

PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA PARA LA DISMINUCIÓN DE TANINOS EN EL SORGO

LILIANA LONDOÑO HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI

2015

PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA PARA LA DISMINUCIÓN DE TANINOS EN EL SORGO

LILIANA LONDOÑO HERNÁNDEZ

Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería de Alimentos

DIRECTORA:

PhD. CRISTINA RAMÍREZ TORO

UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI

2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por sus bendiciones y darme fortaleza cada día.

A mi amado esposo, Andrés, sin su amor y su apoyo constante este camino sería más duro.

A mis padres Otoniel y Gloria, por sus valiosas enseñanzas, son mi ejemplo a seguir.

A mí querida familia, Gloria Cristina, Sandra Milena, Nora Patricia y Harold José, por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis sobrinos Manuela, Marcela y Santiago, por ser mi inspiración diaria.

A la Escuela de Ingeniería de Alimentos por permitirme realizar este proyecto.

A los profesores Germán Bolívar y Cristina Ramírez, por haber confiado en mí y brindarme sus conocimientos.

A José Luis Plaza Dorado, por sus buenos consejos y sus constantes “discusiones” profesionales.

A Sandra Franco, Andrés Carmona y Sandra Betancourt, por su valiosa amistad.

A Daniel López y Estefania Hidalgo, sin sus aportes este proyecto no se habría culminado pronto.

A todos los miembros del grupo MIBIA, por hacer diferentes los días de trabajo.

Y a todos los que de uno u otra forma me han acompañado y han hecho posible la realización de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Sorgo	4
1.2. Factores antinutricionales	5
1.3. Fermentación Sólida	7
2. ANTECEDENTES	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. HIPÓTESIS.....	17
6. OBJETIVOS	18
6.1. Objetivo General	18
6.2. Objetivos Específicos.....	18
7. METODOLOGÍA	19
7.1. Selección del microorganismo apropiado	19
7.1.1. Obtención y caracterización de la materia prima	19
7.1.2. Reactivación y conservación de los microorganismos.....	21
7.1.3. Selección del microorganismo y adecuación del sustrato	21
7.2. Comparación del rendimiento de la producción de esporas y la homogeneidad durante la fermentación de diferentes inóculos iniciadores	23
7.3. Optimización de los parámetros de fermentación de acuerdo al microorganismo seleccionado	25
7.3.1. Preparación de las muestras	25
7.3.2. Proceso de fermentación y selección de parámetros.....	25

7.3.2.	Cinética de fermentación en columna	28
7.3.3.	Caracterización del producto obtenido.....	29
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1.	Selección del microorganismo apropiado	¡Error! Marcador no definido.
8.1.1.	Caracterización de la materia prima.....	31
8.1.2.	Selección del microorganismo apropiado a utilizar durante el proceso	32
8.2.	Comparación del rendimiento de la producción de esporas y la homogeneidad durante la fermentación de diferentes inóculos iniciadores	40
8.3.	Establecimiento de los parámetros de fermentación de acuerdo al microorganismo seleccionado	42
8.3.1.	Proceso de fermentación y selección de parámetros.....	42
8.3.2.	Cinética de fermentación en columna	60
8.3.3.	Caracterización del producto obtenido.....	65
9.	CONCLUSIONES	70
10.	RECOMENDACIONES	71
11.	BIBLIOGRAFÍA	72

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Contenido nutricional del grano entero del sorgo y sus fracciones</i>	4
<i>Tabla 2. Diseño Factorial para selección del microorganismo y adecuación del sustrato</i>	22
<i>Tabla 3. Niveles de los factores Temperatura, Velocidad de aire, tamaño de partícula y concentración de coadyuvantes de fermentación</i>	26
<i>Tabla 4. Ensayos llevados a cabo</i>	26
<i>Tabla 5. Caracterización del sorgo crudo</i>	31
<i>Tabla 6. Velocidad de crecimiento radial de Hongos Filamentosos, en sustratos con sorgo</i>	34
<i>Tabla 7. Resultados ANOVA para las velocidades de crecimiento radial</i>	34
<i>Tabla 8. Velocidad de crecimiento longitudinal de Hongos Filamentosos, en sustratos con sorgo</i>	36
<i>Tabla 9. Resultados ANOVA para las velocidades de crecimiento longitudinal</i>	37
<i>Tabla 10. Cuantificación de la cantidad de biomasa producida por Hongos Filamentosos en sustratos con sorgo.</i>	37
<i>Tabla 11. Resultados ANOVA para la producción de biomasa</i>	38
<i>Tabla 12. Contenido de taninos en el sustrato sorgo después del proceso de fermentación</i>	39
<i>Tabla 13. Resultados ANOVA para el contenido de taninos</i>	39
<i>Tabla 14. Concentración de esporas de acuerdo al tipo de inóculo</i>	40
<i>Tabla 15. Contenido promedio de azúcares totales y reductores después de fermentación variando el tipo de inóculo</i>	41
<i>Tabla 16. Resultados ANOVA para azúcares totales</i>	42
<i>Tabla 17. Resultados ANOVA para azúcares reductores</i>	42
<i>Tabla 18. Resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos para pH, Azúcares Totales, Azúcares reductores, Proteína y Contenido de Taninos, después del proceso de fermentación sólida</i>	44
<i>Tabla 19. ANOVA del modelo de superficie de respuesta para optimización del proceso de fermentación sólida.</i>	45
<i>Tabla 20. Modelos planteados para las variables pH, azúcares totales, azúcares reductores, proteínas y taninos</i>	47
<i>Tabla 21. Datos cinéticos para el Rhizopus Oryzae (MUCL 28168) en sorgo crudo</i>	64
<i>Tabla 22. Caracterización proximal del sorgo después del tratamiento</i>	66
<i>Tabla 23. Contenido de aminoácidos del sorgo sin tratamiento y fermentado</i>	67
<i>Tabla 24. Análisis de TBA, taninos y microbiológico para el sorgo con y sin tratamiento</i>	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los taninos condensados	6
Figura 2. Montaje para medición de la velocidad radial de crecimiento y cuantificación de biomasa	22
Figura 3 Montaje de del proceso de fermentación sólida. (a) Vista frontal (b) Vista lateral	25
Figura 4. Montaje para cuantificación del CO ₂	29
Figura 5. Aspecto físico del sorgo	31
Figura 6. Crecimiento radial microorganismos durante 4 días (a) en medio sin sustrato (b) <i>Aspergillus oryzae</i> sobre sustrato sorgo (c) <i>Rhizopus oryzae</i> sobre sustrato sorgo	33
Figura 7. Crecimiento radial de los hongos en el tiempo	33
Figura 8. Crecimiento longitudinal en 4 días de fermentación de microorganismos en tubos Ryan. (a) Montaje inicial para los ensayos (b) Vista frontal de los tubos (c) Crecimiento de <i>Rhizopus Oryzae</i> (d) Crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i>	35
Figura 9. Crecimiento longitudinal de los hongos durante el tiempo de experimentación	36
Figura 10. Biomasa obtenida después de crecimiento (a) <i>Rhizopus oryzae</i> (b) <i>Aspergillus oryzae</i>	38
Figura 11. Muestras de sorgo (a) sin inóculo (b) inoculadas con esporas (c) inoculadas con micelios (d) inoculadas con koji	41
Figura 12. Aspecto de la columna (a) antes de crecimiento (b) después de crecimiento	43
Figura 13. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para el pH: a) Gráfica de probabilidad normal vs residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden	50
Figura 14. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los azúcares totales: a) Gráfica de probabilidad normal vs residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden	50
Figura 15. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los azúcares reductores: a) Gráfica de probabilidad normal vs residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden	51
Figura 16. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para las proteínas: a) Gráfica de probabilidad normal vs residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden	51
Figura 17. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los taninos: a) Gráfica de probabilidad normal vs residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden	52
Figura 18. Gráfico de contorno para el comportamiento del pH	53
Figura 19. Gráfico de contorno para el comportamiento de los azúcares totales	54
Figura 20. Gráfico de contorno para el comportamiento de los azúcares reductores	55
Figura 21. Gráfico de contorno para el comportamiento de las proteínas	56
Figura 22. Gráfico de contorno para el comportamiento de los taninos	58
Figura 23. Gráfica de optimización para el proceso de fermentación sólida, según los factores estudiados	59

<i>Figura 24. Comportamiento de los azúcares, las proteínas y el pH durante la cinética de fermentación.</i>	61
<i>Figura 25. Comportamiento de los taninos y el CO₂ durante la cinética de fermentación</i>	62
<i>Figura 26. Vista macroscópica del micelio desarrollado durante el proceso de fermentación sólida con sorgo. a) inicial b) 3h; c) 6h; d) 9h; e) 12h; f) 15h; g) 18 h; h) 21 h; i) 24h</i>	63
<i>Figura 27. Vista de la morfología del sorgo (a) antes de tratamiento (b) después del proceso de fermentación</i>	65

RESUMEN

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es uno de los cereales más importantes a nivel mundial, su producción se ha mantenido constante a través de los últimos años, siendo usado principalmente para alimentación animal. En general, presenta características nutricionales comparables con otros cereales, pero la presencia de factores antinutricionales, como los taninos condensados, limitan su uso debido a que interfieren con la digestibilidad de proteínas y carbohidratos; por tanto, la reducción de estos compuestos es esencial para el mejoramiento de la calidad y el fomento del uso del sorgo. Son diversos los métodos estudiados para reducir estos factores, entre los cuales se encuentra la fermentación, la cual aumenta la calidad y digestibilidad de la proteína presente. Sustentado en estos beneficios, el presente estudio se realizó con el objetivo de aplicar un proceso de fermentación sólida con hongos filamentosos considerados GRAS, determinando los niveles adecuados de las variables de proceso temperatura, velocidad de aire, tamaño de partícula y concentración de coadyuvantes (salvado de trigo) que permitieran una reducción significativa de los taninos en el sorgo, obteniéndose de esta manera un producto de mejor calidad nutricional.

Inicialmente se evaluó la capacidad de crecimiento de dos tipos de hongos, *Aspergillus oryzae* (ATCC 20387) y *Rhizopus oryzae* (MUCL 28168), sobre sorgo sin remojo previo y remojado durante 16 h en agua acidificada, encontrándose que el microorganismo que presenta los mejores comportamientos en todos los casos estudiados fue el *Rhizopus oryzae* en sustrato sin remojo previo, teniendo una tasa de crecimiento radial de $0,76 \text{ mm/h} \pm 0,02 \text{ mm/h}$, crecimiento longitudinal de $5,31 \text{ mm/h} \pm 1,30 \text{ mm/h}$ y producción de biomasa de $3,75 \% \pm 0,50 \%$.

Posteriormente se evaluó cual técnica podría proveer un inóculo iniciador de forma constante y abundante, para esto se evaluaron el método tradicional de producción de esporas en agar PDA, el método tane-koji y colocando trozos de micelio esporulado sobre el sustrato, encontrando que en todos los casos hay un contenido inicial de esporas adecuado por encima de 10^7 , sin embargo cuando se inoculó el sustrato con tane-koji hubo una mayor homogeneidad en la distribución del micelio. Por tal motivo, este fue seleccionado como inóculo iniciador. Después de esta selección, se llevaron a cabo ensayos experimentales para determinar los niveles adecuados de las variables de proceso de fermentación sólida que permitieran una reducción efectiva de los taninos en el sorgo. Para ello, se usó un diseño central compuesto con 4 factores y 2 niveles por factor, y se aplicó posteriormente la función de deseabilidad compuesta

encontrándose que, a temperatura de 32.97 °C, velocidad de aire de 84.11 mm³/min, concentración de salvado de trigo de 1.16% y tamaño de partícula de 0.82 mm se obtuvieron los mejores resultados. Con estos parámetros se llevó a cabo una cinética de fermentación con el objetivo de observar el comportamiento de las variables azúcares, proteínas, taninos, pH y CO₂ a través del tiempo y cuantificar los parámetros cinéticos, encontrándose que el hongo tuvo una tasa específica de crecimiento de 0,22 h⁻¹ sobre este sustrato, con un rendimiento del proceso de 1.18 g Proteínas/g Azúcares.

Finalmente se realizó el proceso de fermentación sólida con los parámetros establecidos y tiempo de 21 horas, para evaluar las características finales del producto, determinando que se presentó aumento del 23.87% en el contenido de proteínas y disminución del 86.29% en el contenido de taninos, comprobando de esta manera que el proceso aplicado fue exitoso y mostrándose como potencial para escalamiento y uso a nivel industrial.

Palabras claves: Sorgo, taninos, fermentación sólida, hongos filamentosos.

INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es el cuarto cereal de mayor importancia a nivel mundial, después del arroz, el trigo y el maíz. Según la USDA, se estima que la producción mundial para el año 2014 fue de 60.46 millones de toneladas, representando un incremento de 1.56 millones de toneladas lo que equivale a 2.58%. Colombia es el productor número 25, contribuyendo con el 0,4% de la producción mundial (Espinal *et al.*, 2005). Por sus características agro-climatológicas y nutricionales, el sorgo es un cereal de amplio uso en alimentación humana en territorios como África y Asia, mientras que en otros países es básicamente utilizado en la alimentación animal, lo que ha constituido un elemento dinámico en el ámbito del consumo global del sorgo. Su demanda ha sido la principal fuerza motriz para elevar la producción mundial y el comercio internacional de este cereal (López Ortiz *et al.*, 2011).

A pesar de que el contenido nutricional del sorgo es bueno, la presencia de factores antinutricionales, entre otros, limita su empleo. Estos factores antinutricionales interfieren con la digestibilidad de proteínas y carbohidratos y con la biodisponibilidad de minerales, impidiendo la absorción de los nutrientes presentes. Por tanto, la reducción de estos compuestos es esencial para el mejoramiento de la calidad y el fomento de su uso como alimento (Schons *et al.*, 2012). Se han evaluado diferentes técnicas para disminuir el contenido de factores antinutricionales, entre los cuales se encuentran el remojo en agua, los tratamientos químicos con solventes, la ruptura mecánica, los tratamientos térmicos, el uso de enzimas exógenas y los procesos de germinación y fermentación (Savón & Scull, 2006). En el caso de los procesos de fermentación se ha comprobado que producen incremento en el contenido de aminoácidos esenciales y proteínas solubles (Urbano *et al.*, 1995), disminuyen significativamente los niveles de los diversos factores antinutricionales, reducen el contenido de micotoxinas, ayudan a la prevención de la rancidez oxidativa, entre otros (Robert Nout & Aidoo, 2010; Savón & Scull, 2006).

La fermentación sólida es por tanto, un método de interés, debido a su capacidad de aumentar satisfactoriamente la biodisponibilidad de los nutrientes (Chelule *et al.*, 2010). Sin embargo, son escasos los estudios aplicados a sorgo, por tanto se desconocen los parámetros que logren una disminución efectiva del contenido de taninos en este cereal. Por tal motivo, durante este estudio se evaluó el efecto del proceso de fermentación sólida utilizando hongos probados en la alimentación humana, con el propósito de disminuir el contenido de taninos en granos de sorgo, y de este modo, evaluar el potencial que este tipo de productos pueda representar en la alimentación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Sorgo

El sorgo es un cultivo herbáceo de la familia *Poaceae* o *Graminae*, subfamilia *Panicoideae*, tribu *Andropogoneae*, especie *Sorghum bicolor*. Los mayores productores de sorgo en 2005 fueron EUA (17% de la producción mundial), México (12%), Nigeria (9.6%), Sudán (8.6%) e India (8.6%) (Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), 2015). El sorgo presenta ventajas frente a otros granos en climas cálidos y secos, así mismo es más tolerante a suelos húmedos e inundados y con diferentes grados de toxicidad, lo cual hace que sea un cultivo ideal para crecer en ambientes abióticos estresados (Edel León & Rosell, 2007).

La composición proximal del sorgo se presenta en la Tabla 1. Los carbohidratos corresponden al principal macronutriente del sorgo, con un porcentaje aproximado del 75%, presente principalmente en forma de almidón. El contenido de proteína se encuentra en 11,3%, sin embargo este puede variar de acuerdo con las características genéticas y el lugar de cultivo. Las proteínas del sorgo son deficientes en arginina, lisina, glicina, tirosina y metionina. La baja calidad de la proteína del sorgo puede estar asociada a compuestos fenólicos, como los taninos, los cuales forman complejos con las proteínas, impidiendo su digestión y absorción. No obstante, otros componentes del cereal también están asociados al bajo aprovechamiento de las proteínas. Se ha demostrado que las kafirinas, proteína de reserva principal, se vuelve menos soluble e indigerible durante la cocción húmeda debido a la formación de enlaces disulfuro. Los granos de sorgo también pueden ser considerados buenas fuentes de vitaminas liposolubles y del complejo B, como tiamina, riboflavina y piridoxina; además de minerales como fósforo, potasio y zinc (Queiroz *et al.*, 2011).

Tabla 1. Contenido nutricional del grano entero del sorgo y sus fracciones

Fracción del grano	Peso en el grano (%)	Proteína (%)	Ceniza (%)	Aceite (%)	Almidón (%)	Niacina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)
Grano entero	100	12,3	1,67	3,6	73,8	4,5	0,13
Endospermo	82,3	12,3	0,37	0,6	82,5	4,4	0,09
Germen	9,8	18,9	10,4	28,1	13,4	8,1	0,39
Salvado	7,9	6,7	2,0	4,9	34,6	4,4	0,40

Fuente: (Edel León & Rosell, 2007)

1.2. Factores antinutricionales del sorgo

Los factores antinutricionales (FAN) son sustancias que se generan por el metabolismo secundario de las plantas para protegerse de los depredadores. Pueden aparecer en cualquier parte de la planta, y su concentración varía de acuerdo a la especie, el cultivo, las condiciones de crecimiento, las estaciones del año, el tratamiento pos-cosecha, entre otras (García, 2004; Savón & Scull, 2006).

Los FAN interfieren con el aprovechamiento de nutrientes y en algunos casos promueven pérdidas importantes de proteína endógena, produciendo daños al organismo del animal que los consume. Estos compuestos influyen en la aceptabilidad animal, inhiben la digestión al afectar la actividad catalítica de algunas enzimas, producen efectos tóxicos y pueden limitar la absorción de nutrientes (García, 2004). El sorgo, como otro tipo de cereales, presenta una gran variedad de FAN, tales como inhibidores de tripsina, inhibidores de amilasas, ácido fítico y taninos (Osman, 2004); de estos, los taninos son los compuestos que interfieren en mayor grado con la digestibilidad de la proteína, al formar complejos estables con éstas que impiden su absorción.

Los taninos son compuestos fenólicos de naturaleza compleja, solubles en agua con peso molecular relativo entre 500-3000 Dalton (D), los cuales tienen la propiedad de precipitar los alcaloides, los albuminoides y la gelatina, aparte de sus reacciones fenólicas (López Coello, 2002), (Márquez Lara & Suárez Londoño, 2008). Según el grupo biosintético al que pertenecen, los taninos se dividen en: taninos condensados o proantocianidinas, los cuales son polímeros flavonoides que pueden ser oxidativamente degradados en ácido a antocianidinas, están formados por unidades poliméricas de 3-flavonol (catequinas) o de 3,4-flavonodiol (leucoantocianidinas) o derivados (Figura 1); taninos hidrolizables, que son derivados de los ácidos gálico y elágico; y florotaninos, los cuales se encuentran especialmente en las algas pardas (Márquez Lara & Suárez Londoño, 2008).

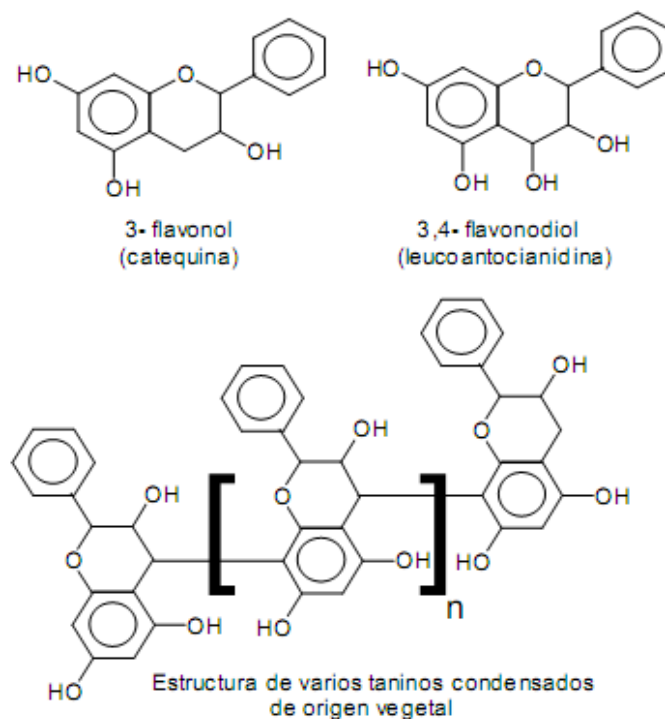


Figura 1. Estructura de los taninos condensados

Fuente: (García, 2004)

Entre los efectos negativos de los taninos se encuentran la formación de complejos con proteínas, carbohidratos y minerales, así como su efecto pro-oxidante a altas concentraciones; los taninos tienen la capacidad de precipitar proteínas presentes en la saliva, lo que causa sensación de astringencia, se unen fuertemente a proteínas ricas en aminoácidos como prolina, glicina, ácido glutámico y péptidos a través de dos interacciones: puentes de hidrógeno (entre el grupo carbonilo de los péptidos y los hidrógenos del grupo hidroxilo de polifenoles) e interacción hidrofóbica (entre los aminoácidos neutros y los anillos aromáticos de los taninos), dichas interacciones dependen de la preferencia de cada molécula de tanino para arreglarse tridimensionalmente, y de su estado coloidal; inhiben las enzimas digestivas, comprometiendo la digestión de proteínas y otros macronutrientes; e interactúan con minerales divalentes como el hierro no hemático, inhibiendo la absorción de los metales (Vásquez-Florez *et al.*, 2012).

La formación de los complejos con las diferentes moléculas depende del pH, la fuerza iónica, el tamaño del tanino y el tipo de proteína a la que se ligue. Sin embargo, cuando el peso molecular de los taninos es muy grande (>5000 D) se vuelven insolubles y pierden la posibilidad de precipitar proteínas. Otros factores que influyen en el grado de enlaces tanino-proteína son la estructura y la concentración de los taninos, así como

la compatibilidad de los sitios de unión de las moléculas tanino-proteína, el punto isoelectrico y la configuración de las proteínas (López Coello, 2002) . Se ha identificado que el efecto antinutritivo de los taninos es evidente en dosis de 0.5 a 2 g/kg/día (5% de la dieta) (Vásquez-Florez *et al.*, 2012).

1.3. Fermentación Sólida

La fermentación sólida (FMS), ocurre espontáneamente en la naturaleza. La FMS implica el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos en ausencia de agua libre, pero lo suficientemente húmedo para apoyar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo, sobre materiales sólidos texturizados y porosos, lo que hace que el proceso sea adecuado para la obtención de diversos productos. El bajo contenido de humedad significa que la fermentación sólo puede llevarse a cabo por un limitado número de microorganismos, principalmente hongos y levaduras, aunque algunas bacterias también se han utilizado. La FMS ha sido empleada desde hace mucho tiempo en la preparación de alimentos orientales y actualmente es usada a escala comercial para la producción de diferentes alimentos fermentados, los cuales tienen características de sabor, textura y valor nutritivo superior a los no fermentados, obtención de ácidos, enzimas fúngicas y metabolitos secundarios (Pérez-Quilatan, 1996; Mitchell *et al.*, 2002; Pandey, 2003; Singhania, *et al.*, 2009).

La FMS ha sido reportada como una tecnología de costo relativamente bajo. La FMS se ha aplicado en subproductos agroindustriales porque ofrece ventajas potenciales en el tratamiento y un valor agregado a tales residuos (Usgame, 2008). Los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos usados en los procesos FMS debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas y también por tener la capacidad de degradar factores antinutricionales mejorando la biodisponibilidad de los minerales (Robert Nout & Aidoo, 2010). Entre los microorganismos de interés particular se encuentran los pertenecientes a los géneros *Aspergillus spp* y *Rhizopus spp*, los cuales tienen la capacidad de degradar una amplia gama de sustratos orgánicos.

Los hongos del género *Aspergillus* han sido utilizados en muchos procesos industriales las capacidades que tienen este tipo de microorganismos. Los procesos más antiguos en donde se han utilizado estos hongos han sido en la fermentación de alimentos y bebidas en los países orientales. Entre los productos elaborados se encuentran: miso (pasta de soja), shoyu (salsa de soja), sake (vino de arroz), shochu (espíritus), y yonezu (vinagre de arroz) (Golman & Osmani, 2008). El *Rhizopus*, se ha utilizado para la elaboración de productos como el Tempeh, debido a las características organolépticas y nutricionales que le proporciona al producto (Robert Nout & Aidoo, 2010), gracias a su actividad enzimática, durante el proceso de fermentación, se

modifica la textura, el sabor y se generan cambios complejos en el valor nutritivo, al variar el contenido proteico, de lípidos, carbohidratos y por la liberación de vitaminas (Munguía-Pérez, *et al.*, 2008).

Otra característica que los hace ser ampliamente usados es que algunas especies de estos son categorizados como GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros) según la Administración de Alimentos y Drogas del gobierno de los Estados Unidos, puesto que no hay reportes de ser productores de micotoxinas; esta clasificación es muy deseada cuando se requiere trabajar con alimentos para animales y humanos (Papini, *et al.*, 2010), (Munguía-Pérez, *et al.*, 2008). Así mismo la estabilidad de los productos fermentados es superior, gracias a la liberación de ácidos orgánicos durante el metabolismo de los hongos, los cuales actúan como agentes antimicrobianos, debido a la disminución del pH del producto. El crecimiento de este grupo de hongos es afectado por la temperatura, la presencia de ácidos orgánicos, la presencia de otros hongos inhibidores y la concentración de oxígeno, que puede acelerar o retrasar su crecimiento (Robert Nout & Aidoo, 2010).

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 (Ortega David, 2012) (Mitchell et al., 2003).

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*.

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

$$X = \frac{X_m}{1 + \left(\left(\frac{X_m}{X_0}\right) - 1\right)e^{-\mu t}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Cinética de biomasa

Considerando la relación directa entre el CO₂ y el O₂, es posible conocer la evolución de la biomasa, midiendo la velocidad en el consumo de oxígeno o la velocidad de generación de CO₂:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{CO_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} X \quad \text{Ecuación 3}$$

De esta ecuación, y considerando que $dX/dt = \mu X$, se puede escribir:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{CO_2}} + m_{CO_2} \right) X \quad \text{Ecuación 4}$$

Considerando el cambio total como %CO₂, y F como flujo de aire:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \%CO_2 \cdot F = Y_{CO_2} \cdot X \quad \text{Ecuación 5}$$

La forma logarítmica de esa ecuación es:

$$\ln(CO_2) = \mu \cdot t + \text{constante} \quad \text{Ecuación 6}$$

De esta última ecuación, es posible calcular la tasa específica de crecimiento del micelio usando la composición del aire de salida de la columna del bioreactor, sin destruir la muestra, observando la cinética de evolución de la muestra durante todo el tiempo de fermentación. Esto representa una gran ventaja en los procesos de fermentación sólida (Raimbault, 1997).

2. ANTECEDENTES

La fermentación es uno de los métodos más antiguos y económicos de procesamiento de los alimentos, la cual permite un mejoramiento en el valor nutricional a través de un bio-enriquecimiento con proteínas microbianas, aminoácidos, lípidos y vitaminas. La fermentación es generalmente usada para mejorar la digestibilidad de la proteína y el contenido de vitamina B₆ en cereales, entre otras, ya sea porque disminuye la cantidad de inhibidores, factores antinutricionales o por la liberación de nutrientes para la absorción (Osman, *et al.*, 2010). La fermentación es uno de los procesos que logra una mayor reducción de factores antinutricionales, (Chelule, *et al.*, 2010; Liang, *et al.*, 2008; Eklund-Jonsson, *et al.*, 2006), al mismo tiempo prolongando la conservación y el valor nutritivo del alimento.

Marfo *et al.*, (1990) encontraron que en 72 h de fermentación disminuyó significativamente el contenido de fitatos en los productos alimenticios y ocurrió una disminución de ácido fítico (56 – 96%). Hernández *et al.*, (2010), utilizaron cepas de *Aspergillus oryzae* y *Rhodotorula sp.*, para fermentar harina de maíz, encontrando que el primero tiene una buena actividad hidrolítica sobre el fósforo fítico e indicaron que utilizando esta harina fermentada, la nutrición de los animales monogástricos puede ser más productiva.

La fermentación con *Aspergillus oryzae* podría mejorar la calidad nutricional de la soya, según Hong *et al.* (2004) quienes demostraron que la proteína y grasa cruda se incrementan después de realizar el proceso (Stein, 2011). Romero *et al.*, (2011), desarrollaron un proceso de fermentación sólida utilizando microorganismos nativos seleccionados que redujeron en 100% la presencia de alfa-galactósidos y 15% los polisacáridos no almidón (NSP), que son los factores antinutricionales termoresistentes de mayor volumen en la soya, además el proceso permitió incrementar la proporción proteica en 6%.

Osman, (2004) evaluó el efecto de la fermentación tradicional con microorganismos nativos (Khamir) sobre los inhibidores de enzimas, el ácido fítico, el contenido de taninos y la digestibilidad *in vitro* de tres variedades de sorgo, encontrando que tanto la actividad de inhibidores de enzimas (inhibidores de tripsina, inhibidores de amilasas), el contenido de ácido fítico, y el de taninos se redujo durante 24 horas de fermentación, en un 35% aproximadamente. Así mismo, la fermentación mejoró considerablemente la digestibilidad *in vitro* de la proteína, llegando a valores entre el 74,6 – 79,4%.

Elmoneim, *et al.*, (2005) fermentaron harina de sorgo durante 24 horas, encontrando que la fermentación con microorganismos nativos aumentó la solubilidad de la proteína, la capacidad de ligar grasa y la capacidad emulsificante. Towo, *et al.*, (2004), añadieron enzimas durante la fermentación de tortas de sorgo, encontrando que se presentó una reducción significativa de los compuestos fenólicos del sorgo, y de las fitasas; además se incrementó la digestibilidad *in vitro* del hierro. Correia, *et al.*, (2005), realizaron fermentaciones de harina de sorgo con bacterias ácido-lácticas, encontrando un incremento en los aminoácidos libres y el contenido total de proteínas.

Mohamed *et al.*, (2007) evaluaron el efecto del procesamiento y la posterior fermentación sobre el contenido de factores antinutricionales del mijo perla. Particularmente, para el contenido de taninos encontraron que los tratamientos aplicados (molienda, remojo, autoclavado, fermentación) a excepción de la germinación, contribuyeron a la disminución del mismo.

Teniendo en cuenta esto Osman, *et al.*, (2010) estudiaron los cambios en la proteína cruda, los azúcares solubles y los ácidos orgánicos durante la fermentación tradicional, con microorganismos nativos, del sorgo (Kisra), encontrando que a diferencia de otros estudios, con las variedades de sorgo utilizadas, el aumento en el contenido de proteína cruda fue poco (<1%), mientras que la variación en el contenido de glucosa, fructosa y maltosa fue notoria durante el proceso debido a la actividad microbiana, presentándose en general una reducción del contenido de azúcares, así mismo encontraron que el contenido de ácido láctico, ácido acético y alcohol fue significativamente mayor al finalizar la fermentación.

Abdelseed, *et al.*, (2011) estudiaron, entre otros, el contenido de factores antinutricionales en cuatro nuevas líneas desarrolladas del sorgo antes y después de aplicar un método tradicional de fermentación, encontrando que los valores disminuyeron significativamente. En el caso del sorgo, la reducción fue alrededor del 50%, comparable con lo obtenido por autores como Abdel Rahman (2005) y El Tinal (1995). Así mismo, evaluaron el contenido de proteína digerible indicando que este aumentó de 44.01 a 70.38%. Algunos estudios muestran que los grupos terminales de las proteínas forman complejos estables que son insolubles y no disponibles biológicamente para los humanos y animales monogástricos, se ha sugerido que durante la fermentación las proteínas insolubles (prolaminas y glutelinas) experimentan cambios estructurales, que los hacen más accesibles al ataque de la pepsina y por tal motivo presentan mayor digestibilidad, lo cual explica los resultados obtenidos.

Murekatete *et al.*, (2012), evaluaron el efecto de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* sobre las propiedades nutricionales de una harina compuesta de soya, maíz y sorgo germinado; los resultados

obtenidos muestran un incremento en la digestibilidad *in vitro* de la proteína, debido posiblemente a la hidrólisis que ocurre durante la fermentación, acorde con otros estudios reportados por los autores. Schons, *et al.*, (2012) investigaron el efecto de las enzimas tanasa, fitasa y la fermentación con *Paecilomyces variotii* sobre el contenido de taninos (hidrolizable y condensados) y fitatos, los experimentos realizados mostraron que el contenido de estos fue reducido en todos los tratamientos; para los taninos condensados se presentó una reducción entre el 86 al 93% acorde con otros estudios realizados.

Pranoto, *et al.*, (2013) estudiaron los cambios en digestibilidad *in vitro* de la proteína en la harina de sorgo, sometidos a dos métodos de fermentación, uno natural y otro utilizando *Lactobacillus plantarum*. En cada caso, se presentó un incremento en la proteína, siendo mayor durante el proceso con *L. plantarum* (41,81 a 80,31%). Este incremento fue asociado a la hidrólisis de proteínas y los taninos, llevada a cabo por el microorganismo, el cual presenta actividad proteolítica.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las proteínas son parte fundamental de los alimentos, su consumo diario en las proporciones adecuadas debe cubrir todos los requerimientos esenciales para mantener funcionando cualquier organismo, llevando a cabo todas las funciones metabólicas, durante toda la vida de este (Segura Nieto *et al.*, 2005). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), una proteína biológicamente completa es aquella que contiene todos los aminoácidos esenciales (AAE) en una proporción igual o superior a la requerida por la especie, humanos o animales. De acuerdo a esto, las proteínas de origen animal (POA) tienen ventajas sobre las proteínas de origen vegetal (POV), ya que poseen una adecuada y biodisponible cantidad de aminoácidos, lo que genera una tendencia creciente al consumo mundial de esta proteína, como respuesta al crecimiento de la población y la urbanización. Sin embargo, en muchos países, el acceso a la proteína de origen animal es limitado, entre otros motivos, por su elevado precio relacionado con los costos del sistema de producción (Latham , 2002).

A pesar de que los cereales, como el sorgo, son importantes fuentes de proteínas, carbohidratos y minerales (hierro, potasio, magnesio, zinc) también contienen compuestos como ácido fítico, proteasas, taninos, entre otros, que se consideran factores anti-nutricionales en humanos y animales, debido a que forman complejos insolubles, impidiendo la absorción de los nutrientes presentes (Poutanen et al., 2009) y disminuyendo la digestibilidad de los aminoácidos. De estos, los taninos en el sorgo son los que se encuentran en mayor proporción, por tanto la reducción de estos factores es imperante, tanto para el mejoramiento de la calidad de los alimentos suministrados, como para potenciar el uso de este cereal como alimento humano y animal.

Se han evaluado varios métodos encaminados a la reducción de estos factores antinutricionales, su aplicación depende de las características físico-químicas y la sensibilidad de estos factores a los cambios físicos, químicos, así como a procesos tecnológicos (Van der Poel y Melcion 1995). Una de las alternativas tecnológicas viables para la disminución de estos compuestos es la fermentación sólida. En los últimos años, se han incrementado los estudios en este proceso para ser aplicado a destoxificación y reducción de factores antinutricionales de diversos productos, debido a que esta presenta ciertas ventajas como costos, variedad de sustrato, escasa producción de efluentes, calidad y cantidad de productos obtenidos, entre otros, sobre otro tipo de procesos. La fermentación sólida es por tanto, un método de interés, debido a su capacidad

de aumentar satisfactoriamente la biodisponibilidad de los nutrientes (Chelule, Mbongwa, Carries, & Gqaleni, 2010).

Los estudios utilizando procesos de fermentación son variados, sin embargo utilizando hongos son escasos. Para llevar a cabo un proceso de este tipo es necesario conocer los parámetros involucrados que garanticen una disminución de los taninos a límites permisibles. Por tanto se plantea, la aplicación de un proceso de fermentación sólida a granos de sorgo, identificando el microorganismo más adecuado para el proceso y determinando las variables que permiten su crecimiento y mejor acción sobre el sustrato para la reducción efectiva del contenido de taninos.

4. JUSTIFICACIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), por sus características nutricionales y agroclimáticas, se encuentra entre el grupo de cereales de mayor importancia a nivel mundial. Estas características hacen que este cereal pueda ser considerado como una alternativa potencial para la fabricación de alimentos dirigidos a la alimentación humana y animal (López Ortiz, Tique, & Pérez Lavalle, 2011). A pesar de su contenido nutricional, comparable con el de otros cereales, presenta algunas limitaciones en su uso debido a la presencia de factores antinutricionales como los taninos condensados, los cuales son compuestos capaces de formar complejos estables con proteínas y otros polímeros, interfiriendo en la asimilación y digestión de los mismos produciendo daños al organismo que los consume. Por tanto, la reducción de estos compuestos, es esencial para el mejoramiento de la calidad y el fomento del uso como alimento de los granos de sorgo (Schons, Battestin, & Alves Macedo, 2012).

Todos los factores antinutricionales pueden ser reducidos hasta niveles de seguridad para su empleo si se someten los granos a tratamientos adecuados. Sin embargo, cuando se someten a tratamientos térmicos, éstos pueden afectar la digestibilidad de la proteína y la disponibilidad de los aminoácidos; igualmente, el valor energético de la grasa disminuye (Ortíz, 2009). La fermentación sólida (FMS), representa una alternativa tecnológica para reducir esos factores antinutricionales e incrementar el valor nutricional de una gran variedad de legumbres y cereales, manteniendo propiedades sensoriales aceptables (Cuevas-Rodríguez, y otros, 2006).

La FMS es uno de los procesos que logra mayor reducción de factores antinutricionales, (Liang *et al.*, 2008; Chelule *et al.*, 2010; Eklund-Jonsson *et al.*, 2006), debido al aporte de enzimas microbianas o la misma activación de las enzimas endógenas de los granos, que ocasionan la degradación de estos factores (Mahgoub & Elhag, 1998), al mismo tiempo, ayuda a la conservación y el incremento del valor nutritivo del alimento. Con la reducción de los factores antinutricionales la fermentación provoca incremento de la solubilidad de minerales en los alimentos, mejorando la biodisponibilidad de los mismos en cereales (Liang *et al.*, 2008).

En los últimos años, se han incrementado los estudios de fermentación en estado sólido con hongos filamentosos, para la disminución de factores antinutricionales debido a que esta ofrece ciertas ventajas como variedad de sustrato, escasa producción de efluentes, calidad y cantidad de productos obtenidos, entre otros. Algunos de los microorganismos de interés particular para llevar a cabo el proceso de FMS son los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* spp y *Rhizopus* spp, los cuales tiene la capacidad de degradar una amplia gama de sustratos orgánicos (Papini, Salazar, & Nielsen, 2010), (Munguía-Pérez, Espinosa-Taxis, Hernández-Arroyo, Reyes-Matías, Gonzales-Salome, & Melgoza-Palma, 2008). La fermentación sólida (FMS), representa una alternativa tecnológica para reducir esos factores antinutricionales en el sorgo e incrementar su valor nutricional, manteniendo propiedades sensoriales aceptables (Cuevas-Rodríguez, *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta las ventajas que trae aplicar un proceso de fermentación sólida y que son una alternativa viable para obtención de productos con mejores características nutricionales, útil tanto en la alimentación humana como animal, en el presente estudio se establece los parámetros del proceso, con hongos filamentosos que reducen el contenido de taninos condensados en el sorgo.

5. HIPÓTESIS

El proceso de fermentación sólida con hongos filamentosos a granos de sorgo, reduce el contenido de taninos a niveles inferiores al 2% (Valor correspondiente al total presentado en granos con alto contenido de taninos).

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del proceso de fermentación sólida sobre el contenido de taninos condensados del sorgo (*Sorghum bicolor* (L)).

6.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar el microorganismo apropiado para utilizar durante el proceso de acuerdo a su capacidad de crecimiento sobre el sustrato.
- Comparar el rendimiento en la producción de esporas y la homogeneidad en el consumo de sustrato durante la fermentación con diferentes inóculos iniciadores
- Optimizar los parámetros de fermentación de acuerdo al microorganismo seleccionado, que permitan la reducción de taninos condensados y el incremento de la digestibilidad del sorgo.

7. METODOLOGÍA

Para la realización de esta investigación inicialmente se seleccionó de un grupo de microorganismos de la colección caracterizados como GRAS, el más adecuado para llevar a cabo el proceso teniendo en cuenta su velocidad de crecimiento radial, longitudinal y la producción de biomasa; así mismo se evaluó si el sustrato requería de un remojo previo para que la adaptación del microorganismo al medio fuera apropiada. Una vez seleccionado el hongo y la adecuación del sustrato se llevaron a cabo las pruebas descritas por el diseño experimental para optimizar las principales variables del proceso: temperatura, velocidad de aire, tamaño de partícula y concentración de coadyuvantes (salvado de trigo). Una vez seleccionado el mejor tratamiento, se realizaron las cinéticas de fermentación para caracterizar el proceso, en las cuales se relacionaron el comportamiento de los azúcares totales y reductores, las proteínas y el contenido de taninos condensados. Finalmente se realizó una caracterización microbiológica y fisicoquímica del producto obtenido.

7.1. Selección del microorganismo apropiado para utilizar durante el proceso de acuerdo a su capacidad de crecimiento sobre el sustrato.

7.1.1. Obtención y caracterización de la materia prima

El sorgo se adquirió en un mercado local de la ciudad de Cali, posteriormente fue transportado al laboratorio de Microbiología y Biotecnología Aplicada de la Universidad del Valle, donde se separó y empacó en bolsas de polietileno de 500 g, las cuales fueron selladas a vacío y almacenadas a 5 °C durante el periodo de experimentación.

El sorgo se caracterizó en cuanto a su contenido de humedad (AOAC 934.01), cenizas (AOAC 942.05), contenido de grasas (AOAC 920.39) y proteína cruda (AOAC 976.05). Así mismo, se cuantificó el contenido de taninos condensados, su capacidad de retención de agua, pH y el contenido de azúcares totales y reductores, siguiendo la metodología descrita a continuación:

7.1.1.1. Contenido de Taninos Condensados (NTC 602):

Se tomó 1 mL de las muestras convenientemente diluidas en dos (2) tubos de ensayo y se colocaron en un baño de agua termo-regulado a 30 °C. Después de que las muestras se atemperaron, se agregaron 5,0 mL de reactivo de vainillina a uno de los tubos y 5,0 mL de HCl al 4 % a otro tubo (blanco) a intervalos de 1,0 min entre una muestra y la siguiente. Las muestras se dejaron en el baño de agua por 20 min. Luego se retiraron y se leyó la absorbancia a 500 nm. La absorbancia del blanco corresponde a la absorbancia de la muestra que contiene la vainillina. La diferencia en absorbancias se comparó con la obtenida en la curva patrón para hallar el equivalente de catequina.

7.1.1.2. Capacidad de retención de agua (WAI):

Para determinar la capacidad de retención de agua, se suspendió 1.25 g del sorgo molido en 15 mL de agua destilada, por 10 min con agitación constante. Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante se decantó, se registró el peso del gel obtenido y se calculó la WAI según la ecuación 7.

$$WAI = \frac{\text{Peso del gel}}{\text{Peso del soporte seco}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

7.1.1.3. pH

Se suspendió 1 g de sorgo molido en 10 mL de agua destilada por 30 min. Al cabo de este tiempo a la solución obtenida se le realizó la determinación de pH utilizando un equipo Orión 710 – A del laboratorio de Biología Marina de la Universidad del Valle (AOAC 943.02/90).

7.1.1.4. Azúcares totales y reductores

Para la cuantificación de los azúcares presentes en el sorgo, se pesaron 10 g de la muestra y se adicionaron a 90 mL de agua destilada estéril, posteriormente la mezcla se homogenizó y se dejó durante 12 h a 5 °C, al cabo de este tiempo se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se separó y se diluyó convenientemente en agua destilada. Los azúcares totales fueron determinados por el método de DUBOIS et al., (1956), conocido como el método de antrona, mientras que los azúcares reductores fueron determinados por el método DNS.

7.1.2. Reactivación y conservación de los microorganismos

Se utilizaron esporas secas de 2 microorganismos, reconocidos como GRAS, *Aspergillus oryzae* (ATCC 20387) y *Rhizopus oryzae* (MUCL 28168). Para la reactivación y propagación, las esporas se suspendieron en tubos de ensayo con 5 mL de agua destilada estéril durante 30 min, se prepararon tubos de ensayo con 8 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA), y posteriormente la solución de esporas fue sembrada por agotamiento en los tubos con agar e incubados a 30 °C por 8 días. Al cabo de este tiempo se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril a los tubos de ensayos con el cultivo y se almacenaron a 28 °C, con resiembra cada tres meses para su conservación.

7.1.3. Selección del microorganismo y adecuación del sustrato

Para determinar el tipo de microorganismo más indicado y la adecuación apropiada del sustrato, los granos de sorgo, crudos y secos, fueron quebrados empleando un molino de cuchillas y separados en diferentes tamaños de partículas, utilizando para esto una serie de mallas ASTM en el equipo Ro –Tap durante 10 minutos. Se seleccionaron partículas de tamaño 0,3 mm (Malla # 50), las cuales fueron sometidas a dos tratamientos: (1) Sin Remojo Previo (2) Remojado. Los granos se remojaron durante 16 h en una proporción 3:1 con agua acidificada con ácido láctico, a pH 3.5 y posteriormente se drenaron.

Posterior a la adecuación, los granos fueron dispuestos en el medio de cultivo agar – agar, inoculados con el microorganismo e incubados a temperatura constante de 30 °C durante 4 días (Figura 2). Se utilizó un diseño factorial completamente al azar con dos factores (tipo de microorganismo, adecuación del sustrato), como variable respuesta la velocidad de crecimiento radial, la velocidad longitudinal, la cantidad de biomasa producida y el contenido de taninos condensados (Tabla 2) , y considerando un nivel de significancia de 0.05, utilizando el software Minitab©.

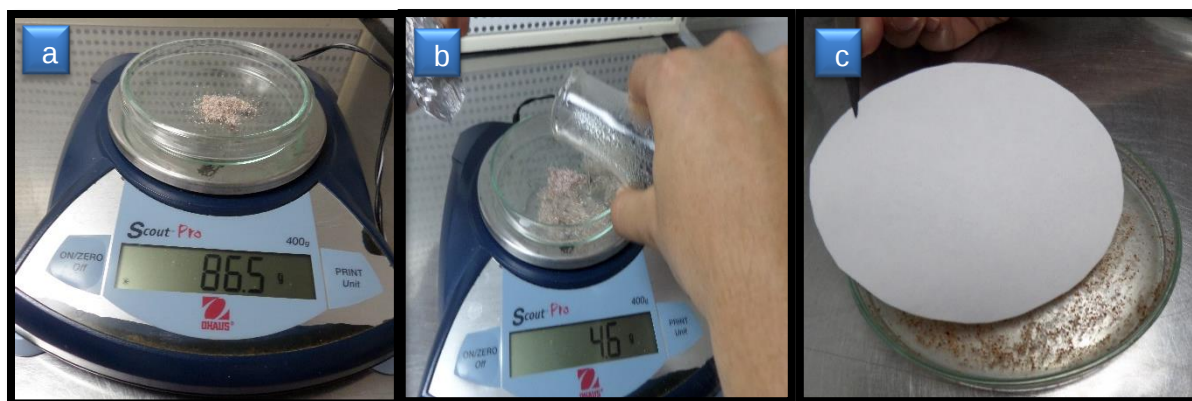


Figura 2. Montaje para medición de la velocidad radial de crecimiento y cuantificación de biomasa

Tabla 2. Diseño Factorial para selección del microorganismo y adecuación del sustrato

FACTORES	NIVELES	VARIABLE RESPUESTA
Microorganismo	<i>Rhizopus Oryzae</i> (MUCL 28168)	• Velocidad de crecimiento radial • Velocidad máxima de crecimiento • Cantidad de biomasa producida
	<i>Aspergillus Oryzae</i> (ATCC 20387)	
Tratamiento del sustrato	Crudo	
	Remojado	

7.1.3.1. Determinación de la velocidad de crecimiento radial y longitudinal

El crecimiento radial y longitudinal fueron los dos métodos propuestos para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes sobre un sustrato.

Para evaluar la velocidad de crecimiento radial, se cortaron discos de 5 mm de diámetro de muestras del hongo ($1,8 \times 10^7$ esporas/g), sembrados en cajas Petri con agar PDA durante 8 días anteriores al ensayo, los cuales se colocaron en el centro de cajas Petri con 15 mL del sustrato sorgo – agar agar preparado previamente. La capacidad de invasión se determinó midiendo el incremento del valor del radio de la colonia cada 12 h.

Para la velocidad longitudinal, se prepararon tubos de Ryan con 20 mL del medio sustrato sorgo – agar agar preparado previamente y se inocularon por picadura en un extremo del tubo con 200 μ L de una dilución de esporas de 8×10^7 /mL. La capacidad de invasión se determinó midiendo con un pie de rey el crecimiento longitudinal cada 12 h.

7.1.3.2. *Cuantificación de biomasa por peso seco*

Para la determinación de biomasa se inocularon por picadura 200 μL de una dilución de esporas de $8 \times 10^7/\text{mL}$ en una caja Petri con medio sustrato sorgo – agar-agar y con papel filtro. Al cabo del periodo de crecimiento (4 días), el papel filtro fue retirado del medio, y la biomasa obtenida fue lavada con una solución de NaCl al 10% p/v, colocándola en un papel filtro nuevo de peso conocido. La biomasa colocada en el papel fue lavada 2 veces con agua destilada y llevada a peso constante durante 24 h a 60 °C.

7.1.3.3. *Evaluación del efecto de la fermentación sobre la degradación de los taninos*

Para la determinación del contenido de taninos en el sustrato después de fermentación, se inocularon por picadura 200 μL de una dilución de esporas de $8 \times 10^7/\text{mL}$ en una caja Petri con medio sustrato sorgo – agar-agar. Al cabo del periodo de crecimiento (4 días), se tomó 1 g de muestra, se homogenizó en 10 mL de Metanol y se mantuvo en agitación constante a 120 rpm durante 30 min, al cabo de este tiempo la muestra fue centrifugada a 10000 x g por 15 min, el sobrenadante fue retirado para seguir el protocolo descrito el ítem 7.1.1.1.

7.2. Comparación del rendimiento de la producción de esporas y la homogeneidad en el consumo de sustrato durante la fermentación de diferentes inóculos iniciadores

Con el objetivo de realizar una producción masiva de esporas, verificar y asegurar su mantenimiento por periodos prolongados y lograr un proceso de fermentación homogéneo, se evaluaron tres métodos de preparación de inóculos: solución de esporas, micelio y tane-koji. Para este ensayo se llevó a cabo el proceso de fermentación sólida en columnas empacadas tipo Raimbault, utilizando sorgo molido y tamizado, con un tamaño promedio de partículas de 1,6 mm y humedad ajustada de 35% (bh), a temperatura de 34 °C y velocidad de aire de 100 m/s durante 24 h. Antes de empacar las columnas el sorgo fue inoculado en concentración promedio equivalente de $5,0 \times 10^7$ esporas/g, para los tres tipos de inóculos. Se empleó un diseño experimental unifactorial completamente al azar, con niveles esporas, micelio y tane-koji, y con nivel de significancia de $\alpha < 0,05$.

Para establecer el tipo de inóculo, se evaluó la homogeneidad en el consumo de sustrato, como variable respuesta, midiendo el contenido de azúcares totales (Ítem 7.1.1.4) y el contenido de azúcares reductores (Ítem 7.1.1.4) en diferentes puntos aleatorios de la columna al finalizar el proceso de fermentación y se calculó la desviación estándar con la ecuación 8.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

S: desviación estándar

N: número de muestras

x_i : Concentración de azúcares en cada muestra

$\bar{x}$: Valor medio del contenido de azúcares

Los inóculos estudiados fueron preparados de la siguiente forma:

1. **Solución de esporas:** Se elaboró un medio con 50 mL de PDA (contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL) y se inoculó con esporas previamente desarrolladas en tubos inclinados, incubándose por 5 días a 30 °C; las esporas producidas se recolectaron con 100 mL de una solución Tween 80 al 0.01%
2. **Tane-Koji:** El inóculo se elaboró siguiendo la técnica del método tane-koji, a partir de arroz integral cocido a vapor. Durante el proceso, el arroz se inoculó con esporas en suspensión en una concentración de 7×10^7 /mL, durante 75 horas hasta completa esporulación, posteriormente se secó a 45 °C durante 20 min hasta alcanzar un contenido de humedad del 12% (Hidaki, 2009). El producto obtenido se molió en molino de cuchillas y fue almacenado en recipientes estériles a 28 °C.
3. **Micelio:** Se elaboró un medio de cultivo en caja Petri con 15 mL de PDA y se inocularon por picadura en el centro de la caja con una solución de esporas del hongo previamente desarrolladas, incubándose por 8 días a 30 °C; para utilizar el micelio como inóculo iniciador se cortaron discos de 5 mm.

En todos los casos se realizó conteo de esporas en cámara de Neubauer y se cuantificó la concentración empleando la ecuación 9:

$$\frac{\text{No. esporas}}{\text{mL}} = (25)(1 \times 10^4)(\text{factor de dilución}) \quad (\text{Ecuación 9})$$

7.3. Optimización de los parámetros de fermentación de acuerdo al microorganismo seleccionado

7.3.1. Preparación de las muestras

El sorgo fue molido y tamizado utilizando un conjunto de tamices serie ASTM. Se seleccionaron los granos que quedaron retenidos en las mallas 10, 16 y 30, que corresponden a rangos de tamaño de (a) 1.2 a 2.0 mm (b) 0.6 a 1.2 mm y (c) 0.3 a 0.6 mm respectivamente. Posteriormente los granos fueron adecuados de acuerdo a los resultados obtenidos en el ítem 7.1.3, se adicionaron 40 mL de agua por cada 100 g de sorgo ajustando la humedad del sustrato a 35% (bh). Siguiendo la metodología descrita en el apartado 7.2, se preparó el inóculo iniciador, se adicionó al sorgo húmedo preparado, empleando 1 g inóculo/100 g de sustrato, y se homogenizó durante 5 min sobre una bandeja de aluminio estéril en la cabina de flujo laminar para evitar contaminación con otro tipo de microorganismos.

7.3.2. Proceso de fermentación y selección de parámetros

El proceso se llevó a cabo en un biorreactor, compuesto por un sistema de columnas de 4 cm de diámetro y 20 cm de altura, las cuales se empacaron con 100 g de sorgo húmedo (32% agua bh) inoculado previamente con las esporas del hongo seleccionado. Dichas columnas se colocaron en un baño termostático a 28 o 34 °C según los requerimientos del ensayo, y se conectaron a un sistema de mangueras para permitir la aireación (Figura 3).



Figura 3 Montaje del proceso de fermentación sólida. (a) Vista frontal (b) Vista lateral

Las mejores condiciones de temperatura de crecimiento, velocidad de aire, tamaño de partícula y la concentración de un coadyuvante (salvado de trigo) del proceso de fermentación de sorgo se obtuvieron mediante un diseño central compuesto, con dos niveles por factor como lo muestra la Tabla 3. Se tomaron en cuenta datos obtenidos en la literatura para seleccionar el número y la variación de niveles de las variables de proceso en el diseño experimental. El diseño experimental se ajustó al modelo de segundo orden según la ecuación 10:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \text{ (Ecuación 10)}$$

Tabla 3. Niveles de los factores Temperatura, Velocidad de aire, tamaño de partícula y concentración de coadyuvantes de fermentación

Factor	Variable Codificada		Variable Natural	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Temperatura (°C)	-1	+1	28	34
Velocidad de Aire (mm³/min)	-1	+1	60	100
Tamaño de partícula (mm)	-1	+1	0.3	2.0
Concentración de Salvado (%)	-1	+1	0	5

Las variables de respuesta que se utilizaron para conocer las mejores condiciones de proceso fueron el contenido de proteínas, azúcares totales y reductores y el contenido de taninos condensados. La Tabla 4, muestra los ensayos que se llevaron a cabo para obtener las diferentes combinaciones de las variables estudiadas en el proceso de fermentación sólida del sorgo.

Tabla 4. Ensayos llevados a cabo para determinar los parámetros del proceso de fermentación sólida en sorgo

Ensayo	Temperatura (°C)	Velocidad de aire (mm ³ /min)	Concentración de salvado (X)	Tamaño de partícula (mm)
1	29,5	70	0,01	1,3
2	31,0	80	0,03	1,0
3	31,0	80	0,03	1,0
4	32,5	90	0,04	1,3
5	28,0	80	0,03	1,0

6	32,5	90	0,04	0,6
7	32,5	90	0,01	0,6
8	29,5	90	0,04	0,6
9	31,0	80	0,03	1,0
10	31,0	80	0,03	1,0
11	32,5	90	0,01	1,3
12	29,5	70	0,01	0,6
13	32,5	70	0,04	0,6
14	29,5	90	0,01	0,6
15	31,0	80	0,03	1,0
16	32,5	70	0,01	0,6
17	31,0	80	0,03	0,3
18	29,5	90	0,04	1,3
19	29,5	90	0,01	1,3
20	34,0	80	0,03	1,0
21	29,5	70	0,04	0,6
22	31,0	80	0,03	1,0
23	32,5	70	0,01	1,3
24	31,0	60	0,03	1,0
25	31,0	80	0,03	1,0
26	31,0	100	0,03	1,0
27	32,5	70	0,04	1,3
28	31,0	80	0,05	1,0
29	29,5	70	0,04	1,3
30	31,0	80	0,00	1,0
31	31,0	80	0,03	1,6

7.3.2.1 Cuantificación del contenido de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteína soluble, se utilizó el método de Lowry modificado (LOWRY et al., 1951).

7.3.2. Cinética de fermentación en columna

De los resultados obtenidos al evaluar los parámetros de fermentación, se seleccionaron las condiciones de fermentación más favorables para llevar a cabo las cinéticas en biorreactor en columna. Las cinéticas de fermentación se realizaron en el biorreactor, empacando las columnas con 100 g de sorgo húmedo (35 % bh) e inoculado previamente con 1% de una solución de esporas. Una vez colocadas las columnas en el baño regulado, se suministró un flujo constante de aire. Se tomaron muestras directas cada 3 h durante 24 horas, para cuantificar la producción de CO₂, el consumo de azúcares totales y reductores, el contenido de proteína y aminoácidos.

7.3.2.1. Cuantificación del CO₂

Para cuantificar el CO₂ producido por los microorganismos durante su crecimiento, se utilizaron trampas de CO₂ y posterior titulación, siguiendo el protocolo descrito por Barrena Gómez, 2006. El aire de salida de las columnas de la respiración, se condujo a una columna empacada con silica gel para retener el agua presente (Figura 4) y permitir el paso del dióxido de carbono, a la salida de estas columnas se conectó una manguera que cae a una trampa de hidróxido de bario, contenido en un Erlenmeyer de 1000 mL sellado herméticamente. Al descargar el contenido total de las mangueras en la trampa, se procedió a la titulación. La cantidad de CO₂ producido se determinó mediante la fórmula de intensidad respiratoria:

$$I.R = ((V_b - V_m) * N * 22 * 60) / (W * t) \text{ (Ecuación 11)}$$

Donde:

V_m=Volumen de ácido oxálico para titular la muestra (mL)

V_b= Volumen de ácido oxálico para titular el blanco (mL)

N= Normalidad del ácido oxálico (meq/L)

22=Peso miliequivalente del CO₂ (g/meq)

60=Factor de conversión para el tiempo (min/h)

t=Tiempo de barrido (min)

W=Peso de la muestra (Kg)

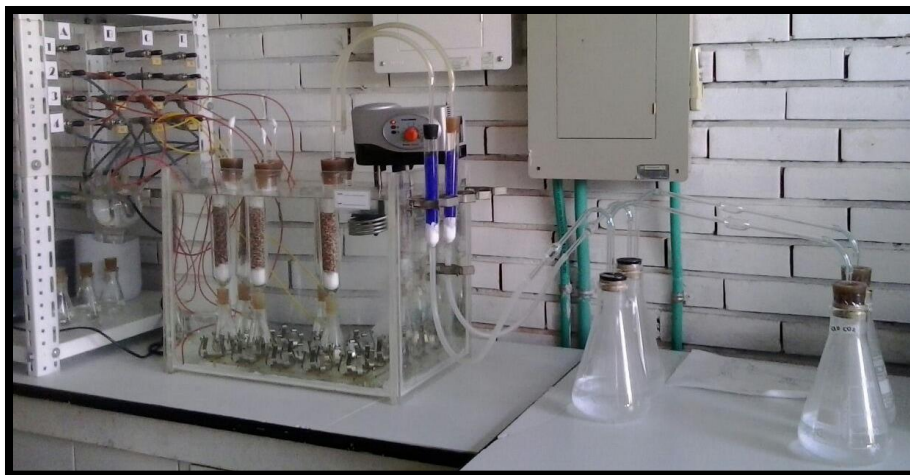


Figura 4. Montaje para cuantificación del CO₂

7.3.3. Caracterización del producto obtenido

Luego de 21 horas de fermentación, se realizaron diversos análisis para caracterizar el producto final obtenido. Se realizó un análisis proximal que comprendió humedad (AOAC 934.01), cenizas (AOAC 942.05), contenido de grasas (AOAC 920.39) y proteína cruda (AOAC 976.05).

Se realizó la caracterización del sorgo por microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un Microscopio de Barrido Electrónico (SEM), referencia G3 ProX de Phenom-World (www.phenom-world.com), con capacidad de aumentos de 100.000X y resolución de 17 nm por pixel, ubicado en el laboratorio de Cocoltec, de la ciudad de Medellín (Antioquia).

Se efectuó además análisis de aminoácidos mediante HPLC, utilizando una columna AGILENT - ZORBAX Eclipse® AAA Analytical 4.6x150 mm - 5 µm en los laboratorios de la Universidad Nacional y el laboratorio de análisis TECNIMICRO S.A.S de la ciudad de Medellín (Antioquia). Se realizó la cuantificación de 10 aminoácidos esenciales incluyendo Triptófano.

Se llevaron a cabo pruebas microbiológicas de acuerdo a las Normas Técnicas Colombianas (NTC). El recuento de aerobios mesófilos (NTC 4519 de 1998) se realizó en Agar Plate Count (PCA) incubando las muestras a 35 °C por 48 h; el recuento de mohos y levaduras (NTC 4132 de 2008) se determinó por siembra en PDA (PDA) a 25 °C durante un periodo de 3 a 5 días; para el conteo de coliformes totales se utilizó el método del número más probable (NMP) (NTC 4516 de 1998) a 35 °C de 24 a 48 horas.

Así mismo se realizó un análisis del contenido de taninos condensados (NTC 602), digestibilidad *in vitro* (NTC 719) y Espectrofotometría con ácido tiobarbitúrico (T.B.A).

Los resultados obtenidos se compararon con los exigidos en las Normas Técnicas Colombianas (NTC 602) para este tipo de productos y se compararon con harinas sin fermentar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Selección del microorganismo apropiado para utilizar durante el proceso de acuerdo a su capacidad de crecimiento sobre el sustrato.

8.1.1. Caracterización de la materia prima

El sorgo adquirido presentaba una coloración rojiza, lo cual es un indicio del contenido de taninos condensados del mismo (Figura 5). Su forma era esférica con diámetros variables promedios de $4.20 \text{ mm} \pm 0.6 \text{ mm}$. Este material se caracterizó siguiendo la metodología propuesta en el Ítem 7.1.3., los resultados se presentan en la Tabla 5.



Figura 5. Aspecto físico de los granos de sorgo

Tabla 5. Caracterización del sorgo crudo

Componente	Valor
<i>Humedad (%)</i>	$9,98 \pm 0,34$
<i>Carbohidratos totales %(bs)</i>	$89,62 \pm 0,50$
<i>Azúcar reductor (g glucosa/g sustrato)</i>	$2,95 \pm 1,43$
<i>Azúcar total (g glucosa/g sustrato)</i>	$15,12 \pm 2,95$
<i>Proteína cruda % (bs)</i>	$7,33 \pm 0,50$
<i>Proteína soluble (%)</i>	$57,34 \pm 0,50$

Fibra cruda % (bs)	2,41 ± 0,50
Cenizas % (bs)	1,19 ± 0,50
Grasa % (bs)	1,86 ± 0,50
Taninos Condensados %	2,24 ± 1,57
pH	6,30 ± 0,50
WAI (g gel/ g soporte)	1,82 ± 0,13
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) µg/Kg	No detectable

Es evidente que el mayor macronutriente del sorgo son los carbohidratos, representando un 89,62% del total. Los carbohidratos de este cereal están presentes principalmente en forma de almidón, que corresponde a un polisacárido de reserva de las plantas. De los carbohidratos totales la fibra cruda representó un 2,41%. La proteína cruda de este cereal se encontró en un rango de 7,33%, siendo el segundo macronutriente de mayor contenido del grano, estas proteínas se encuentran representadas principalmente por prolaminas. Los lípidos, correspondieron a 1,86% del total de nutrientes en el cereal, siendo la mayoría de los lípidos ácidos grasos poliinsaturados (Queiroz *et al.*, 2011). Se encontró además que la capacidad de retención de agua por parte del material, dado por el valor del WAI, fue de 1,82 g gel/g sólido, mientras el contenido de taninos condensados fue del 2.24%.

Los valores registrados en la Tabla 5 son inferiores a los reportados por López *et al.*, (2011), (Bustos Vázquez *et al.*, (2010) sin embargo son superiores a los encontrados en algunas variedades de maíz (Betancourt, 2013) lo cual muestra el potencial que tiene este cereal para ser utilizado en la industria.

8.1.2. Selección del microorganismo apropiado a utilizar durante el proceso

Siguiendo la metodología propuesta en el Ítem 7.1.3.1, se registró el crecimiento radial y longitudinal de los hongos *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae* durante 4 días. La medición de la velocidad de crecimiento de hongos filamentosos, indica la capacidad de los mismos, para colonizar algún sustrato empleado en procesos de fermentación sólida. En la Figura 6 se puede observar el aspecto de la colonia al finalizar el periodo de crecimiento. Es notable que mientras la colonia de *Rhizopus oryzae* invadió todo el espacio de la caja (63,61 cm²), el *Aspergillus oryzae* mostró ligero crecimiento, mostrando además una rápida esporulación, debido posiblemente al estrés generado sobre el hongo y a que las condiciones del medio no eran adecuadas para su desarrollo.

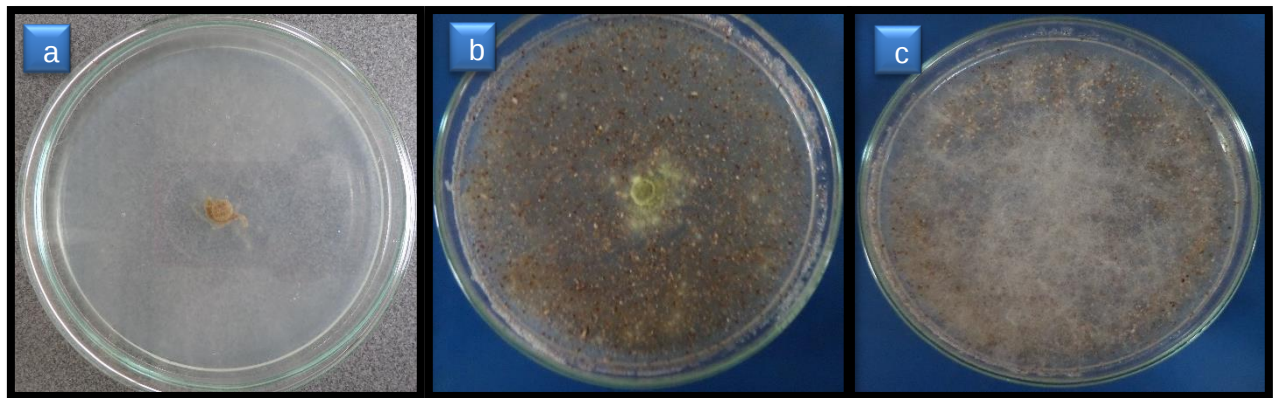


Figura 6 Crecimiento radial microorganismos durante 4 días (a) en medio agar-agar sin sustrato sorgo (b) *Aspergillus oryzae* sobre sustrato sorgo (c) *Rhizopus oryzae* sobre sustrato sorgo

Con los datos obtenidos, se graficó el radio en función del tiempo (Figura 7). Las curvas muestran la tendencia general del crecimiento radial de las cepas estudiadas. Se observa que el hongo *Rhizopus oryzae* creciendo sobre sustrato sin remojo previo tiene un corto periodo de adaptación (24 h) seguido por un rápido crecimiento que corresponde a la fase de crecimiento exponencial, mientras que el hongo *Aspergillus oryzae* en sorgo remojado presenta la fase de adaptación y posterior crecimiento más lenta.

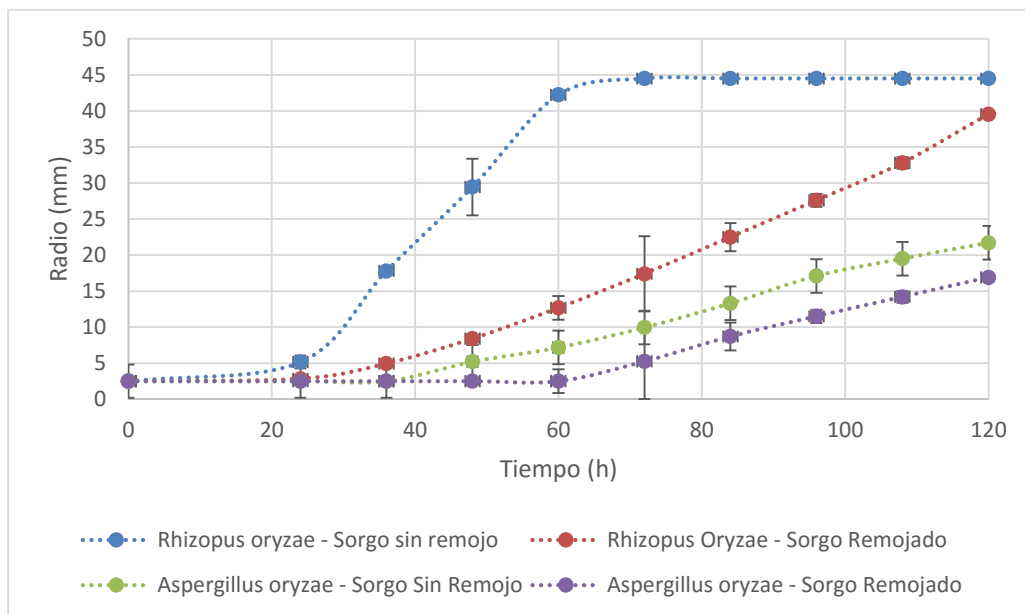


Figura 7. Crecimiento radial de los hongos en el tiempo

Con los valores registrados del radio, se obtuvo la velocidad promedio de crecimiento radial, considerando en el cálculo de ésta, el periodo de adaptación del microorganismo al medio. Los resultados se presentan en la Tabla 6. Es posible observar que la mayor velocidad de crecimiento ($0,76 \text{ mm} \pm 0,02 \text{ mm}$) se da cuando crece *Rhizopus oryzae* en sorgo sin ningún tipo de tratamiento.

Tabla 6. Velocidad de crecimiento radial de Hongos Filamentosos, en sustratos con sorgo.

Microorganismo	Velocidad Radial (mm/h)	
	SS	SR
<i>Rhizopus Oryzae</i> MUCL 28168	$0,76 \pm 0,02^a$	$0,29 \pm 0,14^b$
<i>Aspergillus Oryzae</i> ATCC 20387	$0,12 \pm 0,01^{bc}$	$0,03 \pm 0,02^c$

SS: Sorgo Sin Remojo; SR: Sorgo Remojado.

Se reporta la media y la desviación estándar. Las medias de la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados en la prueba ANOVA (Tabla 7) muestran que el estadístico p es menor a 0.05, lo que indica que existe un efecto significativo en la interacción microorganismo y adecuación del sustrato, sobre la velocidad de crecimiento radial de los hongos (mm).

Tabla 7. Resultados ANOVA para las velocidades de crecimiento radial

Fuente	Valor P
Microorganismo	0,000
Tratamiento	0,000
Microorganismo*Tratamiento	0,002

Para determinar cuáles fueron las interacciones que ejercen un efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento, se realizó la prueba POS-ANOVA de Tukey (Tabla 6), se observa que el microorganismo *Rhizopus oryzae* presenta la mayor velocidad de crecimiento radial cuando crece en sorgo sin remojo, siendo este valor estadísticamente diferente a los demás obtenidos.

En la Figura 8 se puede observar el crecimiento longitudinal de los hongos durante el tiempo de experimentación. Se evidencia que el hongo *Rhizopus oryzae* tuvo crecimiento más abundante, invadiendo a lo largo del tubo en corto tiempo, mientras se observó que el *Aspergillus oryzae* presentó una baja velocidad de elongación y una rápida esporulación.

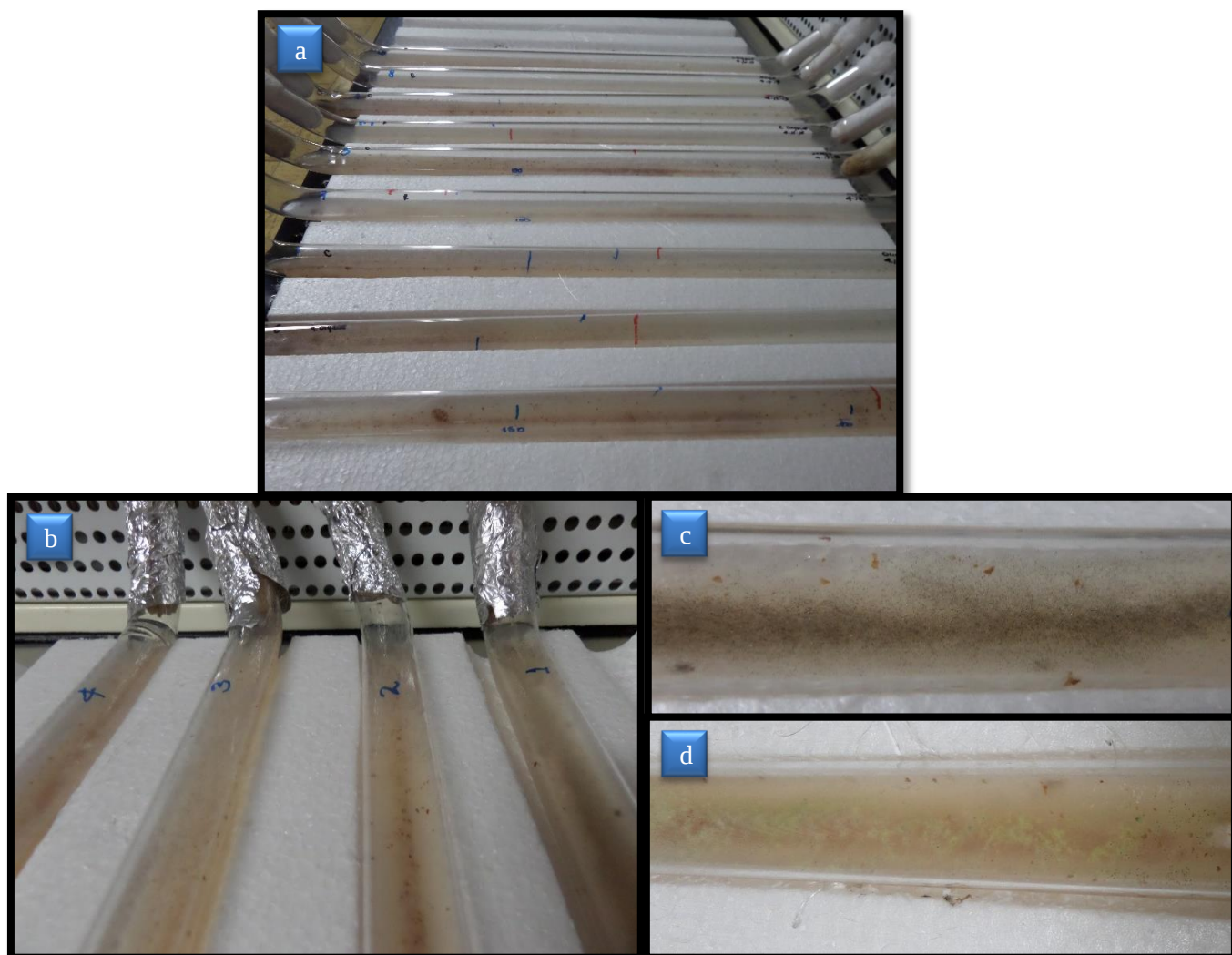


Figura 8. Crecimiento longitudinal en 4 días de fermentación de microorganismos en tubos Ryan. (a) Montaje inicial para los ensayos (b) Vista frontal de los tubos (c) Crecimiento de *Rhizopus Oryzae* (d) Crecimiento de *Aspergillus oryzae*

Con los datos, se graficó la longitud en función del tiempo (Figura 9). En estas gráficas se puede observar la alta relación lineal que presentan los microorganismos estudiados en el sustrato con y sin tratamiento, después de su periodo de adaptación y a través del periodo de crecimiento (4 días).

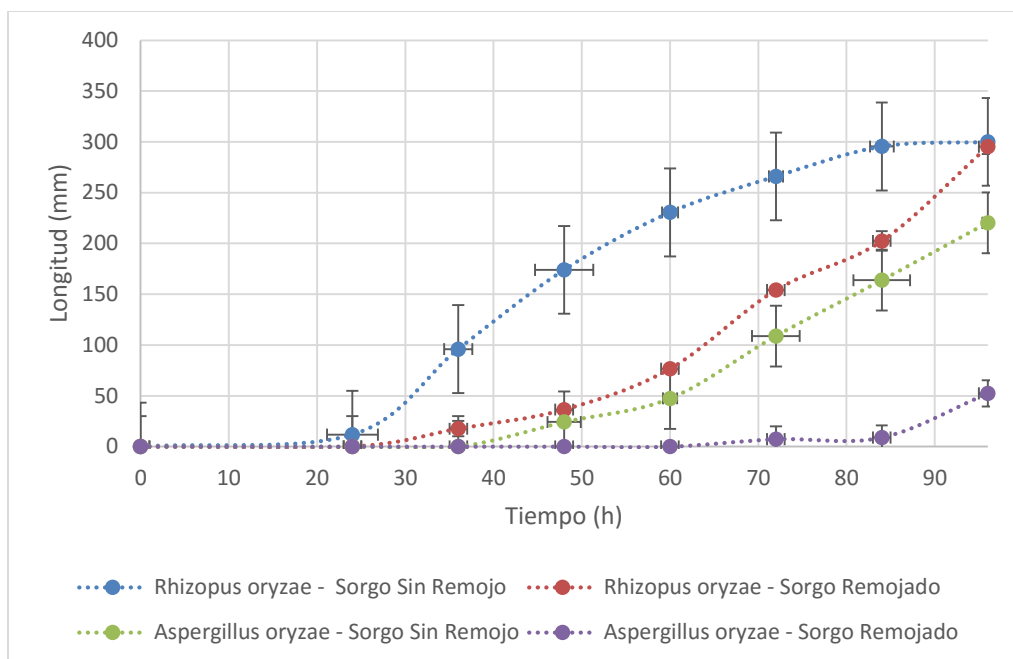


Figura 9. Crecimiento longitudinal de los hongos durante el tiempo de experimentación

Con los datos se calculó la velocidad promedio de crecimiento longitudinal, sin considerar el periodo de adaptación del microorganismo al medio. Los resultados se presentan en la Tabla 8. Es posible observar que la mayor velocidad de crecimiento ($5,31 \text{ mm} \pm 1,30 \text{ mm}$) se da cuando crece *Rhizopus oryzae* en sorgo sin ningún tipo de tratamiento previo.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento longitudinal de Hongos Filamentosos, en sustratos con sorgo.

Microorganismo	Velocidad Longitudinal (mm/h)	
	SS	SR
<i>Rhizopus Oryzae</i> MUCL 28168	$5,31 \pm 1,30^a$	$3,73 \pm 0,64^{abc}$
<i>Aspergillus Oryzae</i> ATCC 20387	$2,98 \pm 1,20^{bc}$	$0,44 \pm 0,23^d$

SS: Sorgo Sin Remojado; SR: Sorgo Remojado.

Se reporta la media y la desviación estándar. Las medias de la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados en la prueba ANOVA muestran que el estadístico p es menor a 0.05, lo que indica que existe un efecto significativo en la interacción microorganismo y adecuación del sustrato, sobre la velocidad de crecimiento longitudinal de los hongos (mm). Se observa que la interacción entre el microorganismo y el

tratamiento no ejercieron un efecto significativo sobre la variable respuesta, por ende se evaluó solo la significancia que tienen los factores individuales.

Tabla 9. Resultados ANOVA para las velocidades de crecimiento longitudinal

Fuente	Valor P
Microorganismo	0,001
Tratamiento	0,005
Microorganismo*Tratamiento	0,404

Para determinar cuáles fueron las interacciones que ejercen un efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento longitudinal, se realizó la prueba POS-ANOVA de Tukey (Tabla 8), se observa que el microorganismo *Rhizopus oryzae* presenta la mayor velocidad de crecimiento longitudinal cuando crece en sorgo sin tratamiento, sin embargo, este valor no presenta diferencias estadísticas con los obtenidos por *Rhizopus oryzae* en sorgo remojado y *Aspergillus oryzae* en sorgo sin remojo.

Siguiendo la metodología descrita en el Ítem 7.1.3.2, se cuantificó la biomasa obtenida. Los resultados se consignan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de la cantidad de biomasa producida por Hongos Filamentosos en sustratos con sorgo.

Microorganismo	Biomasa (%)	
	SS	SR
<i>Rhizopus Oryzae</i> MUCL 28168	3,75±0,50 ^a	1,28±1,27 ^{bc}
<i>Aspergillus Oryzae</i> ATCC 20387	1,34±1,00 ^{bc}	0,09±0,13 ^c

SS: Sorgo Sin Remojo; SR: Sorgo Remojado.

Se reporta la media y la desviación estándar. Las medias de la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Figura 10 se puede observar la biomasa obtenida después del periodo de crecimiento. A nivel macroscópico se observaron diferencias en las densidades de los micelios de los hongos cuando se trabajaba con el sustrato crudo seco, lo cual está relacionado con la mayor producción de biomasa por parte del *Rhizopus oryzae* ($3,75\% \pm 0,05\%$).

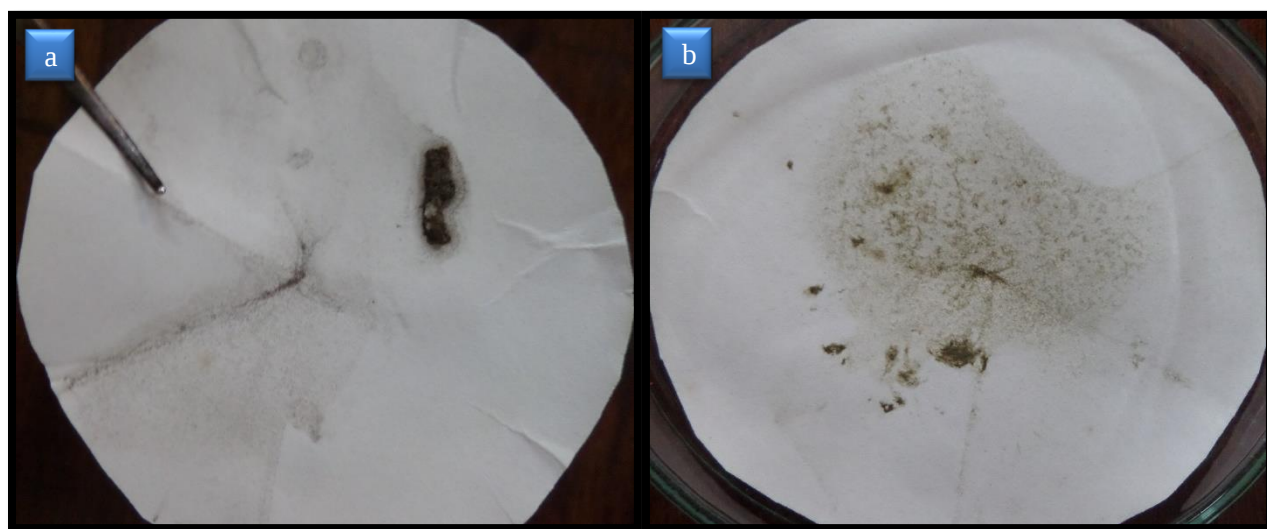


Figura 10. Biomasa obtenida después de crecimiento (a) *Rhizopus oryzae* (b) *Aspergillus oryzae*

Los resultados en la prueba ANOVA (Tabla 11) muestran que el estadístico p es menor a 0.05, lo que indica que existe un efecto significativo en la interacción microorganismo y adecuación del sustrato, sobre la biomasa producida (%).

Tabla 11. Resultados ANOVA para la producción de biomasa

Fuente	Valor P
Microorganismo	0,006
Tratamiento	0,005
Microorganismo*Tratamiento	0,246

Para determinar cuáles son las interacciones que ejercen un efecto significativo sobre la producción de biomasa, se realizó la prueba POS-ANOVA de Tukey (Tabla 10), se observa que el microorganismo *Rhizopus oryzae* presenta la mayor producción de biomasa cuando crece en sorgo sin tratamiento, siendo este valor estadísticamente diferente frente a los otros.

Siguiendo la metodología descrita en el ítem **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se cuantificó el contenido de taninos condensados, posterior al proceso de fermentación, con cada uno de los microorganismos. Los resultados fueron consignados en la Tabla 12.

Tabla 12. Contenido de taninos condensados en el sustrato sorgo después del proceso de fermentación

Microorganismo	Taninos condensados (%)	
	SS	SR
<i>Rhizopus Oryzae</i> MUCL 28168	0,63±0,08 ^c	0,83±0,06 ^{bc}
<i>Aspergillus Oryzae</i> ATCC 20387	1,04±0,06 ^b	2,43±0,10 ^a

SS: Sorgo Seco; SR: Sorgo Remojado.

Se reporta la media y la desviación estándar. Las medias de la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados en la prueba ANOVA (Tabla 13) indican que tanto el microorganismo, como el tratamiento y la interacción de los mismos, ejercen efecto significativo sobre la variable respuesta, dado que el estadístico p tuvo un valor $< 0,05$. Por tal motivo se realizó la prueba Post-Anova (Tabla 12) indicando que el tratamiento que presenta diferencias estadísticamente significativas en cuanto a un menor contenido de taninos condensados es en el sorgo sin remojo y con el hongo *Rhizopus oryzae*.

Tabla 13. Resultados ANOVA para el contenido de taninos condensados

Fuente	Valor P
Microorganismo	0,000
Tratamiento	0,000
Microorganismo*Tratamiento	0,000

Es evidente que existen diferencias significativas entre los microorganismos y tratamientos estudiados, siendo el *Rhizopus oryzae* en cada uno de los tratamientos, el que presenta mejor comportamiento, debido posiblemente a las habilidades que presentan estos tipo de microorganismos para fermentar diversos tipos de sustratos bajo las condiciones de temperatura y humedad relativa estudiadas. El sustrato crudo puede favorecer el crecimiento miceliar, dado que estos hongos contienen las enzimas apropiadas para la digestión de este tipo de sustratos (Robert Nout & Aidoo, 2010), además la cantidad de agua facilitó su adaptación.

Resultados comparables de velocidad de crecimiento y producción de biomasa se han obtenido en estudios con harina de yuca cruda (Sarria, 1997). Otros estudios aplicando fermentación sólida (Martínez Ávila et al., 2013; Ghosh et al., 2011) han comprobado que los hongos pertenecientes a esta especie son buenos productores de enzima tanasa (17.7U/mL), la cual permite reducir los taninos condensados, evidenciando

el potencial de aplicación que tienen. Estos resultados son importantes, además, desde el punto de vista industrial pues no se requiere el uso de tratamientos como el remojo que son poco eficientes por su alto consumo de agua y tiempo de proceso requerido.

8.2. Comparación del rendimiento de la producción de esporas y la homogeneidad durante la fermentación de diferentes inóculos iniciadores

Para evaluar el mejor tipo de inóculo para la producción constante de esporas, se siguió la metodología descrita en el ítem 7.2 cuantificando las esporas producidas por cada uno. Los resultados se encuentran registrados en la Tabla 14. Se puede observar que todos los inóculos presentan una concentración de esporas del orden de 10^7 . De acuerdo a Raimbault (1996) esta concentración de esporas es ideal para iniciar un proceso de fermentación sólida garantizando que no exista contaminación por parte de otro tipo de microorganismos.

Tabla 14. Concentración de esporas de acuerdo al tipo de inóculo

Tipo de inóculo	Concentración de esporas
Solución de esporas	$7,3 \times 10^7$ /mL
Koji seco molido	$8,4 \times 10^7$ /g
Micelio	$3,3 \times 10^7$ /g

Posterior a la cuantificación inicial de esporas, se llevó a cabo un proceso de fermentación con los diferentes inóculos propuestos. Al cabo del tiempo se realizaron observaciones a nivel macroscópico de la forma de invasión del micelio, los cuales pueden apreciarse en la Figura 11. Es evidente que cuando se inocula con koji – molido, existe un crecimiento más abundante y homogéneo en el sustrato.

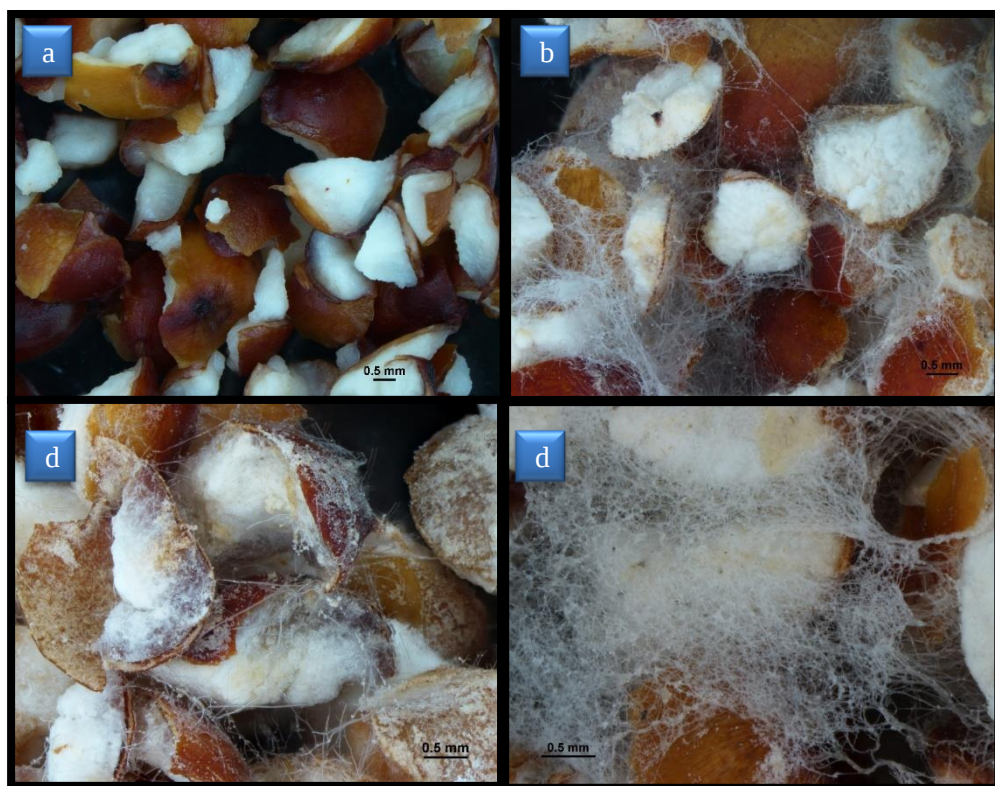


Figura 11. Muestras de sorgo (a) sin inóculo (b) inoculadas con esporas (c) inoculadas con micelios (d) inoculadas con koji

Después de la fermentación, se cuantificó el contenido de azúcares totales y reductores en diferentes puntos del sustrato, con el objeto de validar la homogeneidad en el consumo de nutrientes por parte del microorganismo al ser inoculado de diferentes formas. Los resultados promedios, junto con la desviación estándar se encuentran registrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Contenido promedio de azúcares totales y reductores después de fermentación variando el tipo de inóculo

TIPO DE INÓCULO	AZÚCARES TOTALES	AZÚCARES
	(g/g)	REDUCTORES (g/g)
Esporas	19,52 ± 1,13	5,60 ± 1,27
Micelio	13,85 ± 1,80	4,63 ± 2,31
Koji (Granos molidos)	27,85 ± 0,95	6,21 ± 1,10

Los resultados en la prueba ANOVA para los azúcares totales (Tabla 16) y azúcares reductores (Tabla 17) indican que no existen diferencias significativas entre los tipos de inóculos utilizados sobre concentración

final del sustrato en la muestra. Sin embargo, al inocular con tane – koji seco molido se presentó la menor desviación estándar (0,95), relacionándose con una mayor homogeneidad en la muestra.

Tabla 16. Resultados ANOVA para azúcares totales

Fuente	Valor P
Tipo de Inóculo	0,822

Tabla 17. Resultados ANOVA para azúcares reductores

Fuente	Valor P
Tipo de Inóculo	0,254

Durante el proceso de fermentación, uno de los parámetros que tiene mayor influencia sobre la homogeneidad y la eficiencia en el consumo de sustrato es el tipo y la forma del inóculo iniciador. Las formas de inóculo comúnmente utilizadas son los micelios y la solución de esporas, mientras que uno de los métodos poco conocidos es el método tane-koji. El tane-koji seco molido, mostró ser un inóculo iniciador eficaz, fácilmente aplicable, garantizando un proceso homogéneo, con buenas características al final del proceso, mostrándose con potencial para uso en procesos de fermentación sólida controlados, además de ser un producto útil durante un periodo de tiempo superior a un mes. Por tal motivo para evaluar los parámetros de fermentación se utilizó este como inóculo iniciador.

8.3. Establecimiento de los parámetros de fermentación de acuerdo al microorganismo seleccionado

8.3.1. Proceso de fermentación y selección de parámetros

Siguiendo la metodología propuesta en el numeral 7.3, se realizó el montaje para evaluar los parámetros adecuados del proceso de fermentación (

Figura 12).



Figura 12. Aspecto de la columna (a) antes de crecimiento (b) después de crecimiento

Los resultados, según el tratamiento, para cada una de las variables estudiadas durante el proceso de fermentación sólida (pH, azúcares, proteínas, taninos condensados) se encuentran registrados en la Tabla 18. Para el pH, el menor valor registrado (4.36) está en el tratamiento a una temperatura de 31 °C, velocidad de aire 80 mm³/min, 1,0 mm de tamaño de partícula y 0% de salvado de trigo. Para los azúcares totales el mayor valor (75,09 g/g) se encuentra a temperatura de 32,5 °C, velocidad de aire 70 mm³/min, 0,6 mm de tamaño de partícula y 1% de salvado de trigo. Para los azúcares reductores el mayor valor (87,8 g/g) está a temperatura de 31 °C, velocidad de aire 80 mm³/min, 0,3 mm de tamaño de partícula y 3% de salvado de trigo, para las proteínas el mayor valor (38,54 g/g) está en temperatura de 32,5 °C, velocidad de aire 70 mm³/min, 0,6 mm de tamaño de partícula y 1% de salvado de trigo y para los taninos el menor valor (0,02%) está a una temperatura de 32,5 °C, velocidad de aire 70 mm³/min, 0,6 mm de tamaño de partícula y 1% de salvado de trigo.

Tabla 18. Resultados para cada uno de los parámetros evaluados (pH, Azúcares Totales, Azúcares reductores, Proteína y Contenido de Taninos) después del proceso de fermentación sólida en sorgo

Ensayo	Temperatura (°C)	Velocidad de aire (mm ³ /min)	Concentración de salvado (X)	Tamaño de partícula (mm)	pH	Azúcares Totales (g/g)	Azúcares Reductores (g/g)	Proteína (g/g)	Taninos Condesados (%)
5	28,0	80	0,03	1,0	5,00	40,159	17,879	24,607	1,817
1	29,5	70	0,01	1,3	4,50	45,750	9,550	7,821	0,350
12	29,5	70	0,01	0,6	4,53	54,412	37,925	32,821	0,861
21	29,5	70	0,04	0,6	4,66	61,434	49,482	32,464	2,906
29	29,5	70	0,04	1,3	4,63	46,191	25,300	27,929	1,680
14	29,5	90	0,01	0,6	4,61	58,471	22,425	29,786	1,906
19	29,5	90	0,01	1,3	4,72	50,162	4,425	19,607	0,071
8	29,5	90	0,04	0,6	4,67	60,125	35,425	21,214	1,295
18	29,5	90	0,04	1,3	4,63	43,912	10,550	25,857	0,605
24	31,0	60	0,03	1,0	4,42	63,691	24,925	26,214	0,700
30	31,0	80	0,00	1,0	4,36	62,846	14,675	24,179	0,517
2	31,0	80	0,03	1,0	4,44	63,853	40,925	32,434	2,240
3	31,0	80	0,03	1,0	4,42	65,088	37,300	26,214	0,017
9	31,0	80	0,03	1,0	4,48	63,140	39,550	31,750	1,278
10	31,0	80	0,03	1,0	4,46	63,316	30,482	29,429	0,417
15	31,0	80	0,03	1,0	4,39	62,919	32,425	29,250	0,017
17	31,0	80	0,03	0,3	4,42	66,426	87,800	30,143	0,340
22	31,0	80	0,03	1,0	4,46	63,250	35,175	26,929	1,200
25	31,0	80	0,03	1,0	4,46	63,081	42,050	24,679	1,250
31	31,0	80	0,03	1,6	4,48	39,844	36,325	24,429	0,317
28	31,0	80	0,05	1,0	4,46	66,265	43,300	30,679	1,007
26	31,0	100	0,03	1,0	4,50	66,926	20,050	28,175	0,343
16	32,5	70	0,01	0,6	4,40	63,176	55,425	38,536	0,628
23	32,5	70	0,01	1,3	4,40	50,382	31,325	17,464	2,128
13	32,5	70	0,04	0,6	4,58	75,088	62,050	33,893	0,572
27	32,5	70	0,04	1,3	4,45	55,713	41,425	35,500	2,772
7	32,5	90	0,01	0,6	4,46	70,015	53,175	38,536	0,850
11	32,5	90	0,01	1,3	4,60	57,191	35,425	28,893	0,017
4	32,5	90	0,04	1,3	4,59	52,654	51,800	30,500	0,128
6	32,5	90	0,04	0,6	4,59	73,581	74,300	21,750	0,017
20	34,0	80	0,03	1,0	4,80	57,912	56,925	34,250	0,639

Para obtener los modelos adecuados que permitan encontrar la mejor relación entre las variables temperatura, tamaño de partícula, velocidad de aire y salvado de trigo que predigan efectivamente el pH,

los azúcares, totales y reductores, las proteínas y los taninos como variables respuesta, se aplicó un diseño de superficie de respuesta, según lo descrito en el ítem 7.3.2, con los datos obtenidos en la Tabla 18.

El diseño de superficie de respuesta aplicado fue el central compuesto, el cual consta de 16 puntos correspondientes a las combinaciones de los tratamientos del diseño 2⁴, 7 puntos centrales constituidos por un tratamiento conformado por el punto medio ente el nivel alto y bajo de cada variable del proceso, logrando la estimación del error experimental y 8 puntos axiales que permiten la incorporación de los términos cuadráticos en el modelo cuando la relación entre la variable respuesta y los factores de estudio lo requieran. Se calculó el valor p para cada tipo de modelo, seleccionando el de mayor orden con términos significativos ($p < 0,05$). Para determinar la calidad del modelo se encontró el coeficiente de correlación R^2 y se realizó la prueba de falta de ajuste para verificar las fallas del modelo. Los resultados del análisis de varianza ANOVA para cada una de las variables respuesta se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. ANOVA del modelo de superficie de respuesta para optimización del proceso de fermentación sólida.

Valor P					
<i>Fuente</i>	<i>pH</i>	<i>Azúcares Totales</i>	<i>Azúcares Reductores</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Taninos</i>
Regresión	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Lineal	0,000	0,000	0,062	0,006	0,000
Temperatura	0,000	0,000	0,347	0,858	0,000
Velocidad de aire	0,335	0,077	0,102	0,683	0,000
Salvado de Trigo	0,350	0,927	0,965	0,013	0,000
Tamaño de Partícula	0,418	0,000	0,010	0,002	0,000
Cuadrática	0,000	0,000	0,000	0,742	0,000
Temperatura*Temperatura	0,000	0,000	0,898	0,729	0,000
Velocidad de aire*Vel. aire	0,404	0,066	0,000	0,397	0,000
Salvado de Trigo*Salvado de Trigo	0,275	0,297	0,019	0,469	0,000
Tamaño de Partícula*Tamaño de Partícula	0,652	0,000	0,000	0,424	0,901
Interacción	0,006	0,000	0,017	0,000	0,000
Temperatura*Vel.aire	0,468	0,087	0,000	0,908	0,000
Temperatura*Salvado de Trigo	0,386	0,009	0,642	0,067	0,000
Temperatura*Tamaño de Partícula	1,000	0,009	0,534	0,152	0,000
Vel.aire*Salvado de Trigo	0,009	0,000	0,455	0,000	0,000

Vel.aire*Tamaño de Partícula	0,009	0,632	0,402	0,000	0,499
Salvado de Trigo*Tamaño de Partícula	0,009	0,000	0,813	0,000	0,649
Error residual					
Falta de ajuste	0,371	0,287	0,626	0,804	0,534
R-cuadrado (%)	96,07	99,34	97,05	87,91	98,33

Para el caso del pH, los resultados muestran que tanto el modelo lineal como el cuadrático presentan un efecto significativo $p < 0,05$ sobre la variable respuesta, sin embargo, puede observarse que solo el término lineal de la temperatura y su cuadrado son los que realmente presentan este efecto. En cuanto a las interacciones, solo tres (velocidad de aire – salvado de trigo, velocidad de aire – tamaño de partícula, salvado de trigo – tamaño de partícula) de las seis ejercen un efecto significativo, siendo incluidas estas en el modelo. Por tanto para la predicción adecuada del pH como variable respuesta se tuvieron en cuenta todos los términos lineales, el término cuadrático de la temperatura y las interacciones que presentaron efecto significativo. Esto se confirmó con el valor de R^2 de 0,9607, indicando que los términos seleccionados explican el 96.07% de la variabilidad de la respuesta, mientras que alrededor del 4% sigue siendo inexplicable. La falta de ajuste presentó un $p > 0,05$, indicando que dicho modelo no presenta fallas significativas y es adecuado para representar la variable pH.

Se puede observar en la tabla ANOVA para los azúcares totales que los modelos lineal y cuadráticos tienen un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la variable en mención, así como las interacciones entre la temperatura – salvado de trigo, temperatura – tamaño de partícula, velocidad de aire – salvado de trigo y salvado de trigo – tamaño de partícula. Para obtener el modelo se retiraron los coeficientes que no ejercían un efecto significativo, sin embargo se mantuvieron todos los términos lineales, puesto que era necesario para mantener la calidad del mismo. El valor obtenido de R^2 fue de 0,9934, indicando que los términos seleccionados explican el 99.34% de la variabilidad de la respuesta, mientras que alrededor del 1% sigue siendo inexplicable. La falta de ajuste presentó un $p > 0,05$, indicando que dicho modelo no presenta fallas significativas y es adecuado para representar la variable azúcares totales.

Para los azúcares reductores, el análisis de varianza arrojó que solo el término lineal de tamaño de partícula, los términos cuadráticos de velocidad de aire y tamaño de partícula, y la interacción entre la temperatura y la velocidad de aire tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta. Sin embargo, al retirar los otros términos del modelo, este presentaba fallas, por lo cual se tuvieron en cuenta todos los términos

lineales de los factores estudiados. Teniendo en cuenta esto, el modelo que representó a los azúcares reductores presentó un R^2 de 0,9705, considerándose un buen ajuste y por tanto puede representar la variable estudiada efectivamente.

Como se observa en la Tabla 18, todos los ensayos mostraron contenidos altos de proteína soluble, los cuales a medida que incrementa la temperatura de incubación muestran una ligera tendencia a la baja. Sin embargo el análisis de varianza indicó que ni la temperatura, ni la velocidad de aire ejercen influencia significativa ($p > 0,05$) sobre la proteína soluble. Se encontró que los términos que ejercen un efecto significativo sobre la variable respuesta son los lineales de salvado de trigo y tamaño de partícula, y las interacciones entre velocidad de aire– salvado de trigo, velocidad de aire – tamaño de partícula y salvado de trigo – tamaño de partícula. Igualmente en este caso, y para garantizar la calidad del modelo, se tuvieron en cuenta todos los términos lineales de las variables estudiadas. El valor registrado de R^2 fue de 0,8791, lo que garantiza los términos seleccionados la variabilidad de la respuesta, mientras que la falta de ajuste ($p > 0,05$) indicó que el modelo no presentaba fallas.

Finalmente, se encontró para los taninos que la mayoría de los términos ejercen un efecto significativo sobre la variable respuesta dado que $p < 0,05$. Los únicos términos excluidos del modelo fueron el cuadrado del tamaño de partícula y las interacciones entre velocidad de aire – tamaño de partícula y salvado de trigo – tamaño de partícula, puesto que no ejercieron efecto significativo y no afectaban la precisión del modelo. Esto se corroboró con los valores de R^2 el cual fue de 0,9833 y la falta de ajuste que fue 0,534.

Con los resultados de la tabla ANOVA se plantearon los modelos para cada una de las variables respuesta estudiadas, teniendo en cuenta los coeficientes de los componentes temperatura ($^{\circ}T$), velocidad de aire (VA), salvado de trigo (ST) y tamaño de partícula (TP). Las ecuaciones obtenidas se registraron en la Tabla 20.

Tabla 20. Modelos planteados para las variables pH, azúcares totales, azúcares reductores, proteínas y taninos

<i>Variable</i>	<i>Modelo</i>	<i>Ecuación Nro.</i>
<i>pH</i>	$y = 54,4428 - 3,2123 (^{\circ} T) + 0,0014 (VA) + 24,7385 (ST) - 0,4359 (TP) + 0,0512 (^{\circ} T^2) - 0,2000 (VA)(ST) + 0,0077 (VA)(TP) - 6,4615 (ST)(TP)$	12

<i>Azúcares Totales</i>	$y = -1728,82 + 108,10 (^{\circ} T) + 0,46(VA) + 338,67 (ST) + 108,69 (TP) - 1,68 (^{\circ} T^2) - 26,01 (TP^2) + 44,68 (^{\circ}T)(ST) - 2,24 (^{\circ}T)(TP) - 15,14 (VA)(ST)$	13
<i>Azúcares Reductores</i>	$y = 398,1 - 16,6 (^{\circ} T) - 3,9 (VA) + 1170,8 (ST) - 148,8 (TP) - 12888,6 (ST^2) + 59,2 (TP^2) + 0,3 (^{\circ}T)(VA)$	14
<i>Proteínas</i>	$y = 17,71 + 1,86 (^{\circ} T) - 0,17 (VA) + 1005,26 (ST) - 103,43 (TP) - 27,32 (VA)(ST) + 0,82 (VA)(TP) + 1174,75 (ST)(TP)$	15
<i>Taninos</i>	$y = 17,0772 - 0,6401(^{\circ} T) - 0,1266(VA) - 99,9499 (ST) - 1,3706 (TP) + 0,0066 (^{\circ}T^2) + 0,0005 (VA^2) - 77,5170 (ST^2) + 0,0014 (^{\circ}T)(VA) + 2,4674 (^{\circ}T)(ST) + 0,0451 (^{\circ}T)(TP) + 0,3446 (VA)(ST)$	16

En la ecuación 12 se observa que la temperatura, el tamaño de partícula y las interacciones velocidad de aire-salvado de trigo, salvado de trigo-tamaño de partícula, ejercen efecto negativo sobre la variable respuesta, siendo esta una situación deseable dado que entre mayor sea la disminución del pH, existe menor riesgo por contaminación microbiológica. Esta ecuación permite observar el efecto que tiene cada componente independientemente de su nivel, por lo cual valores intermedios de temperatura pueden favorecer un descenso en el pH, caso contrario a lo que puede ocurrir con el salvado de trigo. Lo anterior debe considerarse en el momento de la optimización para encontrar las mejores combinaciones que permiten obtener rangos adecuados de esta variable.

Para el caso de los azúcares totales, representados en la ecuación 13, se observa que los términos cuadráticos y las interacciones, a excepción de la interacción temperatura-salvado de trigo, ejercen efecto negativo sobre los azúcares, mientras que los factores lineales ejercen efecto positivo. Lo anterior indica que para favorecer esta variable es necesario por tanto que los factores estudiados se encuentren en valores intermedios a los planteados para la optimización.

En la ecuación 14 se observa el modelo, con sus respectivos coeficientes, para la variable azúcares reductores. Se puede notar que la temperatura, la velocidad de aire y el tamaño de partícula ejercen un efecto negativo sobre la variable, por tanto valores altos de estas puede conllevar a una disminución en su concentración.

Para las proteínas, representadas en la ecuación 15, la velocidad de aire, el tamaño de partícula y la interacción velocidad de aire-salvado de trigo, son los componentes que ejercen un efecto negativo sobre

la variable, disminuyendo su valor a medida que estas se incrementan; por tanto el diseño debe orientarse a seleccionar valores intermedios o bajos de estos factores. La concentración de salvado de trigo, es el componente que ejerce un mayor efecto positivo sobre esta variable, dado que este puede ser una buena fuente de minerales que el microorganismo utiliza para su crecimiento, permitiendo llevar a cabo las funciones metabólicas necesarias para la producción e hidrólisis de otros compuestos.

El modelo obtenido para los taninos, se encuentra representado en la ecuación 16. En este caso, las variables que ejercen un efecto negativo son la temperatura, la velocidad de aire, el tamaño de partícula, el salvado de trigo y el cuadrado del salvado de trigo. Durante el presente estudio se requieren buscar combinaciones que permitan obtener valores bajos de los taninos, por tanto es adecuado que las variables que ejercen efectos negativos tengan valores elevados.

Posterior al análisis de varianza, se requiere la validación de los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia de los errores. Su comprobación se hace necesaria para sustentar la validez del análisis. La verificación de los supuestos subyacentes se realiza en la práctica a través de los predictores de los términos de error aleatorio que son los residuos aleatorios asociados a cada observación (Plaza, 2014).

La validación de los modelos establecidos se presenta en las figuras 11 a 15. En la parte superior izquierda de cada una de las figuras se presenta el gráfico de probabilidad normal utilizado para comprobar el supuesto de comportamiento normal de los residuos. Es posible observar que para cada uno de los modelos los residuales se distribuyen alrededor de una línea recta, comprobando así este supuesto. En los gráficos presentados en la parte superior e inferior derecha, de cada una de las figuras, no se observa una tendencia en la distribución de los datos, confirmando así que existe aleatoriedad en los residuales, indicando homogeneidad en la varianza.

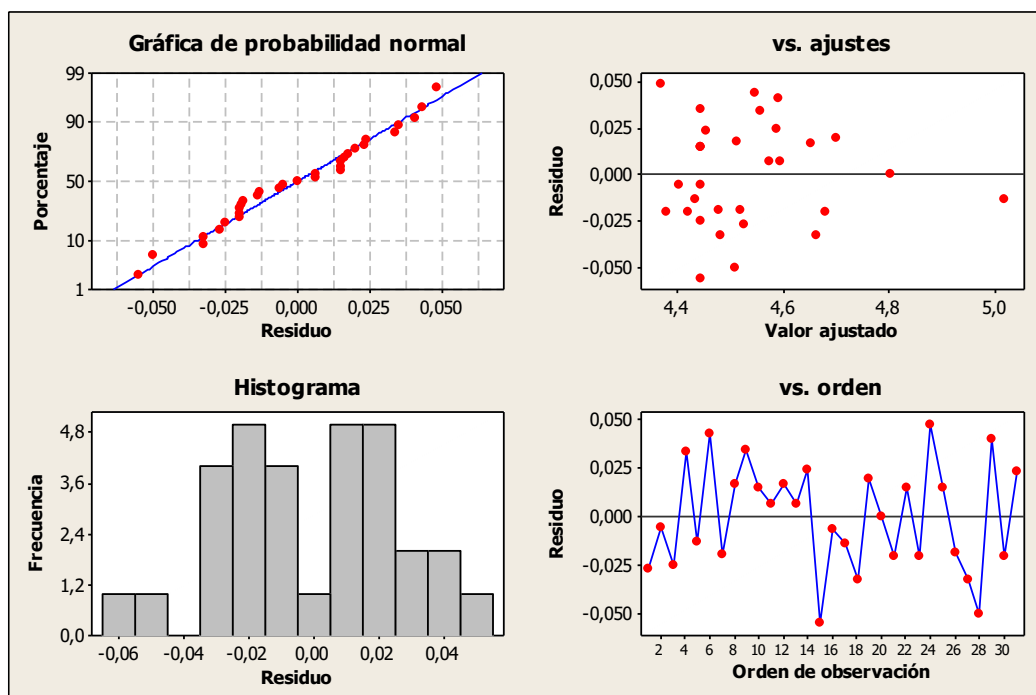


Figura 13. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para el pH: a) Gráfica de probabilidad normal Vs Residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden

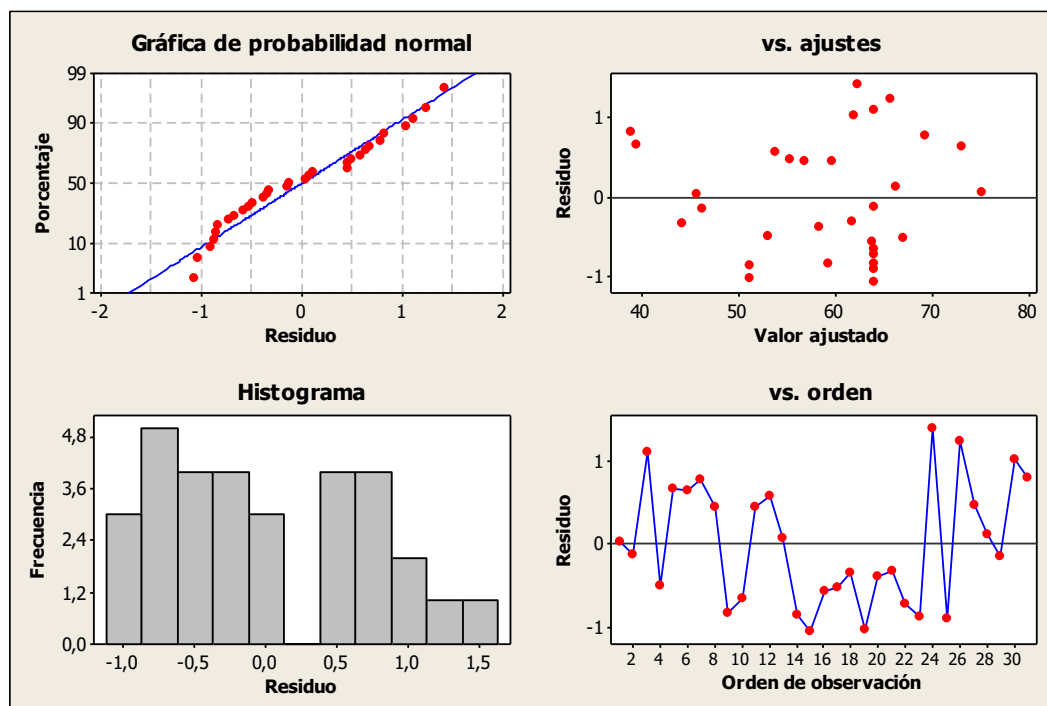


Figura 14. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los azúcares totales: a) Gráfica de probabilidad normal Vs Residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden

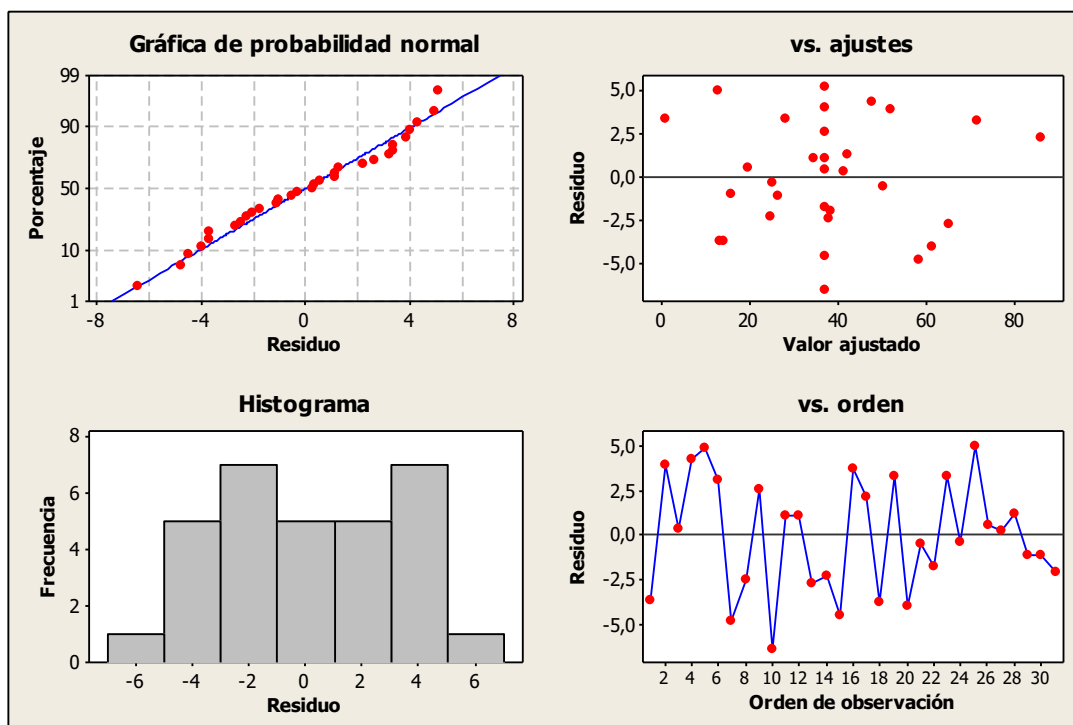


Figura 15. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los azúcares reductores: a) Gráfica de probabilidad normal Vs Residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden

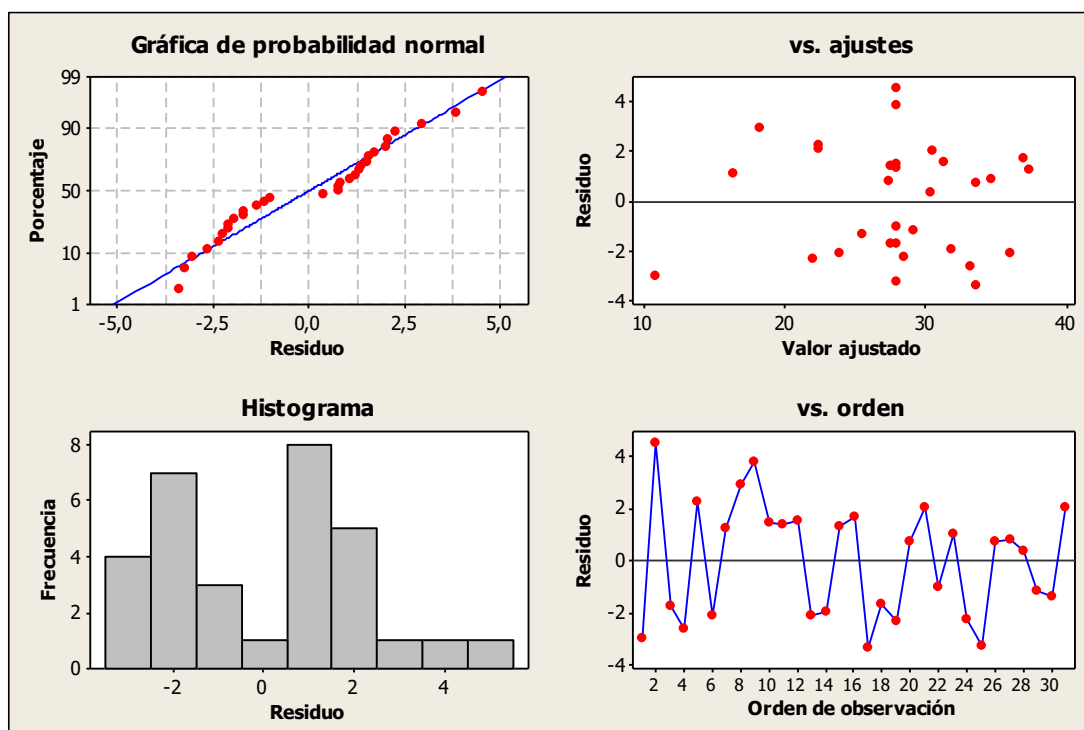


Figura 16. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para las proteínas: a) Gráfica de probabilidad normal Vs Residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden

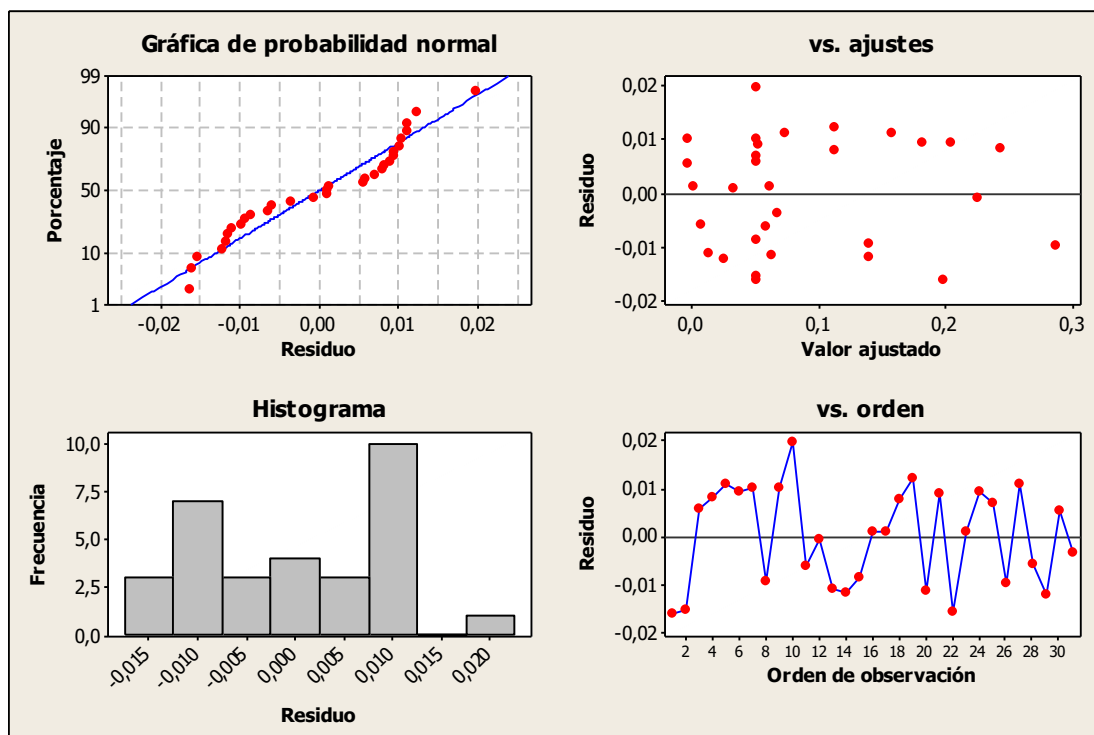


Figura 17. Análisis de residuales del modelo de superficie de respuesta para los taninos: a) Gráfica de probabilidad normal Vs Residuos b) Residuos vs ajustes c) Histograma d) Residuos Vs. Orden

Para observar adecuadamente el comportamiento de cada una de las variables estudiadas, fueron realizados gráficos de contorno (Figura 18 a Figura 22). En dichos gráficos es posible observar las regiones en las que se presentan los valores más bajos o más altos de cada una de las variables, a través de una variación en las tonalidades, lo que permite identificar la región de interés y predecir en que niveles deben estar los factores (temperatura, tamaño de partícula, salvado de trigo y velocidad de aire) para encontrar los valores deseados de respuesta.

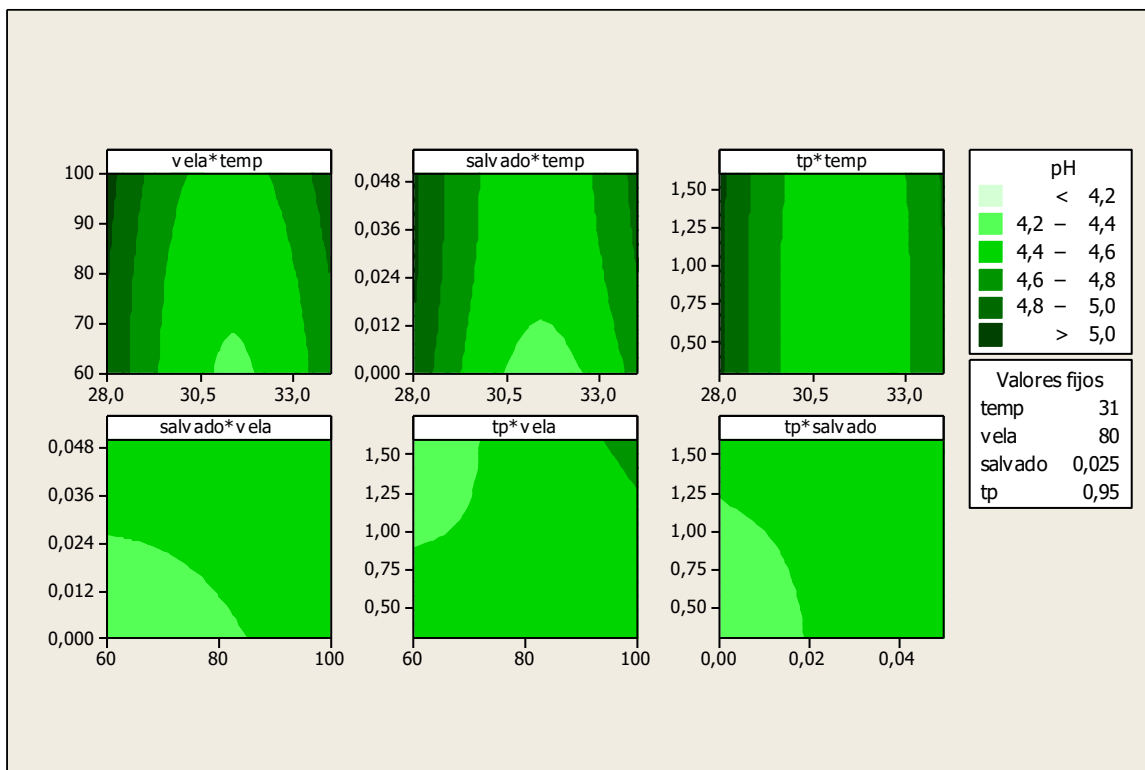


Figura 18. Gráfico de contorno para el comportamiento del pH

En la Figura 18, se muestra la gráfica de contorno para el comportamiento del pH bajo las diferentes combinaciones de los factores estudiados. El color verde claro representa la zona donde después del proceso de fermentación se presentan los menores valores de pH, el color verde oscuro presenta la zona donde se dan los valores mayores. Es posible notar que las zonas donde se obtienen valores más bajos de pH es en la interacción velocidad de aire-temperatura, salvado de trigo – temperatura y tamaño de partícula – temperatura.

En general se presenta una reducción de pH cuando hay mayor crecimiento microbiano ocasionado por un incremento en la temperatura. Sin embargo se puede observar que en general todas las muestras presentaron valores bajos de pH para los tratamientos realizados, obteniéndose valores por debajo de 5.0. En condiciones aerobias, algunos de los principales metabolitos del *Rhizopus oryzae* son el ácido fumárico, y el ácido láctico, los cuales hacen que el pH del medio donde se encuentre en crecimiento descienda (Ghosh & Ray, 2011); (Ruíz Badillo, 2013). Estudios realizados por Correia *et al.*, (2005) efectuados en harinas de sorgo con otro tipo de microorganismos han encontrado que el pH desciende atribuyendo este comportamiento a la síntesis de ácidos, como el fumárico, el cítrico y el láctico, realizada por estos.

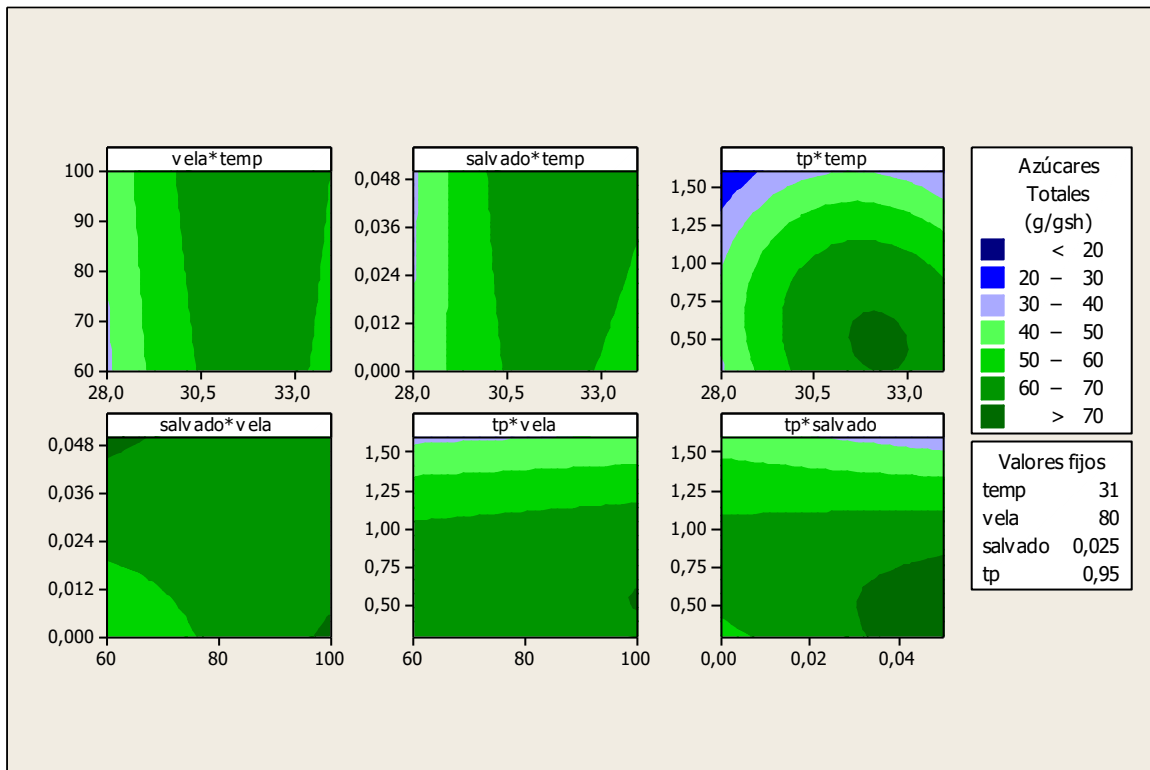


Figura 19. Gráfico de contorno para el comportamiento de los azúcares totales

En la Figura 19, se muestra la gráfica de contorno para el comportamiento de los azúcares totales bajo las diferentes combinaciones de los factores estudiados. El color azul oscuro representa la zona donde se presentan los menores valores de azúcares, mientras el color verde oscuro presenta la zona donde se dan los valores mayores, la cual corresponde a la interacción tamaño de partícula – temperatura, salvado de trigo – velocidad de aire y tamaño de partícula – salvado de trigo.

El aumento en el contenido de azúcares totales en todos los tratamientos se explica por el crecimiento microbiano en el sustrato. El hongo, posterior al consumo de los azúcares simples, inicia una hidrólisis de las cadenas de almidón, por acción de las enzimas tales como la α -amilasa, para realizar sus funciones metabólicas. Dicha hidrólisis ocasiona que las grandes cadenas de almidón se fraccionen en varias unidades, lo cual se refleja en un aumento de los azúcares (Raimbault M. , 1996).

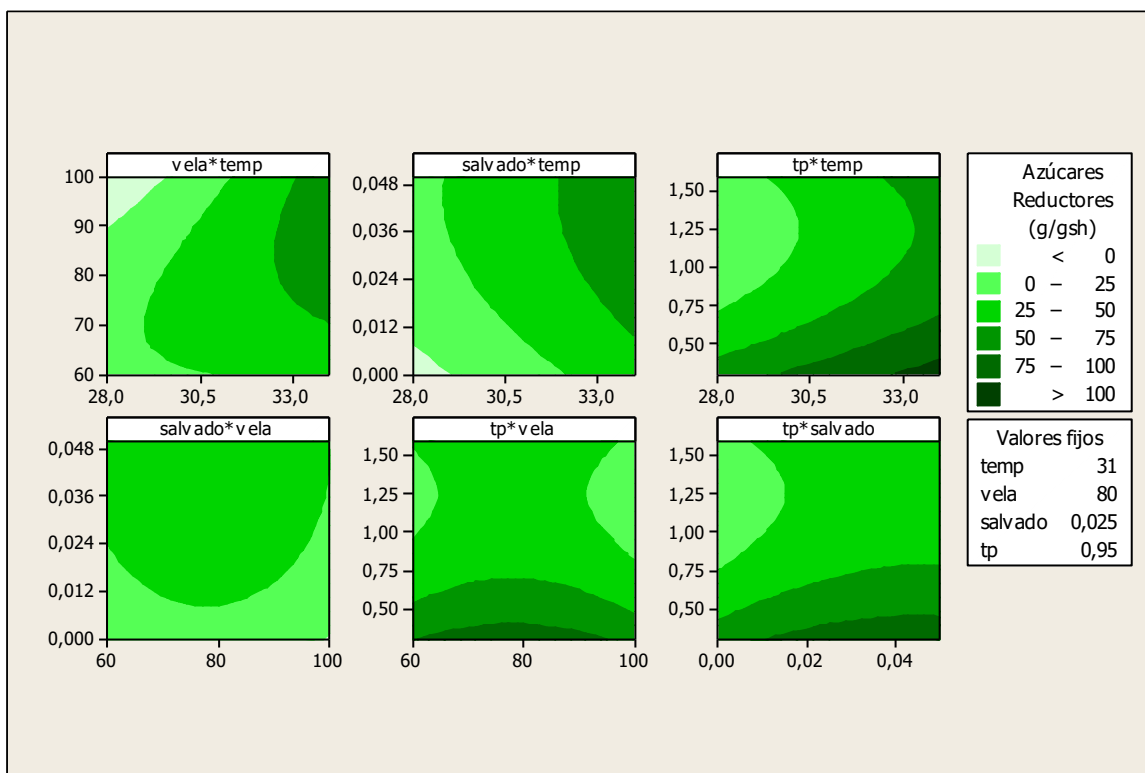


Figura 20. Gráfico de contorno para el comportamiento de los azúcares reductores

En la Figura 20, se muestra la gráfica de contorno para el comportamiento de los azúcares reductores bajo las diferentes combinaciones de los factores estudiados. El color verde claro representa la zona donde se presentan los menores valores de azúcares reductores mientras el color verde oscuro presenta la zona donde se dan los valores mayores. Es posible observar que las zonas donde se obtienen valores más altos de azúcares reductores son en la interacción tamaño de partícula – temperatura, tamaño de partícula – velocidad de aire y tamaño de partícula – salvado de trigo. En general a menores tamaños de partícula hay una mayor concentración de azúcares reductores, esto debido a que un menor tamaño hace más susceptible los compuestos al ataque microbiano hidrolizando las moléculas grandes generando una gran cantidad de azúcares reductores.

Al igual que el comportamiento registrado para los azúcares totales, la hidrólisis de almidón durante el crecimiento del hongo en el sustrato, hace que se liberen cadenas de glucosa, principal azúcar reductor, lo que se traduce en un aumento de este tipo de azúcares para todos los tratamientos realizados.

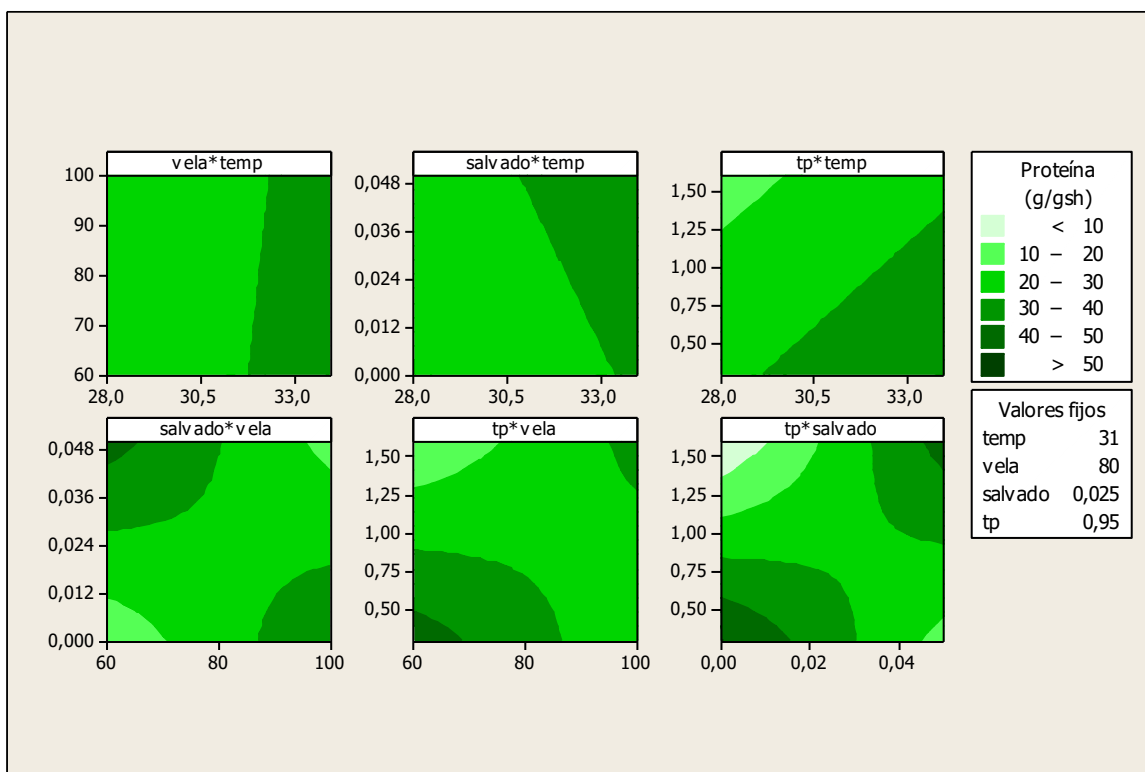


Figura 21. Gráfico de contorno para el comportamiento de las proteínas

En la Figura 21, se muestra la gráfica de contorno para el comportamiento de las proteínas bajo las diferentes combinaciones de los factores estudiados. El color verde claro representa la zona donde se presentan los menores valores de proteínas mientras que el color verde oscuro presenta la región donde hay mayor concentración. Es posible notar que las zonas donde se obtienen valores más altos de proteínas son en la interacción salvado de trigo – velocidad de aire, velocidad de aire-tamaño de partícula y tamaño de partícula-salvado de trigo. Puede observarse que en casi todas las interacciones se encuentra involucrado el salvado de trigo, y de acuerdo al análisis de varianza realizado anteriormente, una mayor cantidad de este compuesto tiene efecto positivo sobre la variable respuesta. Esto puede ocurrir porque el salvado es una fuente rápida de minerales para los microorganismos durante la fermentación utilizándolos para llevar a cabo los procesos metabólicos sintetizando biomasa fúngica, la cual es buena fuente de proteína incrementando su concentración (Perez Quilatan, 1996).

El sorgo contiene aproximadamente un 10% de su peso en proteínas, en donde las prolaminas (kafirinas) son las principales proteínas de almacenamiento. Estas proteínas están localizadas junto con el almidón en el endospermo y constituyen aproximadamente el 70% de la proteína total (Kuo *et al.*, 2013). Casi todas las prolaminas del sorgo se encuentran enlazadas a compuestos fenólicos como los taninos, formando

complejos tanino-proteínas (Montiel *et al.*, 2012). La alta afinidad de los taninos por este tipo de proteínas se fundamenta en que la molécula de tanino presenta un gran número de grupos fenólicos que proporcionan numerosos puntos para la formación de enlaces con los grupos carbonilo de los péptidos. La reactividad y afinidad de estas uniones viene determinada tanto por el tipo, concentración, estructura y peso molecular del tanino, como por el grado de polimerización, conformación y peso molecular de la proteína, por tanto proteínas con una alta proporción del aminoácido prolina, y una estructura tridimensional abierta y flexible, muestran mayor afinidad por los taninos (Nogueira, 2011). Estudios *in vitro* han mostrado que además de los complejos tanino-proteína, los complejos fitatos-proteína, presentes también en el sorgo, están formados por interacciones electrostáticas que involucran uniones con los grupos terminales N-amino, los grupos ϵ -amino de la lisina, el grupo imidazol de la histidina y los grupos guanidilo de la arginina (Taylor *et al.*, 2002). La mayoría de estos complejos son insolubles, haciendo que la digestibilidad del sorgo y la concentración de proteína soluble sea bastante baja en sorgo sin ningún tipo de tratamiento (Kuo *et al.*, 2013; Duodu *et al.*, 2003).

Durante el presente estudio, independientemente del tratamiento realizado se obtuvieron mayores valores de proteína soluble comparados con el sorgo sin tratamiento (23,18 g/g). Esto debido a que durante el proceso de fermentación, por la acción de enzimas tanasas y fitasas, presentes en el hongo utilizado, *Rhizopus oryzae*, los complejos tanino-proteína y fitasas proteínas, son hidrolizados promoviendo la liberación de la proteína que se encuentra enlazada, incrementando de esta manera el contenido de proteína soluble. Taylor y Taylor (2002) propusieron que durante la fermentación las proteínas (prolamina y glutelina), sufren cambios estructurales, que hacen que este tipo de proteínas sean más susceptibles al ataque enzimático de la pepsina, incrementando por tanto la digestibilidad del sorgo. Resultados similares a los del presente estudio encontraron Abdelseed *et al.*, 2011, Kuo *et al.*, Elkhalfa, *et al.* 2006 en ensayos realizados con sorgo, y Nnam *et al.*, 2011 en otro tipo de granos. En todos los casos las fermentaciones se llevaron a cabo con otro tipo de microorganismos.

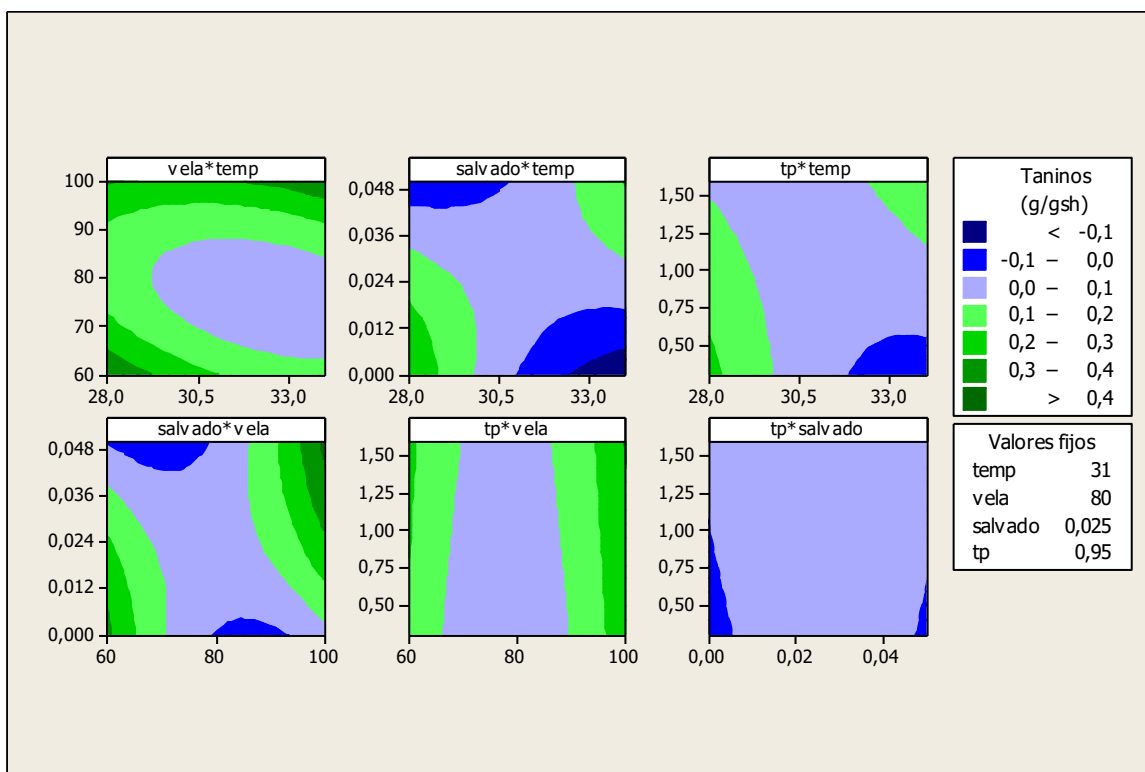


Figura 22. Gráfico de contorno para el comportamiento de los taninos

En la Figura 22, se muestra la gráfica de contorno para el comportamiento los taninos bajo las diferentes combinaciones de los factores estudiados. El color azul oscuro representa la zona donde se presentan los menores valores de taninos, mientras que el color verde oscuro presenta la zona donde se dan los valores mayores. Es posible notar que la zona donde se obtiene un menor valor de contenido de taninos es en la interacción salvado de trigo – temperatura, temperatura – tamaño de partícula y salvado de trigo – velocidad de aire.

Las enzimas tanino-acil hidrolasas, conocidas comúnmente como tanasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los galotaninos, elagitaninos, complejos taninos y ésteres de ácido gálico (Colombo *et al.*, 2008). Las tanasas son producidas por diversos microorganismos, como estrategia para invadir sustratos vegetales, algunos microorganismos como el *Rhizopus oryzae* son productores de esta enzima (Ghosh & Ray, 2011);(Chávez-González *et al.*, 2012). Por lo anterior, en todos los tratamientos donde hubo crecimiento del hongo se presentó reducción considerable de este tipo de compuestos. Osman, 2004 y Kuo *et al.*, 2013, realizando fermentaciones tradicionales con harina de sorgo, encontraron reducciones considerables en el contenido de taninos y otros compuestos fenólicos después del proceso, atribuyendo este comportamiento a la acción de enzimas como las fitasas.

Para optimizar el proceso se aplicó la función de deseabilidad (d), la cual está representada en gráficas. El valor d equivale al grado de deseabilidad de la respuesta, valores cercanos a 1 indican que la respuesta es deseable (Plaza, 2014). Para aplicar esta función se buscó obtener los mayores valores de azúcares y proteínas y los menores valores de taninos y pH. En la Figura 23, se observa la gráfica del compuesto de deseabilidad. La respuesta encontrada tiene un valor alto de deseabilidad ($d=0,97$), por tanto el proceso alcanza una respuesta óptima global. Los factores adecuados para el proceso, según lo encontrado en la función son temperatura 32,97 °C, velocidad de aire 84,11 mm³/min, salvado de trigo 1,16% y tamaño de partícula 0,82 mm.

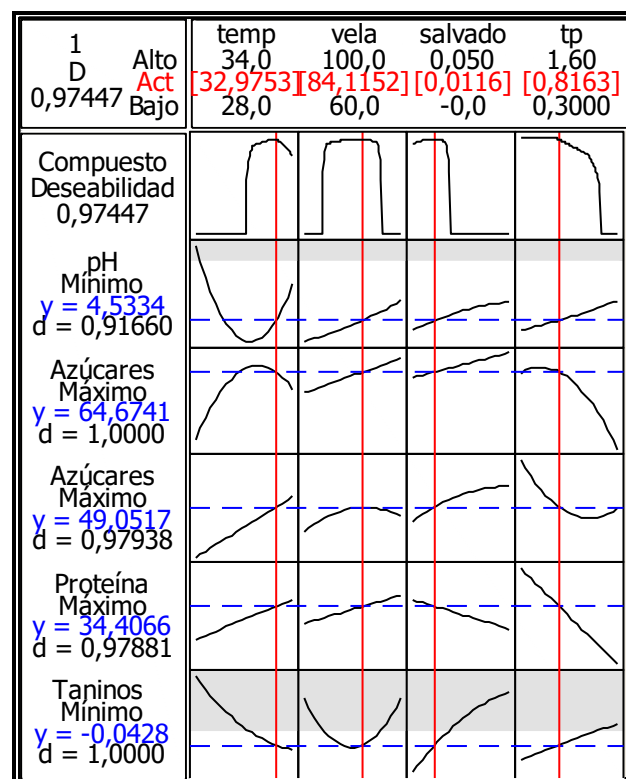


Figura 23. Gráfica de optimización para el proceso de fermentación sólida, según los factores estudiados

La temperatura es un parámetro vital no solo para el crecimiento, germinación y esporulación del hongo, sino también para su metabolismo, por lo cual temperaturas extremas pueden dificultar su desarrollo. La temperatura de crecimiento varía entre las especies y el sustrato en el cual se encuentran creciendo, resultando para este estudio en particular una temperatura de 32,97 °C, intermedia a las estudiadas.

La cantidad de oxígeno que debe colocarse a disposición del micelio es otro factor importante para su desarrollo. Esta cantidad debe ser suficiente para no limitar su crecimiento, y depende de la velocidad de flujo de aire, la masa de producto, la transferencia de oxígeno en el centro y la velocidad de consumo de O₂ por el micelio (Raimbault *et al.*, 1998). Por lo anterior la aireación es fundamental para el crecimiento y la producción de metabolitos. La transferencia de oxígeno también está relacionada con el tamaño de partícula, por lo que medios porosos permiten el intercambio eficiente de gases con los del medio y mantienen además la humedad. Los resultados muestran que la velocidad de flujo de aire óptima para el crecimiento del *Rhizopus oryzae* sobre el sorgo es 84,11 mm³/min, mientras que partículas de 0,82 mm favorecen su desarrollo. Este tamaño de partículas permite que el hongo tenga mayor superficie de contacto, pueda difundir los nutrientes, invadir el medio y lograr una mayor degradación del sustrato por las enzimas extracelulares. Estudios realizados por Mitchell *et al.*, 2006 en fermentaciones en columnas empacadas indican que la velocidad de flujo recomendada está entre 85 y 120 mm³/min.

El salvado de trigo representa el 15% del exterior de la semilla y está compuesto principalmente de carbohidratos no almidón (58%), almidón (19%) y proteína cruda (18%); entre los polisacáridos no almidón se encuentran los arabinoxilanos (70%), la celulosa (24%) y el β - (1,3) (1,4) glucano (6%) (Xianyun *et al.*, 2008). Algunas investigaciones (Palmarola-Adrados *et al.*, 2005) han mostrado que la variación en la concentración de salvado de trigo en los sustratos preparados para la fermentación, puede aumentar la producción de enzimas tales como celulasas, y en general las enzimas hidrolíticas por parte de los hongos filamentosos, para que estos puedan invadir efectivamente la superficie de sustratos vegetales. De acuerdo a los resultados, una concentración de salvado de trigo de 1.16% es suficiente para garantizar que el hongo consuma efectivamente el sustrato y se logren los resultados esperados.

8.3.2. Cinética de fermentación en columna

Siguiendo la metodología descrita en el numeral 7.3.2 se llevó a cabo la cinética de fermentación considerando los valores de las variables temperatura, tamaño de partícula, concentración de salvado de trigo y flujo de aire, establecidos previamente. Las figuras 22 y 23, muestran el comportamiento de las principales variables durante el tiempo.

La Figura 24 representa la evolución cinética de la síntesis de proteínas, disminución de taninos y el consumo de sustrato durante el proceso de fermentación a las condiciones óptimas establecidas. Para el caso de los azúcares y las proteínas, durante las primeras 12 horas de proceso se presenta disminución en su concentración, incrementándose paulatinamente después de este tiempo. Ese comportamiento se atribuye

al rápido crecimiento inicial que presentan los microorganismos, tomando las proteínas solubles y los azúcares más simples para su energía, el desarrollo de sus funciones metabólicas y la producción de biomasa. Estudios desarrollados por Taylor *et al.*, 2002 indican que las proteínas solubles son las primeras en ser hidrolizadas durante la fermentación y que los péptidos liberados durante esta etapa son tomados para el crecimiento microbiano, lo cual también lo corroboran otros ensayos realizados por Nabila y Abdullahi, 2001.

La hidrólisis durante la fermentación de las proteínas solubles en la capa más externa de las grandes estructuras en las que están incrustados los gránulos de almidón conduce a la liberación de estos, dejando la matriz de proteína que no se ve afectada por los acontecimientos proteolíticos durante la fermentación (Elkhalifa *et al.*, 2006), favoreciendo el aumento de las mismas, en el periodo comprendido entre las 6 y las 21 horas de crecimiento. Al cabo de este tiempo, la disminución en la cantidad de proteína es debido a la acción de las proteasas y puede estar vinculado al comienzo de la autólisis del micelio (Raimbault M. , 1996). Para el caso de los taninos, variable objeto de estudio, se puede observar su disminución durante las primeras 12 horas del proceso, lo cual es atribuido a la actividad metabólica desarrollada por el hongo en este tiempo; sin embargo entre las 12 y las 18 horas se presenta un incremento, esto puede deberse a la acción de las enzimas tanasas sobre los complejos tanino-proteína que actúan hidrolizando estas uniones, liberando estos compuestos, los cuales son posteriormente hidrolizados por acción nuevamente de estos complejos enzimáticos. Este comportamiento estuvo acorde al presentado por las proteínas corroborando lo sucedido con estas.

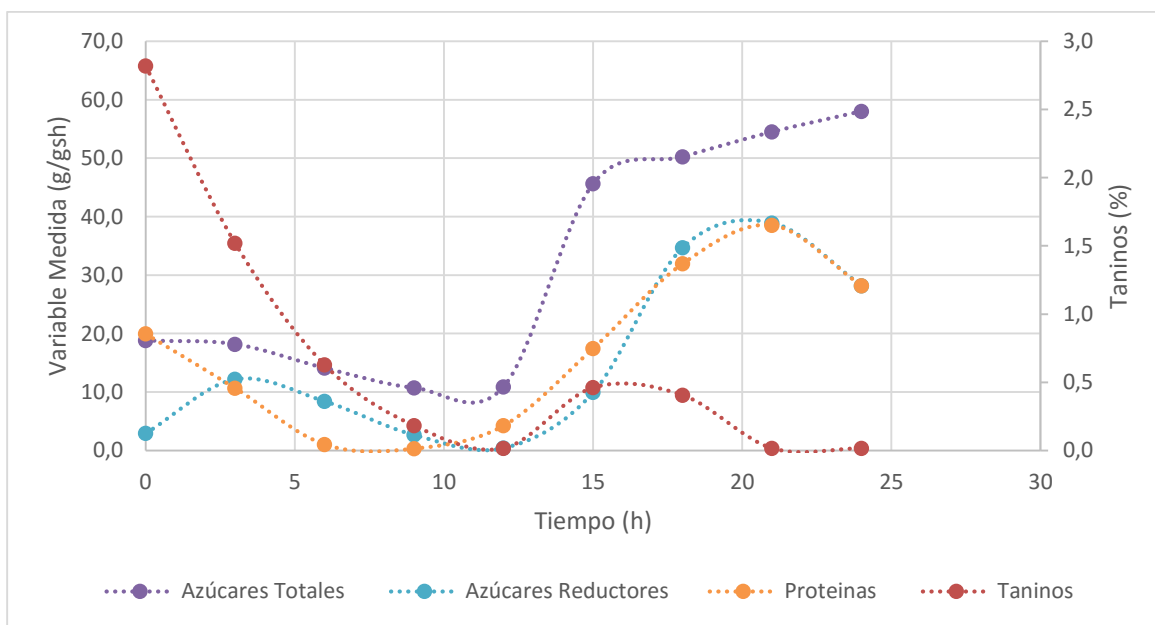


Figura 24. Comportamiento de los azúcares, las proteínas y el pH durante la cinética de fermentación.

En la Figura 25 se observa el comportamiento del CO₂ y el pH durante el proceso de fermentación sólida. El CO₂ es una variable fundamental pues está altamente relacionada con el crecimiento; en la figura es posible observar cómo la concentración de este compuesto incrementa con el tiempo presentando entre las 12 y 15 horas la mayor producción. El comportamiento del pH es opuesto al de las otras variables, disminuyendo en forma constante durante las primeras horas, y drásticamente entre las 12 y las 15 horas de proceso, y a partir de las 21 horas presenta un incremento. Esta disminución del pH se explica por el crecimiento de microorganismo, el cual usa los azúcares para sintetizar algunos compuestos como el ácido fumárico, el ácido láctico, entre otros, que hacen que el pH descienda. Además, la hidrólisis de compuestos fenólicos también ocasiona la liberación moléculas ácidas. Después de 15 horas, el comportamiento del pH se atribuye al aumento de la actividad de las enzimas proteolíticas, que hidrolizan las proteínas del sorgo liberando aminoácidos, péptidos y amoníaco. La liberación de estos compuestos en el medio permite que este pH se mantenga, y al continuar el proceso de fermentación y por la concentración de estos, el pH se incremente. Comportamientos similares durante procesos de fermentación han encontrado Nnam & Obiakorn (2011) y Nnam (2000).

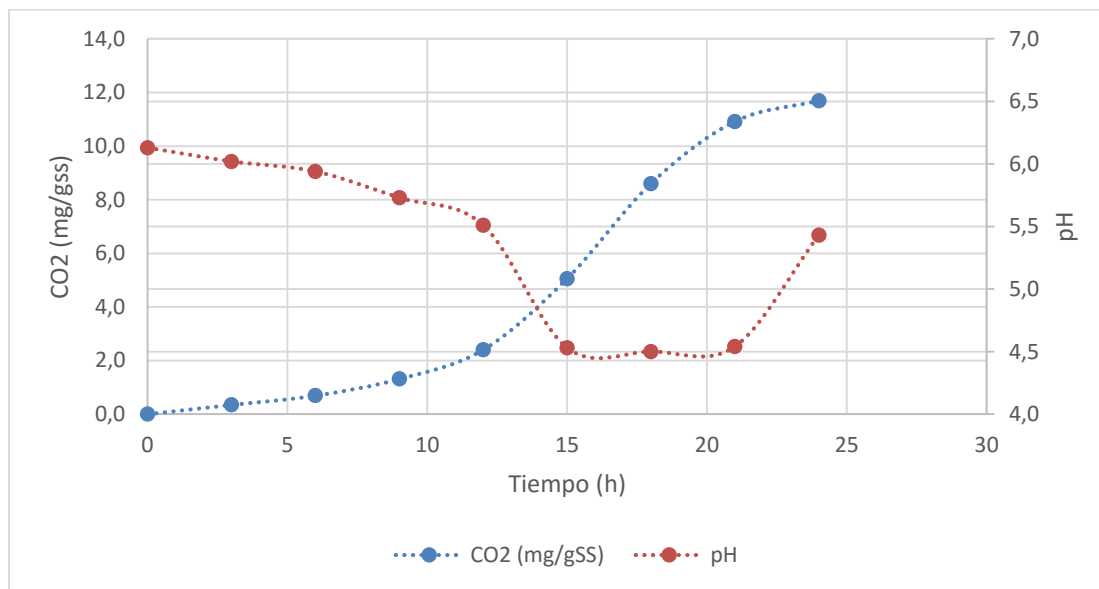


Figura 25. Comportamiento de los taninos y el CO₂ durante la cinética de fermentación

En la Figura 25, es posible observar la mayoría de fases de crecimiento del microorganismo asociadas al comportamiento del CO₂. Entre las 0 y 3 horas se presenta una fase de germinación, donde la producción de CO₂ es poca, y los cambios en el sustrato son poco significativos. Posteriormente empieza el periodo de crecimiento exponencial el cual tiene una duración de 12 horas, durante este periodo se presentan los

principales cambios en el contenido de proteínas y azúcares en el sustrato, mientras el pH alcanza su valor más bajo (4.5). Finalmente se llega a la fase de desaceleración donde se alcanza la mayor cantidad de azúcares reductores debido a la hidrólisis rápida del almidón, y de proteínas debido a la síntesis y liberación de la misma. La fase estacionaria y la fase de muerte, donde se presenta la lisis del microorganismo, no fueron observadas en este tiempo.

Durante el proceso, se tomaron muestras cada 3 horas para ser observadas en el estereoscopio con el objeto de observar el desarrollo del hongo. La Figura 26 muestra la vista macroscópica del sorgo durante el tiempo de fermentación.

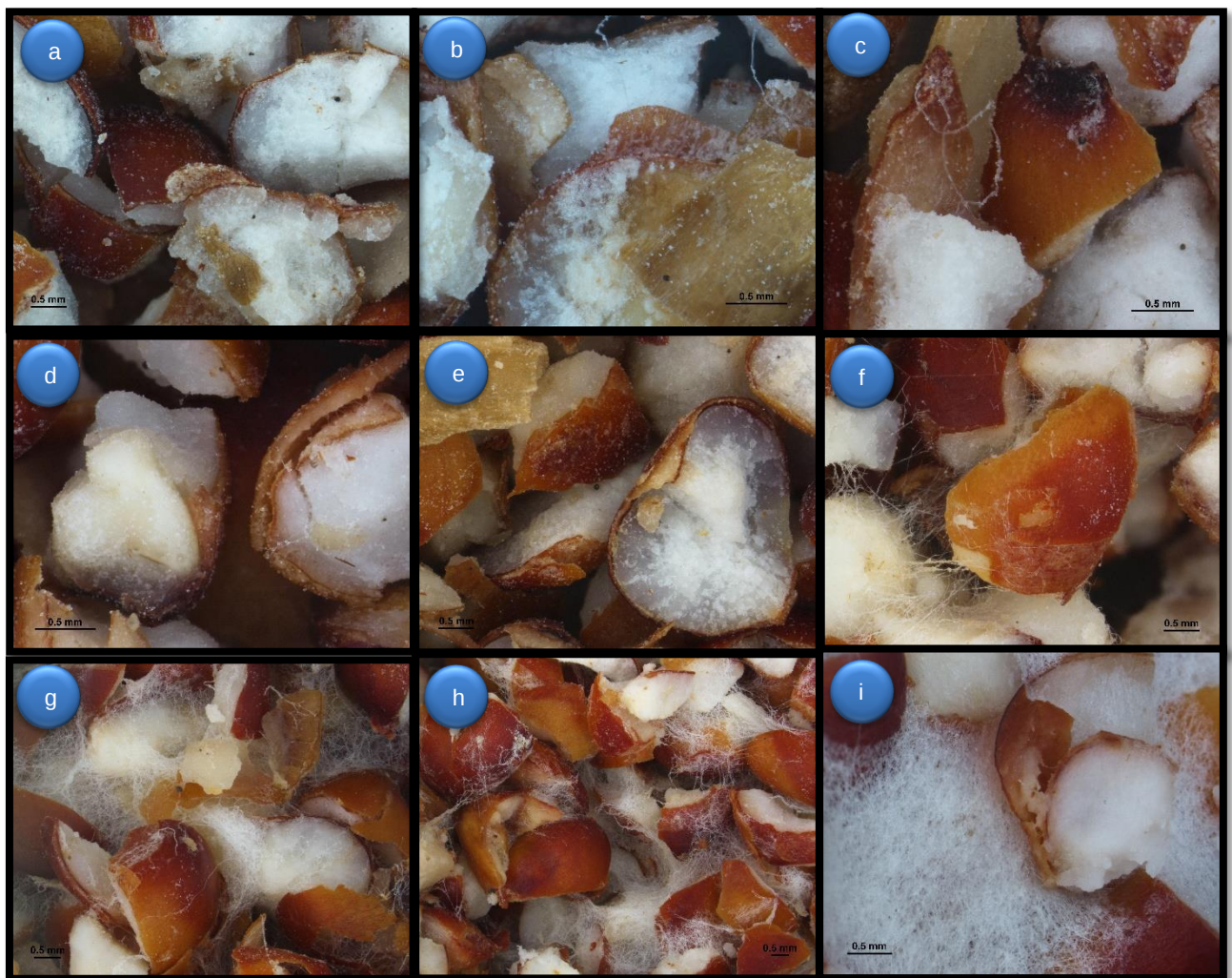


Figura 26. Vista macroscópica del micelio desarrollado durante el proceso de fermentación sólida con sorgo. a) Inicial b) 3h; c) 6h; d) 9h; e) 12h; f) 15h; g) 18 h; h) 21 h; i) 24h.

En la Figura 26 puede observarse la aparición del micelio a través del tiempo. Entre las 12 y las 15 horas de proceso la presencia de micelio se incrementa, lográndose una invasión completa a las 24 horas. Lo anterior se encuentra íntimamente relacionado con los resultados de consumo de sustrato y generación de producto, los cuales indicaron que entre las 12 y 21 horas se presentaron los mayores cambios.

Con los datos del contenido de azúcares, proteínas, taninos, producción de CO₂ y pH, durante el tiempo de fermentación, se calcularon los parámetros cinéticos, los cuales permiten observar la eficiencia del proceso (Tabla 21).

Tabla 21. Datos cinéticos para el *Rhizopus Oryzae* (MUCL 28168) en sorgo crudo

	INICIAL	FINAL
Masa total del material (g)	70,80	66,30
Porcentaje Masa seca (%)	70,00	58,53
Flujo de aire (mm³/min)	85,00	-----
Masa seca total	49,56	38,81
Duración de la germinación (h)	3	-----
Tiempo para la velocidad máxima (h)	18 - 24	-----
Velocidad Máxima de producción de CO₂ (mg/h/gss)	1,18	-----
CO₂ Total (mg/gss)	0,37	-----
Duración de la fase exponencial (h)	15	-----
Constante específica de crecimiento (μ)	0,22	-----
Proteína (%bs)	19,96	28,18
Azúcares totales (%bs)	18,80	58,03
Perdida en peso seco (g)	14,07	-----
Rendimiento Proteína/Azúcar	1,18	-----
Velocidad de reducción de taninos	2,29	-----
Rendimiento	0,25	-----

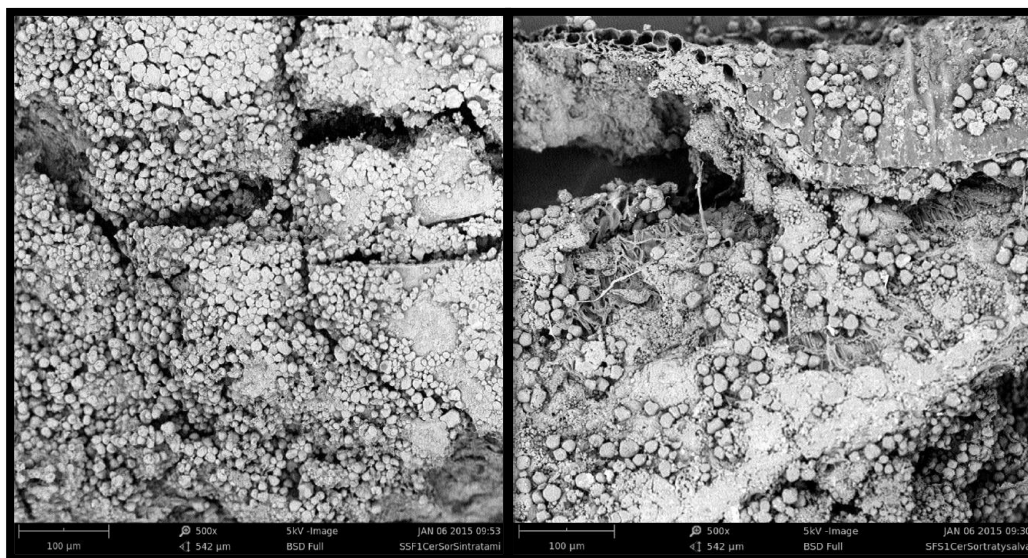
Con la cinética de CO₂ en coordenadas semilogartimicas, se obtuvo que la constante específica de crecimiento fue de 0,22 h⁻¹ entre las 3 y 18 horas de crecimiento, donde se presentó la fase exponencial de crecimiento. Esta tasa de crecimiento es comparable con las obtenidas por el mismo hongo en otro tipo de sustratos (Raimbault *et al.*, 1998), lo cual indica que teniendo las condiciones óptimas para su crecimiento

este puede desarrollarse rápidamente en cualquier tipo de medio. El rendimiento proteína/azúcar fue alto comparado al de otros estudios, esto posiblemente debido a la naturaleza del sustrato donde se desarrolló el microorganismo y las condiciones establecidas, lo cual permitió una mayor liberación de proteínas comparado con el azúcar consumido. Se estableció además que la velocidad de reducción de taninos, comparada con la generación de CO₂ fue de 2.29.

8.3.3. Caracterización del sorgo fermentado.

Después de llevadas a cabo las cinéticas de fermentación bajo los parámetros óptimos seleccionados, se realizó el proceso de fermentación sobre sorgo durante un tiempo de 21 horas, tiempo en el cual se obtenían los mejores resultados para cada una de las variables estudiadas, con el objetivo de evaluar los principales cambios fisicoquímicos y microbiológicos ocurridos al producto.

Para observar los efectos ocasionados por la degradación del hongo, durante la fermentación, sobre la organización estructural del sorgo, se observó una muestra fermentada y una sin fermentar por microscopía electrónica de barrido. La imagen se presenta en la Figura 27.



(a)

(b)

Figura 27. Vista de la morfología del sorgo (a) antes de tratamiento (b) después del proceso de fermentación, a 500x

Es posible observar en la Figura 27-(a) cómo los gránulos de almidón en el sorgo están completamente encerrados en una matriz proteica muy compacta, mientras que en la Figura 27 - (b) los eventos proteolíticos

y amilolíticos que ocurren durante la fermentación impactaron esta estructura deteriorándola y liberando los gránulos de almidón que antes estaban dentro de dicha estructura revestida. Observaciones similares fueron realizadas por Elkhaila *et al.*, 2006 en harinas de sorgo cocinadas fermentadas.

Algunos autores (Oliveira *et al.*, 2010) observaron que el crecimiento del microorganismo en el sustrato puede cambiar su composición química debido a la generación de enzimas extracelulares para obtener nutrientes y adicionalmente producir otros metabolitos. Estos metabolitos pueden enriquecer los sustratos dependiendo de la disponibilidad de nutrientes que este tenga. La acción microbiana utiliza los componentes disponibles para sus procesos químicos y enzimáticos (Blandino *et al.*, 2003) (Olanipekun *et al.*, 2009) (Othman *et al.*, 2009).

En la Tabla 22 se pueden observar los efectos en la composición proximal, mostrando incremento considerable en el contenido de proteína cruda de 23,87%, fibra cruda del 7.05% y cenizas de 26.05% así mismo se presentó disminución en el contenido de carbohidratos de 1.746%, y grasas de 26.88%, como consecuencia del metabolismo microbiano. Acorde con los resultados ya descritos anteriormente, la disminución del almidón se explica porque el hongo utiliza los carbohidratos para su desarrollo, siendo su principal fuente de energía. El aumento en el contenido de fibra puede estar relacionado con la producción de algunos polisacáridos por parte del hongo para la formación de sus estructuras celulares, tales como celulosa y quitina, y así mismo con la reducción en el contenido de grasas, dado que deben utilizar algunos lípidos para la síntesis de estos compuestos (Oliveira *et al.*, 2010).

Tabla 22. Caracterización proximal del sorgo después del tratamiento

Componente	Resultado	
	Sin Fermentar	Fermentado
Humedad (%)	9,98 ± 0,34	30,43 ± 0,34
Carbohidratos totales %(bs)	89,62 ± 0,50	88,06 ± 0,50
Azúcar reductor (g glucosa/g sustrato)	2,95 ± 1,43	40,17 ± 0,18
Azúcar total (g glucosa/g sustrato)	15,12 ± 2,95	54,50 ± 1,72
Proteína cruda % (bs)	7,33 ± 0,50	9,08 ± 0,50
Proteína soluble (%)	57,34 ± 0,50	68,59 ± 0,50
Fibra cruda % (bs)	2,41 ± 0,50	2,58 ± 0,50
Cenizas % (bs)	1,19 ± 0,50	1,50 ± 0,50
Grasa % (bs)	1,86 ± 0,50	1,36 ± 0,50

pH	6,30 ± 0,50	4,50 ± 0,50
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) µg/Kg	No detectable	No detectable

La digestibilidad de la proteína es una característica nutricional del grano, puesto que las proteínas de alta digestibilidad son más susceptibles a la hidrólisis por parte de las enzimas proteolíticas que las de baja digestibilidad, proporcionando de ese modo más aminoácidos y otros nutrientes de los alimentos (Duodu *et al.*, 2003). La digestibilidad de la proteína del sorgo, expresada en pepsina, presentó incremento del 19.62%, mejorando la calidad nutricional del grano. Este aumento de la digestibilidad de la proteína es atribuido a la liberación de enzimas hidrolíticas tales como pepsinas, amilasas y fitasas a partir del microorganismo durante la fermentación; estas enzimas son capaces de separar la reticulación de los enlaces kafirinas para reducirlos a moléculas más pequeñas convirtiéndose en más asequibles por las enzimas proteolíticas (Kuo *et al.*, 2013). Abdelseed *et al.*, (2011) encontraron que después de un proceso de fermentación tradicional en diferentes líneas de sorgo, la digestibilidad tuvo incremento del 61.50%. Otros autores también han encontrado incremento en la digestibilidad de diferentes variedades de sorgo con alto contenido de taninos, después de procesos de fermentación natural (Murwan & Ali, 2011) (Hassan & El Tinay, 1995). Estudios realizados por Amadioha, 1998 con *Rhizopus oryzae* mostraron disminución en el contenido de almidón, maltosa, sacarosa, proteínas y lípidos de papas almacenadas. Oliveira *et al.* (2010) encontraron para el salvado de arroz un incremento de 17% del contenido de proteínas.

Se realizó el perfil de aminoácidos a la muestra fermentada durante 21 horas bajo las condiciones establecidas en el ítem 8.3.2 y se comparó con la muestra sin fermentar. Los resultados se encuentran registrados en la Tabla 23.

Tabla 23. Contenido de aminoácidos del sorgo sin fermentar y fermentado

Determinación (mg/100g)	Resultado	
	Sorgo sin fermentar	Sorgo fermentado
Ácido aspártico	463,0	496,5
Ácido glutámico	1352,0	1499,2
Serina	316,1	319,6
Histidina	No detectable	No detectable
Glicina	228,1	251,1
Treonina	200,4	232,1

Arginina	237,9	405,0
Alanina	600,8	594,4
Tirosina	247,2	233,3
Valina	282,3	265,3
Fenilalanina	340,3	347,7
Isoleucina	249,1	235,8
Leucina	855,1	749,6
Lisina	141,5	176,8
Prolina	536,0	519,5
Triptófano	89,7	91,9

Puede observarse que los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina, arginina, fenilalanina, lisina y el triptófano, incrementaron durante el proceso de fermentación, mientras que los aminoácidos tirosina, valina, isoleucina, y la prolina presentaron disminución. El aumento en los aminoácidos durante la fermentación es debido a diferentes razones: por un lado está estrechamente relacionado con la hidrólisis de los complejos proteínas – taninos, proteínas – fitasas y proteínas – fenoles, dado que como se señaló anteriormente, estos compuestos atrapan los grupos terminales de algunos aminoácidos lisina, histidina y arginina, y al liberarlos, el contenido de estos aminoácidos aumenta; otra de las razones es que durante el proceso las proteínas, por acción de las proteasas, son divididas en sus componentes más pequeños, los aminoácidos. Otros autores (Zhang *et al.*,2007) han señalado además que durante su ciclo de crecimiento, los microorganismos pueden sintetizar algunos aminoácidos. Así mismo la reducción en el contenido de aminoácidos se explica por el crecimiento microbiano, los cuales degradan las proteínas en péptidos y aminoácidos para aprovecharlos fácilmente en su desarrollo. Mugula y Lyimo (2000) y Kazans y Fields (1981), reportaron que la fermentación del sorgo y algunas mezclas de cereales produce aumento significativo de los aminoácidos lisina, leucina, isoleucina y metionina.

En la Tabla 24 se muestran los resultados de los análisis de taninos condensados y microbiológicos. Para el contenido de taninos se presentó disminución del 86,29%; observaciones similares, han sido reportadas por otros investigadores. Schons *et al.*, (2012) utilizaron para un proceso de fermentación en sorgo el microorganismo *Paecilomyces variotii*, encontrando una reducción del 58% en el contenido de taninos. Abdelseed *et al.* (2011), encontraron que después de un proceso de fermentación natural aplicado a diferentes variedades de sorgo, el contenido de taninos disminuyó en promedio 42.54%. Mugula & Lyimo (2000) llevaron a cabo una fermentación controlada con *Rhizopus oligosporus* en mezclas de sorgo con

otros cereales y determinaron que hubo reducción hasta del 94% en el contenido de taninos. Hassan y El Tinay (1995) concluyeron que realizando un proceso de fermentación natural en variedades de sorgo con alto y bajo contenido de taninos, se presentaba reducción del 63% y 61,4%, respectivamente. El Khalifa y El Tinay, (1994) lograron a través de fermentación una disminución del 92% en el contenido de taninos de harina de sorgo.

En cuanto al análisis microbiológico de las muestras, puede observarse claramente la presencia del hongo en el sorgo fermentado. Los otros parámetros medidos no dan indicio de algún tipo de deterioro microbiológico, por lo cual puede afirmarse que el alimento está estable. El T.BA., indicador de la rancidez oxidativa de los productos, permaneció sobre el límite permisible para este tipo de productos.

Tabla 24. Análisis de TBA, taninos y microbiológico para el sorgo con y sin tratamiento

Análisis	Resultado	
	Sorgo sin tratamiento	Sorgo fermentado
T.B.A. (mg/Kg)	0,53	0,57
Taninos Condensados Catequinas (%)	1,24	0,17
Microbiológico		
Entéricas (UFC/mL)	0	0
Coliformes (NMP/g)	<3	<3
Hongos y levaduras (UFC/g)	<3	3,4 x 10 ⁴
Mesófilos (UFC/g)	<3	<3

Los resultados anteriores muestran que los parámetros del proceso de fermentación seleccionados fueron efectivos, logrando encontrar todas las variables en los intervalos requeridos, considerando particularmente el caso de la reducción de taninos, donde se mostró ser altamente efectivo, por lo cual esto favorece al mejoramiento en la calidad del producto para aplicaciones posteriores en el desarrollo de alimentos, al mostrar, entre otras, características proteicas superiores al del grano sin tratamiento y con la ventaja de ser obtenido a través de la aplicación de tecnologías limpias.

9. CONCLUSIONES

- Se demostró que el hongo *Rhizopus oryzae* (MUCL 28168), presenta un potencial de crecimiento sobre el sorgo, lo cual comprueba la capacidad que tienen estos microorganismos para invadir este sustrato y la utilidad de aplicación en procesos fermentativos.
- Se encontró que el hongo *Rhizopus oryzae* (MUCL 28168) tiene las mejores características de crecimiento en comparación al *Aspergillus oryzae* (ATCC 20387). Los resultados presentaron una velocidad mayor de crecimiento y una producción de biomasa más alta, cuando crece sobre sustrato sin remojo previo; lo cual representa un resultado de interés al reducir gastos innecesarios de agua para procesos iniciales de adecuación.
- De los métodos estudiados para la obtención de inóculos iniciadores, el método tane-koji garantizó la homogeneidad de la formación del micelio sobre el sustrato, manteniendo de manera constante y disponible inóculo iniciador durante el desarrollo de la experimentación, disminuyendo los factores de error asociados a la calidad y procedencia del inóculo, además de presentar una ventaja para los procesos de fermentación sólida al reducir los tiempos empleados en la elaboración de inóculos tradicionales.
- Con el proceso desarrollado bajo las condiciones establecidas, se obtuvo un producto con características nutricionales mejores al producto inicial, disminuyendo el contenido de taninos en 86,26% y aumentando la concentración de proteína en un 23,87%, demostrando la potencial aplicación de la fermentación sólida al sorgo con el *Rhizopus oryzae* (MUCL 28168) para la obtención de una materia prima de alto nivel nutricional que puede ser utilizada tanto en alimentación humana como animal.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para establecer qué tipo de actividad enzimática presenta el microorganismo en cada etapa de crecimiento sobre este sustrato.
- Cuantificar e identificar los componentes volátiles obtenidos durante el proceso.
- Realizar un estudio económico y de mercado para evaluar los mercados potenciales al cual puedan destinarse este tipo de productos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelseed, B., Abdalla, A., Yagoub, E.-G. A., & Mohamed Ahmed, I. (2011). Some Nutritional Attributes of Selected Newly Developed Lines of Sorghum (*Sorghum bicolor*) after Fermentation. *J. Agr. Sci. Tech.*, 13, 399-409.
- Amadioha, A. (1998). Effect of cultural conditions on the growth and amylolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 32(1), 41-48.
- Barrena Gómez, R. (2006). Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento de procesos. *Tesis*. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química. Barcelona, España.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M., Pandiella, S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527–543.
- Bustos Vázquez, Z., Gómez Aldapa, C., Tellez Luis, S., Jonguitd Pratt, L., Trejo Ramírez, P., Ochoa Martínez, A., & Castro Rosas, J. (2010). Caracterización del almidón de dos variedades de sorgo del Estado de Tamaulipas. *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* (págs. CLO86 1 - CLO86 13). Guanajuato, Gto.: Universidad de Guanajuato. Facultad de ciencias biológicas.
- Chávez-González, M., Rodríguez-Dúran, L., Balagurusamy, N., Prado-Barragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J., & Aguilar, C. (2012). Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology*, 5, 445–459.
- Chelule, P., Mbongwa, H., Carries, S., & Gqaleni, N. (2010). Lactic acid fermentation improves the quality of amahewu, a traditional South African maize-based porridge. *Food Chemistry*(122), 656–661.

- Colombo, A., Ordoñez, M., & Isla, M. (2008). Optimización de la producción de tanasa por *Aspergillus niger*. *Jornada; IX Jornadas Científicas y encuentro de Jóvenes investigadores "Augusto Palavecino"*. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Correia, I., Nunes, A., Duarte, I. F., Barros, A., & Delgadillo, I. (2005). Sorghum fermentation followed by spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 90, 853–859.
- Cruz Martínez, L. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. *Trabajo de grado*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Cuevas-Rodríguez, E., Verdugo-Montoya, N., Angulo-Bejarano, P., Angulo-Bejarano, J., Mora-Escobedo, R., Bello-Pérez, L., . . . Reyes-Moreno, C. (2006). Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *LWT*(39), 1072–1079.
- Duodu, K., Taylor, J., Belton, P., & Hamaker, B. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, 38, 117–131.
- Edel León, A., & Rosell, C. (2007). *DE TALES HARINAS, TALES PANES: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica* (Primera edición ed.). (H. Báez, Ed.) Córdoba, Argentina.
- Eklund-Jonsson, C., Sandberg, S., & Larsson-Alminger, M. (2006). Reduction of phytate content while preserving minerals during whole grain cereal tempeh fermentation. *Journal of Cereal Science*(44), 154–160.
- El Khalifa , A., & El Tinay , A. (1994). Effect of fermentation on protein fractions and tannin content of low- and high-tannin cultivars of sorghum. *Food Chemistry*, 49(3), 265–269.
- Elkhalifa, A., Bernhardt, R., Bonomi, F., Iametti, S., Pagani, M., & Zardi, M. (2006). Fermentation modifies protein/protein and protein/starch interactions in sorghum dough. *Eur. Food Res. Technol.*(222), 559–564.
- Elmoneim, A., Elkhalifa, O., Schiffler, B., & Bernhardt, R. (2005). Effect of fermentation on the functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry*, 92, 1–5.

- Espinal, C. F., Martínez, H., & Acevedo, X. (Marzo de 2005). *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Observatorio Agrocadenas Colombia*. Recuperado el 8 de Junio de 2012, de La cadena de cereales, alimentos balanceados para animales, avicultura y porcicultura en Colombia: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511215360_caracterizacion_cereales.pdf
- Fabara, C., & Proaño, A. (2011). Evaluación nutricional del Tempeh obtenido por fermentación de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y Quinoa (*Chenopodium quinoa*) con *Rhizopus oligosporus*. *Tesis de Grado*. Guaranda, Ecuador: Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela de Ingeniería Agroindustrial.
- FENALCE. (Mayo - Junio de 2010). *Importancia de los cultivos presentados por Fenalce*. Recuperado el 18 de Marzo de 2013, de El cultivo del sorgo, historia e importancia: http://www.fenalce.org/arch_public/sorgo93.pdf
- García, D. E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes*, 27(2), 101-116.
- Ghosh, B., & Ray, R. (2011). Current Commercial of *Rhizopus oryzae*: A Review. *Journal of Applied Sciences*, 11(14), 2470 - 2486.
- Golman, G. H., & Osmani, S. A. (2008). *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Hassan, I., & El Tinay, A. (1995). Effect of fermentation on tannin content and in-vitro protein and starch digestibilities of two sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 53(2), 149–151.
- Hernández, E., Rodríguez, A., Bocuort, R., & Gutiérrez, O. (2010). Potencialidades del hongo *Aspergillus oryzae* como regulador de las excreciones de fósforo inactivo al medio por animales monogástricos. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11(03B).
- Hidaki, Y. L. (2009). Elaboración de Miso fermentado de soya para obtención de productos aplicables a la cocina occidental. *Trabajo de grado*. Palmira, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería.

- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269–1273.
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*. Iowa: Blackwell Publishing Professional.
- Kuo, H., Wu, P., Chung, H., Jiang, C., & Wu, M. (2013). Koji Fermentation Improve the protein digestibility. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 419–423.
- Liang, J., Han, B., Nout, R., & Harmer, J. (2008). Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry*(110), 821–828.
- López Coello, C. (2002). Los taninos en la alimentación de las aves comerciales. *Producao Animal*.
- López Ortiz, N. C., Tique, M. M., & Pérez Lavalle, L. d. (2011). Contribución al estudio del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) para nutrición humana. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 13(1), 33-44.
- Mahgoub, S., & Elhag, S. (1998). Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 61, 77-80.
- Marfo, E., Simpson, B., Idowu, J., & Oke, O. (1990). Effect of local food processing on phytate level in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *Journal of Agricultural Food Chemistry*(38), 1580–1585.
- Márquez Lara, D., & Suárez Londoño, Á. (Julio - Diciembre de 2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*(16).
- Mitchell, D., Srinophakun, P., Krieger, N., & Von Meien, O. (2006). Group II bioreactors: forcefully-aerated bioreactors without mixing. En D. Mitchell, N. Krieger, & M. Berovic, *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation* (págs. 77-94). Springer.
- Mitchell, D., Stuart, D., & Tanner, R. (2002). Solid State Fermentation, Microbial Growth Kinetics. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, 2407-2429.

- Mohamed, M. E., Amro, B. H., Mashier, A. S., & Elfadil, E. B. (2007). Effect of Processing Followed by Fermentation on Antinutritional Factors Content of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.) Cultivars. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(5), 463-467.
- Montiel, M., Elizalde, J., Santini, F., & Giorda, L. (2012). Desactivación de taninos en grano húmedo de sorgo con polietilenglicol o urea. *Arch. Zootec*, 61(234), 235-244.
- Mugula, J., & Lyimo, M. (2000). Evaluation of the nutritional quality and acceptability of sorghum-based tempeh as potential weaning foods in Tanzania. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, 269 - 277.
- Munguía-Pérez, R., Espinosa-Texis, A., Hernández-Arroyo, M., Reyes-Matías, M., Gonzales-Salome, F., & Melgoza-Palma, N. (2008). Elaboración de un producto fermentado de soya (*glycine max*) tipo tempeh con *Rhizopus oryza*. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*, VI, 85-90.
- Murekatete, N., Hua, Y., Kong, X., & Zhang, C. (2012). Effects of Fermentation on Nutritional and Functional Properties of Soybean, Maize, and Germinated Sorghum Composite Flour. *International Journal of Food Engineering*, 8(1), Artículo 6.
- Murwan, S., & Ali, A.-A. (2011). Effect of fermentation period on the chemical composition, in-vitro protein digestibility and tannin content in two sorghum cultivars (Dabar and Tabat) in Sudan. *Journal of Applied Biosciences*, 39, 2602 - 2606.
- Nabila, Y., & Abdullahi, E. (2001). Effect of fermentation on sorghum protein fractions and in vitro protein digestibility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56, 175–182.
- Nnam, N., & Obiakor, P. (2011). Effect of fermentation on the nutrient and antinutrient composition of Baobab (*Adansonia digitata*) seed and rice (*Oryza sativa*) grains. *Ecology of Food and Nutrition*, 42(4-5), 265-277.
- Nogueira, S. (2011). *Suplementación con mezcla comercial de taninos de quebracho y castaño en vacas lecheras*. Obtenido de Trabajo Final. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica

Argentina: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/suplementacion-mezcla-comercial-taninos-quebracho.pdf>

- Olanipekun, B., Otunola, E., Adelakun, O., & Oyelade, O. (2009). Effect of fermentation with *Rhizopus oligosporus* on some physico-chemical properties of starch extracts from soybean flour. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1401–1405.
- Oliveira, M., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E., Badiale-Furlong, E., & Souza-Soares, L. (2010). Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. *CyTA - Journal of Food*, 8(3), 229-236,.
- Ortega David, E. H. (2012). Proceso de fermentación sólida con *Rhizopus oligosporus* para la detoxificación de semillas de Lupino (*Lupinus mutabilis*). Tesis. Cali, Colombia: Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería de Alimentos.
- Osman, M. A. (2004). Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chemistry*(88), 129 - 134.
- Osman, M. A., Abdel Rahman, I. E., Hamad, S. H., & Dirar, H. A. (2010). Biochemical changes occurring during traditional Sudanese processing of Kisra bread. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 102-106.
- Othman, N., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Che'toui olives. *Food Chemistry*, 116, 662–669.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborská, P., Galbe, M., & Zacchi, G. (2005). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology*, 96, 843-850.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*(13), 81–84.
- Papini, M., Salazar , M., & Nielsen, J. (2010). Systems Biology of Industrial Microorganisms. En C. Wittmann , & R. Krull, *Biosystems Engineering I* (págs. 51-99). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.

- Perez Quilatan, L. M. (1996). Fermentación en estado sólido del mijo perla (*Pennisetum americanum* (L) Leeke) por *Rhizopus Oligosporus* para la obtención de un producto rico en proteína. *Tesis*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Pranoto, Y., Anggrahini, S., & Efendi, Z. (2013). Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on in-vitro protein and starch digestibilities of sorghum flour . *Food Bioscience*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.04.001>.
- Queiroz, V., Aguiar, E., Schaffert, R., Moreira, A., Machado, S., & Duarte, H. (2011). Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH] para alimentacao humana. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 3(10), 180-195.
- Raimbault, M. (1996). *Fermentation en milieu solide: croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé*. Toulouse, Francia: O.R.S.T.O.M.
- Raimbault, M., Soccol, C., Stertz, S., & Porto de Souza, L. (1998). Relation Biomass/Respiration: Theoretical and practical aspects. En M. Raimbault, C. R. Soccol, & G. Chuzel, *International Training Course on Solid State Fermentation* (págs. 87 - 101). Montpellier: ORSTOM.
- Robert Nout , M., & Aidoo, K. (2010). Asian Fungal Fermented Food. En M. Hofrichter, *Industrial Applications* (págs. 29-58). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Romero, J., Ortuzar, F., Navarrete, P., & Opazo, R. (2011). Proceso de reducción de factores antinutricionales mediante la fermentación con microorganismos. *Quinto congreso de la Soja del Mercosur*. Rosario, Argentina.
- Ruíz Badillo, A. (2013). Estudio de las enzimas fenoloxidasas, proteasas, y peroxidasas presentes en *Rhizopus oryzae* ENHE. *Tesis*. México, D.F., México: Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa.
- Savón, L., & Scull, I. (2006). Avances en los métodos para disminuir el efecto de los factores antinutricionales en alimentos para especies monogástricas. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 13(Suplemento 1).

- Schons, P. F., Battestin, V., & Alves Macedo, G. (2012). Fermentation and enzyme treatments for sorghum. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1).
- Singhania, R., Patel, A., Soccol, C., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*(44), 13–18.
- Stein, H. H. (17 de Noviembre de 2011). Ingredientes Alimenticios Alternativos: concentracion energética y en nutrientes, digestibilidad y niveles recomendados de inclusión. *XXVII Curso de Especializacion Fedna*. Madrid.
- Taylor, J., & Taylor, J. (2002). Alleviation of the adverse effect of cooking on sorghum protein digestibility through fermentation in traditional African porridges. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 129-137.
- Towo, E., Matuschek, E., & Svanberg, U. (2004). Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. *Food Chemistry*, 92, 369–376.
- Urbano, G., López, M., Hernández, J., Fernández, M., Moreu, M., Frías, J., . . . Vidal-Valverde, C. (1995). Nutricional assessment of raw heated and germinated lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(68), 141-146.
- Vásquez-Florez, A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., & De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados:naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*, VI(2).
- Xianyun, S., Ziyong, L., Yinbo, Q., & Xuezhi, L. (2008). The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by. *Appl Biochem Biotechnol*, 143, 119-128.
- Zhang , Z., Jin , B., & Kelly , J. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35(3), 251–263.

