus oligosporus* as evaluated by rats. Journal of Nutrition. 22, 1333-1339.

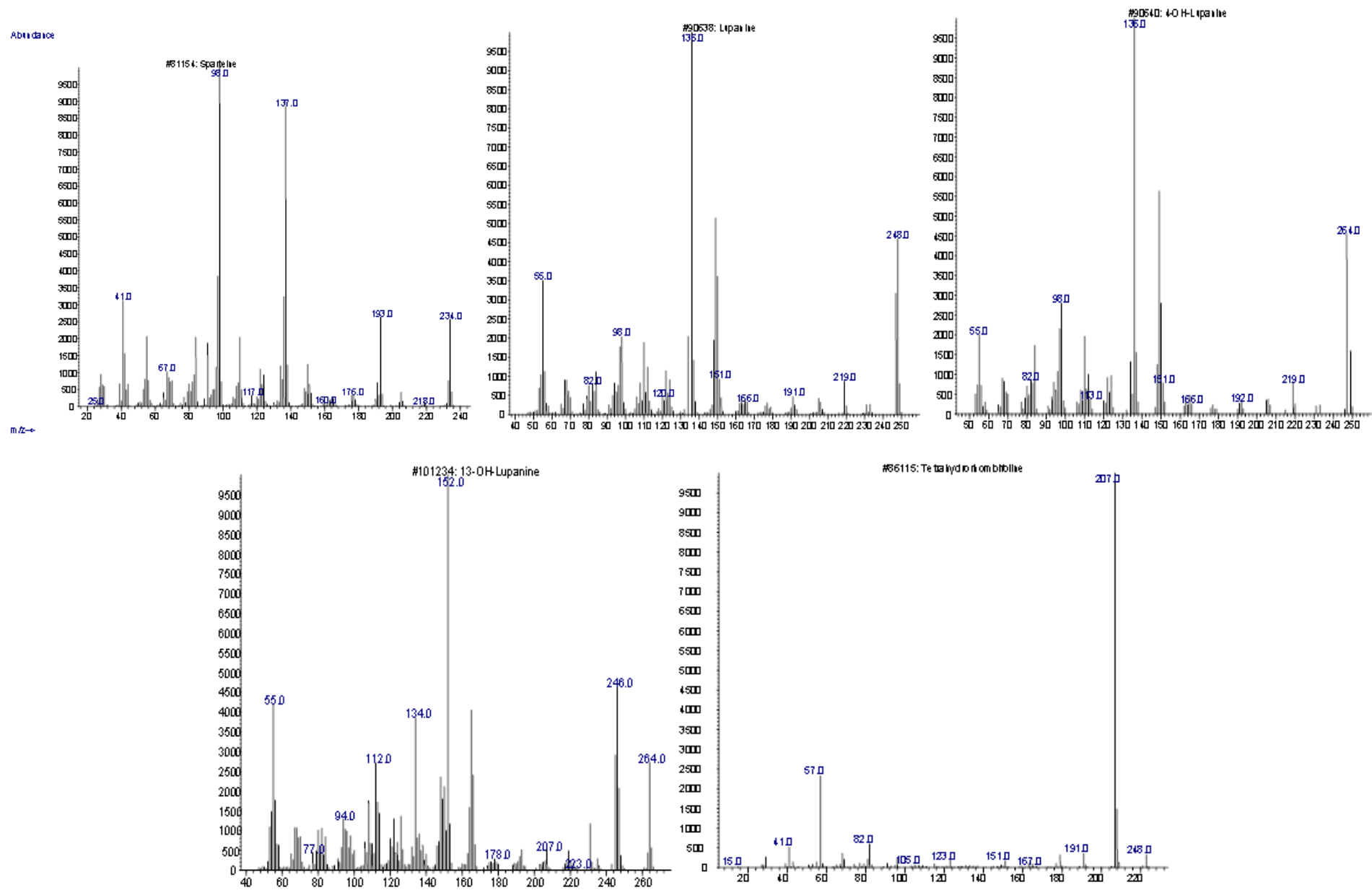
Zdunczyk, Z, Juskiewicz, J, Frejnagel, S, Gulewicz, K, (1997). Influence of alkaloids and oligosaccharides from white lupin seeds on utilization of diets by rats and absorption of nutrients in the small intestine. Animal Feed Science Technology. 72, 143-154.

Zhang, WJ, Zi-Rong, X, Shun-Hong, Z, Jian-Yi, S, Xia, Y, (2006). Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. Animal Feed Science and Technology. 135, 176-186.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis cromatográfico y espectrometría de masas de alcaloides quinolizidínicos del Lupino (*L.mutabilis*)





Anexo 2. Datos de materia seca consumida y biomasa producida

PDA					AL 3.5					AL 5.5				
Tiempo (h)	Materia Seca Consumida		Biomasa Total		Tiempo (h)	Materia Seca Consumida		Biomasa Total		Tiempo (h)	Materia Seca Consumida		Biomasa Total	
	mg Plato ⁻¹		mg Plato ⁻¹			mg Plato ⁻¹		mg Plato ⁻¹			mg Plato ⁻¹		mg Plato ⁻¹	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2		Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2		Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
0	0	0	0.4900	0.6556	0	0	0	0.6000	0.5000	0	0	0	0.6000	0.5000
2	1.4895	1.7508	1.0000	1.2000	2	5.0714	5.8396	0.9600	1.0600	2	2.3090	1.9973	1.0000	1.1000
4	1.2260	1.5607	1.1100	0.9000	4	3.0428	3.5282	0.9000	1.0000	4	3.3985	3.7351	1.7000	1.4000
6	3.2922	3.8156	0.6000	0.5000	6	1.3151	1.1435	0.8000	0.7000	6	3.6377	4.1778	0.5400	0.4600
8	6.8287	7.7711	0.9300	1.0700	8	4.8136	4.4357	1.3000	1.8000	8	5.4704	5.6489	0.7100	0.6300
10	12.7376	14.0199	3.0000	3.3000	10	1.1422	1.0471	0.6900	0.8100	10	10.9416	11.6789	1.9000	2.2000
12	17.7224	18.6784	7.2000	6.7000	12	7.1568	8.0679	1.1000	1.3000	12	21.5272	19.3220	2.2000	2.5000
16	28.6389	32.7768	10.2000	9.7000	16	2.1665	2.4638	0.9600	0.8400	16	30.4515	26.8932	5.0000	5.3000
18	40.3186	35.0875	10.6000	11.8000	20	3.6752	4.0460	1.3000	1.5000	18	56.3870	52.3956	7.1000	6.8000
20	54.6553	48.5941	21.2000	21.5000	22	10.9425	9.8092	1.5100	1.3900	20	63.4513	66.9045	7.7000	8.1000
22	52.5985	57.8174	30.1000	28.8000	24	14.6832	12.9740	1.9000	2.2000	22	71.5527	68.0183	10.0000	10.2000
24	63.3008	60.9095	35.9000	36.0000	26	29.8552	30.3981	3.2000	3.0000	24	70.3545	77.6906	14.7000	13.5000
26	75.9973	72.1211	39.6000	39.3000	28	24.8377	25.7550	7.2000	6.8000	26	82.1871	76.5016	18.7000	18.2000
28	80.3682	77.8807	40.7000	41.0000	30	62.7704	55.4962	11.0000	10.4000	28	87.8988	92.8022	29.1000	29.6000
36	86.4122	91.7184	48.4000	48.5000	36	104.8996	94.5639	32.5000	33.0000	36	99.7263	102.8293	46.5000	46.9000
39	98.3657	91.6887	51.4000	51.2000	39	109.8932	101.3074	45.9000	46.7000	39	111.6415	108.9085	53.0000	53.5000
42	96.0485	97.3864	52.3000	51.5000	42	107.1475	118.2028	52.3000	52.7000	42	110.7354	116.3442	57.1000	59.3000
45	103.1298	102.8271	52.8000	51.9000	45	118.7385	109.2705	54.6000	55.4000	45	117.5827	114.0137	64.7000	68.4000
48	103.7851	108.9673	53.5000	52.7000	48	109.3744	123.9967	59.4000	58.8000	48	127.9280	128.9837	68.0000	69.5000

Anexo 3.

a) Cinéticas de disminución en la concentración de alcaloides totales en agar lupino

AL 3.5			AL 5.5		
Tiempo	Concentración (mg A mg MS ⁻¹)		Tiempo	Concentración (mg A mg MS ⁻¹)	
	REP 1	REP 2		REP 1	REP 2
0	27.5157	28.5686	0	26.1026	23.7149
12	27.1941	29.2358	12	26.3101	24.9023
16	25.9780	26.5994	16	26.6064	22.9686
22	27.3460	26.3876	20	18.3469	17.4855
26	27.0404	27.9766	24	18.4772	16.4953
30	27.0336	27.8033	28	17.6607	14.6608
36	27.9498	28.0873	36	15.1810	13.9142
42	28.8366	28.0123	42	14.3692	13.5508
48	28.9043	27.7608	48	11.4686	11.9885

b) Cinéticas de disminución en la concentración de cada alcaloide en agar lupino

Agar Lupino 3.5								
Concentración de Alcaloides								
Tiempo (h)	(mg lupanina g MS ⁻¹)		(mg esparteína g MS ⁻¹)		(mg tetrahidrorombifolina g MS ⁻¹)		(mg minoritarios g MS ⁻¹)	
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
0	17.0107	18.0805	4.6767	5.0635	2.1683	2.0006	1.6599	1.4239
12	18.0060	19.9548	5.1031	5.6553	2.1592	1.9501	1.9258	1.6756
16	18.6606	19.2806	4.2146	4.3546	1.9503	1.8859	1.1525	1.0783
22	18.8260	17.9070	4.1901	4.4080	1.9334	1.8406	2.3964	2.2320
26	18.4058	20.1362	5.0070	4.5694	1.7333	1.5825	1.8943	1.6886
30	19.3148	20.7421	5.0370	4.6824	1.1780	1.0962	1.5037	1.2826
36	20.6021	20.3972	4.8306	4.8760	1.4501	1.4653	1.0670	1.3488
42	21.2329	19.7991	5.4694	5.8626	1.2840	1.1962	0.8504	1.1544
48	20.8654	19.7194	4.4586	4.7201	1.6281	1.5394	1.9522	1.7818

Agar Lupino 5.5								
Concentración de Alcaloides								
Tiempo (h)	(mg lupanina g MS ⁻¹)		(mg esparteína g MS ⁻¹)		(mg tetrahidrorombifolina g MS ⁻¹)		(mg minoritarios g MS ⁻¹)	
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
0	18.3584	16.4845	4.3799	3.9318	1.8093	1.6255	1.5551	1.6731
12	18.9448	17.7686	4.4417	4.1659	1.4847	1.3912	1.4389	1.5766
16	18.3318	15.4817	4.3945	3.7093	1.6995	1.4352	2.1806	2.3424
20	11.2952	9.9101	3.1673	3.6081	1.6055	1.8278	2.2789	2.1395
24	11.3701	9.6855	3.5770	3.0469	1.3348	1.5677	2.1953	2.1952
28	11.2080	8.6095	3.6336	2.7907	1.2997	1.6929	1.5194	1.5677
36	9.7166	8.5830	2.9803	2.6315	1.1348	1.2846	1.3492	1.4151
42	8.4899	7.8145	2.9386	2.7042	0.9849	1.0681	1.9558	1.9640
48	6.1492	7.0013	2.4887	2.1839	1.0780	1.2266	1.7527	1.5768

Anexo 4. Valores de alcaloides totales calculados por las ecuaciones

Agar Lupino 3.5					
Tiempo (h)	Valores Experimentales (mg AT plato ⁻¹)	Valores Calculados Ec. 13 (mg AT plato ⁻¹)	Valores Calculados Ec. 3 (mg AT plato ⁻¹)	Valores Calculados Ec. 14 (mg AT plato ⁻¹)	Valores Calculados Ec. 5 (mg AT plato ⁻¹)
0	15.44	15.45	15.45	15.45	14.94
12	15.74	15.41	14.65	15.66	14.87
16	14.53	15.43	14.39	15.51	14.90
22	14.51	15.39	14.01	15.16	14.85
26	14.32	15.29	13.77	14.61	14.70
30	13.48	14.81	13.52	13.81	14.01
36	12.63	13.44	13.17	12.53	12.38
42	12.45	12.20	12.82	12.33	12.49
48	12.29	11.79	12.49	12.22	
Agar Lupino 5.5					
0	14.54	14.55	14.55	14.55	13.65
12	14.44	14.27	11.70	13.08	13.23
16	13.78	13.83	10.88	12.49	12.57
20	9.29	13.40	10.12	9.86	11.94
24	8.91	12.44	9.41	9.23	10.58
28	7.98	10.07	8.75	8.05	7.67
36	7.02	7.37	7.57	7.27	5.83
42	6.57	5.58	6.79	6.39	7.09
48	5.34	3.94	6.09	5.32	

**Anexo 5. Concentración de alcaloides quinolizidínicos en 48 h de fermentación
en medios sin aireación forzada**

Alcaloides Totales												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	41.7941	43.4855	42.5718	43.9198	42.3719	43.1139	44.0704	43.0919	41.9345	46.8861	41.2288	43.4408
24	31.3097	31.8939	28.1874	28.5369	28.7239	28.1033	29.6462	29.4957	29.1206	26.6412	24.4659	24.2052
48	23.2725	22.0299	18.7251	22.0947	16.7722	17.0570	14.7751	13.8827	15.9227	16.3853	12.6311	12.8145

Lupanina												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	21.4692	23.9418	23.6887	26.2483	21.0893	21.8234	28.1443	27.1986	23.2252	25.6199	23.6011	23.2582
24	15.6301	15.7929	14.6821	16.0660	15.1190	13.7052	13.3725	13.9853	13.8273	13.4988	12.3097	11.8154
48	9.9004	9.1272	8.8115	10.5041	6.9290	6.9543	6.6101	5.8577	6.4793	7.0981	5.4829	5.0780

Esparteína												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	10.3887	9.9493	10.4914	11.0870	12.8127	12.6257	9.8627	9.2568	10.2826	12.2704	10.3877	10.8398
24	7.8476	7.7899	7.2153	7.1977	7.4144	8.2168	7.0104	6.7182	9.2732	7.5957	6.3345	6.3661
48	6.9071	6.1604	5.1067	6.5545	4.9195	4.9071	3.0978	3.1717	4.2335	4.2484	3.4922	3.1468

Tetrahidrorombifolina												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	3.8703	3.5210	3.8925	3.5639	3.7636	3.4524	3.9577	3.8088	3.5091	3.2381	3.7030	3.8458
24	2.2599	2.4988	1.9816	2.1989	1.3521	1.5238	1.9547	1.8344	1.0610	1.1081	1.5108	1.3659
48	1.9982	2.3144	1.6961	1.4829	0.8403	1.0050	1.1931	1.0498	0.9736	0.8567	0.9714	0.8338

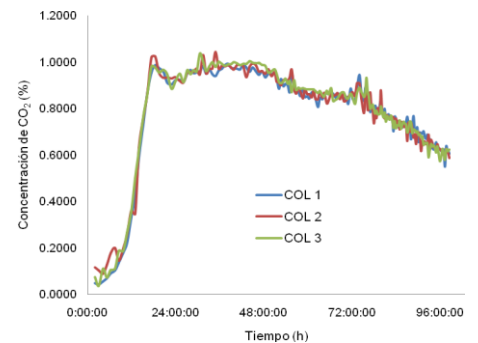
4-Hidroxilupanina												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	1.9520	1.9941	1.8989	1.9029	1.9069	1.9504	1.9252	2.0411	1.9224	1.9342	1.9615	1.9888
24	1.9300	1.9968	1.6584	1.7523	1.7466	1.8213	1.5871	1.7801	1.8594	1.6466	1.4388	1.6061
48	1.6787	1.7836	1.2558	1.4485	1.3985	1.2347	1.2727	1.4366	1.3684	1.5596	1.1242	1.2157

Minoritarios												
	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
Tiempo	E-40		Q-40		E-50		Q-50		E-60		Q-60	
0	4.1140	4.0794	2.6002	3.0206	2.7994	3.2620	3.0328	3.3252	2.9952	3.8236	3.5370	3.5081
24	3.6420	3.8155	2.6499	3.0743	3.0918	2.8362	2.8691	2.6390	3.0997	2.7919	2.8721	3.0517
48	2.7881	2.6443	1.8550	2.1047	2.6849	2.9560	2.6014	2.3668	2.8679	2.6224	2.6846	2.5401

Anexo 6. Datos de concentración de CO₂ y oxígeno durante 96 h de fermentación

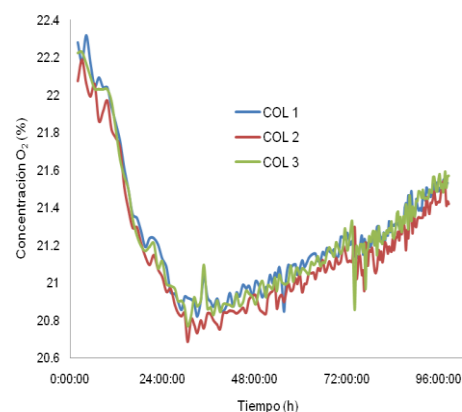
TIEMPO (h)		COLUMNA 1		COLUMNA 2		COLUMNA 3	
De monitoreo	Real Fermentación	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)
0:00:00	2:00:00	0.0500	22.2798	0.1168	22.0731	0.0745	22.2242
1:05:53	3:05:53	0.0431	22.1746	0.1035	22.1875	0.0376	22.2282
2:11:46	4:11:46	0.0569	22.3176	0.0902	22.0642	0.1114	22.1683
3:17:41	5:17:41	0.0707	22.1727	0.1272	21.9925	0.0736	22.0977
4:23:30	6:23:30	0.0917	22.0481	0.1784	22.0551	0.1053	22.0315
5:29:38	7:29:38	0.1047	22.0934	0.1996	21.8629	0.113	22.03105
6:35:36	8:35:36	0.1374	22.0409	0.1447	21.9141	0.1879	22.0301
7:41:26	9:41:26	0.1795	22.0391	0.199	21.9692	0.1873	22.0287
8:47:16	10:47:16	0.222	21.9374	0.2583	21.8176	0.2672	21.9644
9:53:10	11:53:10	0.334	21.8519	0.3623	21.7734	0.3588	21.8156
10:59:02	12:59:02	0.4244	21.7548	0.3477	21.7229	0.4998	21.6594
12:04:52	14:04:52	0.5908	21.6124	0.6319	21.5128	0.6203	21.5653
13:10:42	15:10:42	0.7324	21.4958	0.7596	21.3913	0.7648	21.4952
14:16:33	16:16:33	0.8616	21.3633	0.8598	21.2935	0.857	21.3424
15:22:23	17:22:23	0.9567	21.3455	1.0204	21.2956	0.9822	21.2507
16:28:14	18:28:14	0.9867	21.2732	1.0237	21.2099	0.9776	21.1948
17:34:05	19:34:05	0.9743	21.1903	0.952	21.1404	0.9555	21.1698
18:39:55	20:39:55	0.9572	21.2372	0.9331	21.0954	0.9669	21.1927
19:45:45	21:45:45	0.9101	21.2383	0.9348	21.1474	0.9486	21.2115
20:51:36	22:51:36	0.9043	21.2024	0.93	21.0707	0.8843	21.0766
21:57:27	23:57:27	0.9228	21.1296	0.935	21.031	0.9171	21.1134
23:03:59	25:03:59	0.9233	21.0832	0.919	20.953	0.9497	20.9955
24:10:34	26:10:34	0.9129	20.9501	0.9131	20.9673	0.9132	20.984
25:16:28	27:16:28	0.9531	20.9404	0.956	20.8833	0.9648	20.9689
26:07:08	28:07:08	0.9652	20.9001	0.9583	20.8388	0.9484	20.9031
26:57:48	28:57:48	0.9517	20.8556	0.9579	20.8211	0.9653	20.9026
27:48:29	29:48:29	0.9554	20.9242	0.9709	20.8398	0.9601	20.8708
28:39:10	30:39:10	0.9588	20.9184	0.9474	20.6866	1.0375	20.7697
29:51	31:29:51	0.9818	20.9101	1.0294	20.8058	1.0021	20.8254
30:20:32	32:20:32	0.9504	20.8913	0.9512	20.7779	0.9614	20.9213
31:11:12	33:11:12	0.969	20.821	0.972	20.7308	0.9825	20.8742
32:01:52	34:01:52	0.9468	20.9048	0.9734	20.7988	0.9997	20.9033
32:52:33	34:52:33	0.9403	21.0365	1.043	20.7578	0.979	21.0948
33:43:16	35:43:16	0.9623	20.9243	0.9716	20.8363	1.0013	20.8617
34:33:58	36:33:57	0.9704	20.9013	0.9839	20.8339	0.9916	20.869
35:24:40	37:24:39	0.9871	20.8726	0.9823	20.7989	0.9835	20.8288
36:15:21	38:15:21	0.9933	20.9141	0.9865	20.7772	0.9908	20.9055
37:06:03	39:06:03	0.9743	20.8663	0.9768	20.7531	0.9916	20.8438
37:56:45	39:56:45	0.9732	20.8471	0.9681	20.8372	0.9995	20.8842
38:47:26	40:47:26	0.9724	20.882	0.9862	20.84	0.9945	20.8852
39:38:08	41:38:08	0.9684	20.944	0.9867	20.8516	0.986	20.8812
40:28:50	42:28:50	0.9896	20.8761	0.9829	20.8488	0.9925	20.8767
41:19:32	43:19:32	0.9763	20.9469	0.9346	20.8359	0.9925	20.941
42:10:15	44:10:15	0.9584	20.9281	0.9783	20.8472	1.0035	20.8766
43:00:58	45:00:58	0.976	20.9886	0.9943	20.8669	0.9967	20.897
43:51:40	45:51:40	0.9598	20.9704	0.9874	20.8406	0.9961	20.9561
44:42:23	46:42:23	0.9446	20.9831	0.9589	20.9107	0.9962	20.9402
45:33:06	47:33:06	0.9611	20.9325	0.9612	20.929	0.9882	20.923
46:23:48	48:23:48	0.9342	21.0085	0.9502	20.9315	0.9844	20.8867
47:14:44	49:14:44	0.9491	20.9786	0.9687	20.8621	0.9552	20.9731
48:06:23	50:06:23	0.9485	20.9221	0.9404	20.846	0.9617	21.008
48:57:11	50:57:11	0.9523	20.9758	0.9558	20.8374	0.9696	20.9236
49:32:46	51:32:46	0.9304	20.9838	0.917	20.9206	0.9511	20.986
50:08:21	52:08:21	0.8845	21.0415	0.9102	20.9458	0.9128	20.9784
50:43:55	52:43:55	0.9274	20.998	0.8996	20.958	0.9087	20.9686
51:19:29	53:19:29	0.8964	21.0522	0.9215	20.9848	0.9174	21.0269
51:55:04	53:55:04	0.9051	21.0328	0.9279	20.8619	0.9288	20.9573
52:30:38	54:30:38	0.8993	21.0838	0.9212	20.92	0.9066	21.043
53:06:11	55:06:11	0.8714	21.0007	0.9337	20.9349	0.9182	21.0057
53:41:43	55:41:43	0.9529	20.8483	0.9679	20.8986	0.8712	20.9941
54:17:16	56:17:16	0.8885	21.0136	0.8812	20.9404	0.9222	20.9928
54:52:50	56:52:50	0.8771	21.0948	0.8645	21.0004	0.8809	21.0043
55:28:23	57:28:23	0.869	21.0805	0.8878	20.9563	0.889	21.0905
56:03:56	58:03:56	0.8537	21.0961	0.8711	20.9677	0.8853	21.0074
56:39:28	58:39:28	0.8866	21.0973	0.8442	21.0241	0.8886	21.0616
57:15:01	59:15:01	0.851	21.0439	0.883	20.9935	0.8854	21.0814
57:50:34	59:50:34	0.854	21.0768	0.8624	21.0471	0.8818	21.0445
58:26:07	60:26:07	0.8435	21.1181	0.8619	20.9502	0.882	21.0762
59:01:39	61:01:39	0.8692	21.0848	0.8495	20.994	0.8817	21.0691
59:37:12	61:37:12	0.8607	21.1032	0.8764	20.9951	0.8812	21.0586
60:12:44	62:12:44	0.8424	21.1315	0.8419	21.0514	0.8742	21.0477
60:48:18	62:48:18	0.8071	21.1487	0.8405	21.0505	0.866	21.1089
61:23:52	63:23:52	0.8455	21.155	0.8746	21.0532	0.8756	21.0962
61:59:26	63:59:26	0.8394	21.1543	0.8476	21.0185	0.8579	21.1045
62:34:59	64:34:59	0.859	21.117	0.8677	21.0761	0.8526	21.14
63:10:32	65:10:32	0.8655	21.1152	0.8223	21.0639	0.8763	21.0897
63:46:05	65:46:06	0.8619	21.1633	0.8346	21.1199	0.8621	21.1092
64:21:39	66:21:39	0.8654	21.1483	0.866	21.0591	0.8879	21.1087
64:57:12	66:57:12	0.8632	21.1858	0.8554	21.0724	0.8336	21.1588
65:32:46	67:32:46	0.8472	21.1704	0.8583	21.1129	0.8384	21.1866
66:08:21	68:08:21	0.8586	21.1614	0.8669	21.079	0.8434	21.163
66:43:55	68:43:55	0.864	21.1775	0.8398	21.0749	0.862	21.1395
67:19:29	69:19:29	0.8606	21.1354	0.8684	21.1319	0.8701	21.2158
67:55:03	69:55:03	0.8383	21.1438	0.8326	21.0998	0.8693	21.1831

Cinética de concentración de CO₂ durante 96 horas de Fermentación.



68:30:38	70:30:38	0.8513	21.2441	0.836	21.1122	0.8452	21.156
69:06:12	71:06:12	0.8209	21.2417	0.8491	21.194	0.8444	21.1979
69:41:47	71:41:47	0.8855	21.2338	0.8639	21.1692	0.8637	21.2901
70:17:21	72:17:21	0.8431	21.2649	0.8702	21.1128	0.8478	21.1729
70:52:58	72:52:58	0.8323	21.2018	0.8552	21.1175	0.8207	21.2482
71:28:35	73:28:35	0.8883	21.2196	0.9085	21.1142	0.8674	21.3213
72:04:12	74:04:12	0.9452	21.1456	0.9073	21.2954	0.8903	20.8564
72:40:04	74:40:05	0.8656	21.1333	0.8436	21.0234	0.8731	21.1944
73:15:42	75:15:42	0.8335	21.1532	0.7812	21.15	0.8505	21.1531
73:36:11	75:36:11	0.8845	21.199	0.8458	21.1379	0.8616	21.2017
73:56:57	75:56:58	0.8985	21.2493	0.8659	21.0418	0.9323	21.2035
74:17:18	76:17:18	0.8437	21.1494	0.7945	21.0649	0.8738	21.1611
74:37:42	76:37:42	0.8571	21.2308	0.795	20.9598	0.8489	21.2034
74:58:02	76:58:03	0.7874	21.2163	0.8691	21.2107	0.7996	20.9667
75:18:23	77:18:23	0.8051	21.2101	0.8092	21.1256	0.8077	21.1672
75:38:41	77:38:42	0.8008	21.1776	0.7948	21.0923	0.8168	21.1809
75:59:00	77:59:01	0.7827	21.2172	0.7374	21.1729	0.7977	21.2469
76:19:21	78:19:21	0.8129	21.1916	0.7743	21.1656	0.7779	21.2194
76:39:41	78:39:42	0.7969	21.2492	0.7593	21.1855	0.7904	21.2598
77:00:02	79:00:02	0.786	21.2598	0.8024	21.1262	0.7753	21.2743
77:20:21	79:20:21	0.7842	21.2008	0.7826	21.0636	0.7753	21.2009
77:40:41	79:40:42	0.8283	21.2484	0.8134	21.0521	0.7777	21.2743
78:01:00	80:01:00	0.8292	21.296	0.8785	21.0751	0.8101	21.1482
78:21:21	80:21:21	0.7849	21.3	0.7917	21.1736	0.7895	21.2979
78:41:41	80:41:41	0.7715	21.2523	0.7734	21.1235	0.7626	21.2212
79:02:03	81:02:03	0.7987	21.2403	0.7581	21.1648	0.783	21.2197
79:22:24	81:22:24	0.7515	21.2064	0.7666	21.1104	0.745	21.2082
79:42:44	81:42:44	0.7684	21.2663	0.7713	21.1465	0.7687	21.2617
80:03:05	82:03:05	0.7762	21.2204	0.7633	21.2141	0.7563	21.2318
80:23:25	82:23:25	0.7704	21.2736	0.7649	21.1939	0.7529	21.2765
80:43:45	82:43:45	0.7645	21.2531	0.763	21.1568	0.7698	21.2636
81:04:06	83:04:06	0.76	21.3265	0.7647	21.1913	0.7527	21.2889
81:24:27	83:24:27	0.7026	21.2706	0.7615	21.1752	0.717	21.2776
81:44:48	83:44:48	0.7653	21.3028	0.7316	21.1669	0.7455	21.3258
82:05:08	84:05:08	0.7573	21.3077	0.7564	21.234	0.7164	21.2478
82:25:29	84:25:29	0.7229	21.3055	0.7285	21.1723	0.728	21.238
82:45:50	84:45:50	0.7217	21.3154	0.7468	21.2341	0.7269	21.294
83:06:11	85:06:11	0.718	21.3112	0.7102	21.2446	0.7493	21.3673
83:26:31	85:26:31	0.7407	21.3181	0.7425	21.2709	0.7119	21.3772
83:46:52	85:46:52	0.7188	21.2949	0.7334	21.2266	0.7308	21.286
84:07:13	86:07:13	0.7344	21.3335	0.7227	21.2989	0.7443	21.349
84:27:34	86:27:34	0.7366	21.3134	0.7217	21.2588	0.7365	21.2697
84:47:55	86:47:55	0.742	21.292	0.7328	21.318	0.7306	21.3541
85:08:16	87:08:16	0.7648	21.3965	0.6603	21.2848	0.6977	21.3176
85:28:36	87:28:36	0.7347	21.4231	0.7398	21.1748	0.7125	21.4152
85:48:58	87:48:58	0.7317	21.372	0.6998	21.2802	0.7443	21.3637
86:09:18	88:09:18	0.6687	21.4646	0.7384	21.2385	0.741	21.2871
86:29:39	88:29:39	0.7185	21.3712	0.7157	21.3591	0.6932	21.464
86:50:00	88:50:00	0.7673	21.4878	0.6756	21.3677	0.7095	21.3308
87:10:21	89:10:21	0.7047	21.3921	0.6904	21.2628	0.7084	21.4034
87:30:43	89:30:43	0.7051	21.389	0.6474	21.3936	0.6989	21.3765
87:51:04	89:51:04	0.7186	21.3631	0.6881	21.3047	0.7033	21.3568
88:11:25	90:11:25	0.6553	21.4444	0.6972	21.2985	0.6869	21.4349
88:31:46	90:31:46	0.6959	21.41	0.6838	21.3372	0.6904	21.4363
88:52:07	90:52:07	0.6948	21.3854	0.618	21.3482	0.6754	21.4857
89:12:28	91:12:28	0.6922	21.3957	0.6608	21.3449	0.6796	21.4814
89:32:50	91:32:50	0.7025	21.3847	0.6573	21.347	0.6448	21.4541
89:53:11	91:53:11	0.679	21.469	0.6565	21.3509	0.6524	21.4953
90:13:32	92:13:32	0.6706	21.4672	0.6478	21.3994	0.6508	21.4508
90:33:53	92:33:53	0.6876	21.4398	0.6467	21.3616	0.6514	21.4482
90:54:15	92:54:15	0.6684	21.5053	0.687	21.4533	0.5909	21.4508
91:14:36	93:14:36	0.6678	21.4806	0.623	21.4029	0.6234	21.4485
91:34:58	93:34:58	0.6286	21.4961	0.6652	21.3668	0.6475	21.4934
91:55:20	93:55:20	0.6533	21.4582	0.6481	21.4247	0.6369	21.4877
92:15:42	94:15:42	0.624	21.4807	0.6331	21.4258	0.6421	21.4823
92:36:03	94:36:03	0.6373	21.5283	0.6363	21.4502	0.6313	21.5615
92:56:25	94:56:25	0.6539	21.4732	0.6256	21.4843	0.6114	21.5636
93:16:47	95:16:47	0.6222	21.5252	0.646	21.4181	0.6377	21.4923
93:37:09	95:37:09	0.6311	21.5339	0.6269	21.4277	0.605	21.488
93:57:30	95:57:30	0.6226	21.4894	0.6269	21.4322	0.5744	21.5525
94:17:52	96:17:52	0.6197	21.5041	0.6202	21.4317	0.5937	21.5763
94:38:14	96:38:14	0.6164	21.4939	0.6037	21.48	0.6274	21.5063
94:58:36	96:58:36	0.6247	21.514	0.6046	21.5172	0.6074	21.5243
95:18:58	97:18:58	0.5498	21.5483	0.5843	21.5381	0.579	21.4844
95:39:29	97:39:29	0.6373	21.5519	0.6258	21.5155	0.6249	21.5929
95:59:52	97:59:52	0.6178	21.5205	0.619	21.4122	0.6222	21.5075
96:20:17	98:20:17	0.621	21.533	0.6107	21.4327	0.6173	21.5643
96:40:41	98:40:41	0.6066	21.5845	0.5866	21.4197	0.6234	21.5696

Cinética de concentración de O₂ durante 96 horas de Fermentación.



Anexo 7. Cinética de disminución en la concentración de alcaloides en 96 h de fermentación con *R. oligosporus*.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE ALCALOIDES							CONCENTRACIÓN A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN				
Sustancia			Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO ALCALOIDES	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	PROMEDIO ALCALOIDES
Pico	TR	Componente	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS		mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	
1	7.819	Esparteína	13.7404	12.9027	12.6315	13.0915±0.58	7.8492	7.9035	8.5224	8.8885	8.2909±0.37
2	10.354	NI	0.1962	0.1912	0.2129	0.2001±0.01	0.1252	0.1739	0.1448	0.1394	0.1458±0.02
3	13.211	NI	0.2723	0.2799	0.2927	0.2816±0.01	0.2075	0.1935	0.1658	0.2597	0.2066±0.02
4	13.708	NI	0.2192	0.2165	0.2397	0.2251±0.01	0.4646	0.3953	0.3643	0.4561	0.4201±0.05
5	13.913	THRombifolina	3.8287	3.9138	4.5615	4.1014±0.40	0.5759	0.5135	0.6147	0.7853	0.6224±0.05
6	14.453	NI	0.0673	0.0634	0.0668	0.0658±0.00	0.0415	0.0208	0.0327	0.0530	0.0370±0.01
7	14.603	NI	0.1068	0.0932	0.1084	0.1028±0.01	0.0838	0.0486	0.0652	0.0913	0.0722±0.02
8	14.899	NI	0.0553	0.0601	0.0604	0.0586±0.00	0.0296	0.0744	0.0386	0.0146	0.0393±0.02
9	15.578	Lupanina	25.1039	26.5558	28.6589	26.7728±1.79	12.4182	11.1646	13.5118	14.2586	12.8383±1.17
10	17.862	4-Hlupanina	1.3384	1.5332	1.6752	1.5156±0.17	0.2238	0.2100	0.2279	0.2271	0.2222±0.01
11	21.236	13-Hlupanina	0.7989	1.0055	0.9343	0.9129±0.10	0.2803	0.3859	0.3735	0.3483	0.3470±0.06
TOTAL						47.3283±1.9098	TOTAL				23.2418±1.9507
IDENTIFICADOS						46.3943±1.8729	IDENTIFICADOS				22.3208±1.9312
NO IDENTIFICADOS						0.9341±0.0410	NO IDENTIFICADOS				0.921±0.0854

Sustancia			CONTENIDO DE ALCALOIDES A LAS 48 H DE FERMENTACIÓN				PROMEDIO ALCALOIDES	CONTENIDO DE ALCALOIDES A LAS 72 H DE FERMENTACIÓN				PROMEDIO ALCALOIDES
			Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
Pico	TR	Componente	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS		mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	
1	7.819	Esparteína	4.8390	5.3045	4.6017	4.9042	4.9124±0.29	4.9478	4.3864	4.4401	5.0767	4.7128±0.35
2	10.354	NI	0.0081	0.0397	0.0396	0.0322	0.0299±0.01	0.0711	0.0418	0.0554	0.0706	0.0597±0.01
3	13.211	NI	0.0255	0.0383	0.0388	0.0398	0.0356±0.01	0.0441	0.0441	0.0541	0.0534	0.0489±0.01
4	13.708	NI	0.0314	0.0337	0.0202	0.0346	0.0300±0.01	0.0559	0.0331	0.0223	0.0696	0.0452±0.02
5	13.913	THRombifolina	0.1278	0.1325	0.1566	0.1590	0.1440±0.02	0.1353	0.1543	0.1283	0.1221	0.1350±0.01
6	14.453	NI	0.0188	0.0265	0.0336	0.0269	0.0265±0.01	0.0442	0.0301	0.0336	0.0487	0.0392±0.01

7	14.899	NI	0.0207	0.0257	0.0243	0.0235	0.0236±0.00	0.0377	0.0561	0.0383	0.0281	0.0401±0.01
8	15.578	Lupanina	8.3352	7.4650	7.9022	7.0589	7.6904±0.55	4.9398	4.2791	4.0530	3.6497	4.2304±0.54
9	17.862	4- Hlupanina	0.1406	0.1340	0.1340	0.1274	0.1340±0.01	0.1668	0.1804	0.2106	0.2173	0.1938±0.02
10	21.236	1-3 Hlupanina	0.1515	0.1393	0.1485	0.1666	0.1515±0.01	0.2777	0.2299	0.2299	0.2654	0.2507±0.02
TOTAL							13.1776±0.4197	TOTAL			9.7557±0.6576	
IDENTIFICADOS							13.0321±0.3922	IDENTIFICADOS			9.5226±0.6396	
NO IDENTIFICADOS							0.1455±0.0275	NO IDENTIFICADOS			0.233±0.0338	

Sustancia			CONTENIDO DE ALCALOIDES A LAS 96 H DE FERMENTACIÓN				PROMEDIO ALCALOIDES
			Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
Pico	TR	Componente	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	mg A / g MS	
1	7.819	Esparteína	4.8182	4.1915	4.4532	4.6636	4.5316±0.27
2	10.354	NI	0.0694	0.0483	0.0503	0.0706	0.0596±0.01
3	13.211	NI	0.0820	0.0797	0.0634	0.0953	0.0801±0.01
4	13.913	THRombifolina	0.1261	0.0863	0.1292	0.1015	0.1108±0.02
5	14.603	NI	0.0336	0.0331	0.0316	0.0377	0.0340±0.00
6	14.899	NI	0.0340	0.0252	0.0296	0.0529	0.0354±0.01
7	15.578	Lupanina	4.0113	3.7519	4.8819	3.8431	4.1220±0.52
8	17.862	4- Hlupanina	0.1231	0.1216	0.1340	0.1138	0.1231±0.01
9	21.236	1-3 Hlupanina	0.1534	0.0989	0.1607	0.1605	0.1434±0.03
TOTAL							9.2401±0.6243
IDENTIFICADOS							9.0309±0.5770
NO IDENTIFICADOS							0.2091±0.0474

Condiciones de Fermentación: Tamaño de Partícula: Malla No. 6
Humedad: 60 %
Tiempo: 96 h
Aireación: 60 ml min⁻¹
pH: 5.5

