

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO DEL
MIJO PERLA (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) POR
Rhizopus oligosporus PARA LA OBTENCION DE UN
PRODUCTO RICO EN PROTEINA**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS**

POR

LUIS MANUEL PEREZ QUILANTAN

MONTERREY, N. L.

JUNIO DE 1996





1080072408

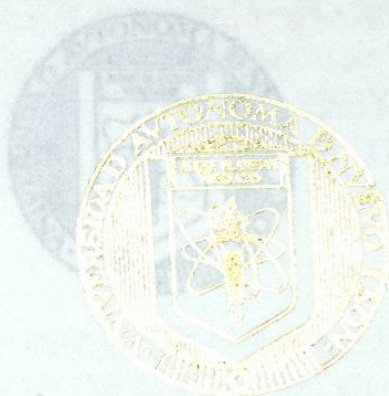
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL
MIJO PERLA (*Pennisetum americanum* (L.) Leake) POR

Rhizopus oligosporus PARA LA OBTENCIÓN DE UN
PRODUCTO RICO EN PROTEÍNA

FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO DEL
MIJO PERLA (*Pennisetum americanum* (L.) Leake) POR
Rhizopus oligosporus PARA LA OBTENCIÓN DE UN
PRODUCTO RICO EN PROTEÍNA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS

LUIS MANUEL PÉREZ QUILANTÁN

FOR

LUIS MANUEL PÉREZ QUILANTÁN

MONTERREY, N.L.

JUNIO DE 1998

MONTERREY, N. L.

JUNIO DE 1998



T M
SB191
MS
PY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL
MIJO PERLA (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) POR
Rhizopus oligosporus PARA LA OBTENCIÓN DE UN
PRODUCTO RICO EN PROTEÍNA.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS**

POR

LUIS MANUEL PÉREZ QUILANTÁN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL
MIJO PERLA (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) POR
Rhizopus oligosporus PARA LA OBTENCIÓN DE UN
PRODUCTO RICO EN PROTEÍNA.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS**

POR

LUIS MANUEL PÉREZ QUILANTÁN

COMISIÓN DE TESIS



**DR. BALTAZAR CUEVAS HERNÁNDEZ
PRESIDENTE**



**DRA. MA. GPE. ALANÍS G.
SECRETARIO**



**DR. LUIS J. GALÁN WONG
VOCAL**

MONTERREY, N.L.

JUNIO DE 1996

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A LA U.A.T. QUE MEDIANTE EL INSTITUTO DE ECOLOGIA Y ALIMENTOS ME HA PERMITIDO CONSOLIDAR MI FORMACION ACADEMICA.

A LA U.A.N.L. A TRAVES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DONDE HE ADQUIRIDO LOS CONOCIMIENTOS QUE ME PERMITEN DESARROLLARME PROFESIONALMENTE.

AL DR. BALTAZAR CUEVAS HERNANDEZ, POR LAS SUGERENCIAS Y EL APOYO BRINDADO PARA LA TERMINACION DEL POSTGRADO.

A LA DRA. MARIA GUADALUPE ALANIS GUZMAN, POR SU GRAN DISPOSICION Y AYUDA PARA LA CULMINACION DEL TRABAJO ACADEMICO REALIZADO.

AL DR. LUIS J. GALAN WONG, POR SUS OBSERVACIONES Y CONSEJOS EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HAN COLABORADO DE UNA U OTRA FORMA EN LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

**Y CON UNA ESPECIAL DEDICATORIA A MI FAMILIA:
MI ESPOSA Y MIS HIJAS.**

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS	3
III. OBJETIVOS	3
IV. REVISION DE LITERATURA	4
1. Mijo Perla	4
a) Generalidades	4
b) Utilización	5
c) Composición Química	6
d) Procesos del Mijo Perla Para Mejorar el Valor Nutricional	8
2. Fermentación en Estado Sólido	9
a) Generalidades	9
b) Tipos de Fermentación en Estado Sólido	12
c) Parámetros de la Fermentación en Estado Sólido	13
d) Aplicación de la Fermentación en Estado Sólido en la Industria de Alimentos	15
V. MATERIALES Y METODOS	18
1. Microorganismo y Sustrato	18
2. Producción de Inóculo	18
3. Preparación y Tratamiento al Sustrato	18
4. Selección de los Parámetros de Fermentación	19
5. Cinética de Fermentación en Sustrato Sólido	20
6. Tratamiento y Análisis de la Muestra	20
7. Análisis Químico Proximal	20
a) Humedad	20
b) Proteína Cruda	21
c) Extracto Etéreo	21
d) Fibra Cruda	21
e) Cenizas	21
f) Extracto Libre de Nitrógeno	21
8. Acidos Grasos Totales	21
9. Determinación de la Calidad de la Proteína	22
a) Análisis de Aminoácidos	22
b) Proteína digestible	22
10. Análisis Estadísticos	23

VI. RESULTADOS Y DISCUSION	26
1. Obtención de las Condiciones de Fermentación	26
a) Tratamiento del sustrato	26
b) Efecto de las condiciones de Cultivo	27
b.1 Tamaño de partícula	27
b.2 Humedad	27
b.3 Temperatura de Incubación	28
2. Cinética de Fermentación	28
3. Efecto de la Fermentación sobre la Composición Química y el Valor	
Nutritivo del Mijo Perla	30
a) Composición Química Proximal	30
b) Acidos Grasos	32
c) Análisis de Aminoácidos	33
d) <i>Proteína Digestible</i>	34
VII. CONCLUSIONES	35
1. Determinación de los Parámetros de la Fermentación del Mijo Perla ..	35
2. Efecto de la Fermentación sobre la Composición Proximal y el Valor	
Nutritivo del Mijo Perla	35
VIII. APORTACIONES ORIGINALES DEL TRABAJO	36
IX. LITERATURA CITADA	37
ANEXO. Abreviaturas.	

INDICE DE CUADROS

CUADRO #	TITULO	PAGINA
1	Historia y Desarrollo de la Fermentación en Estado Sólido ..	10
2	Ventajas y Desventajas de la Fermentación Sólida con Respecto a la Fermentación Líquida	11
3	Análisis Químico de Diferentes Tipos de Microorganismos	13
4	Microorganismos, Sustratos y Productos en el Proceso de la Fermentación en Estado Sólido	17
5	Cambios en la Composición Proximal del Mijo Perla por Efecto de la Fermentación con <i>Rhizopus oligosporus</i>	31
6	Efecto de la Fermentación con <i>Rhizopus oligosporus</i> en la Composición de Acidos Grasos del Mijo Perla	32
7	Comparación de la Composición de Aminoácidos Esenciales del Mijo Perla Crudo y Fermentado con <i>Rhizopus oligosporus</i>	33
8	Comparación de la Composición de Aminoácidos no Esenciales del Mijo Perla Crudo y Fermentado con <i>Rhizopus oligosporus</i>	33
9	Comparación de la Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Proteína del Mijo Perla con Diferentes Tratamientos	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURA #	TITULO	PAGINA
1	Diagrama de Flujo del Proceso Utilizado	24
2	Esquema del Fermentador en Estado Sólido Utilizado, Modificación al Sistema de Abdullah y col. (1985), . . .	25
3	Desarrollo de <i>Rhizopus oligosporus</i> en Mijo perla. . .	29
4	Porcentaje de Proteína Obtenido en la Fermentación por <i>Rhizopus oligosporus</i> en Diferentes Tamaños de Partícula del Mijo Perla.	29
5	Comportamiento en el Contenido de Proteína, Extracto Etéreo, Carbohidratos y Fibra Cruda del Mijo Perla por Efecto de la Fermentación con <i>Rhizopus oligosporus</i> .	31

RESUMEN.

Se implementó un sistema de fermentación en estado sólido para el grano de mijo perla (*Pennisetum americanum*), con el propósito de mejorar su valor nutricional a través del crecimiento del hongo *Rhizopus oligosporus* y obtener un producto final que sirva como ingrediente protéico para la elaboración de un alimento de consumo humano. La presente investigación se realizó en tres etapas: Primera: Selección de las condiciones óptimas para la fermentación del mijo perla a nivel matraz erlenmeyer de 500 ml de capacidad total; se evaluaron las variables que determinan el desarrollo del proceso, como son: Tratamiento al sustrato, el tamaño de partícula, la temperatura de incubación, la humedad inicial del sustrato, se utilizó una concentración inicial de 10^5 a 10^7 esporas/g de material. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo (24, 48, 72 hs), determinándose proteína por el método Kjendahl, con el fin de seleccionar el tiempo de fermentación mínimo para una máxima producción de energía. De acuerdo a las condiciones seleccionadas en la primera etapa. Se realizó la segunda, que consistió en la cinética de fermentación mediante el sistema de régimen estacionario con capacidad de 200 g, en donde se mantuvo constante la temperatura, humedad y aireación. La tercera etapa consistió en el análisis químico proximal, determinación del perfil de ácidos grasos, de aminoácidos y digestibilidad *in vitro* del producto final de la fermentación. Las condiciones óptimas que se obtuvieron para el desarrollo de la fermentación fueron las siguientes: 1) Tamaño de partícula: 0.3-0.6 mm. 2) Tratamiento al sustrato: un remojo con agua acidulada de 16 hs y un posterior cocido a 90°C por 30 min. 3) Temperatura de incubación: 35°C 4) Humedad inicial del sustrato: 80-85%.

Con el sistema diseñado se logró un adecuado desarrollo de *Rhizopus oligosporus* a las 72 hs con aumento de proteínas de 13.1 hasta 28.3%, así como el contenido de grasa y de minerales debido al consumo de carbohidratos y fibra cruda por el hongo. En cuanto a la grasa, *R. oligosporus* mostró preferencia por el ácido linoléico y el linolénico como fuente de energía, sintetizando oléico y araquidíco. En relación al perfil de aminoácidos, se observaron disminuciones de 11.2 a 9.7% en leucina, de 6.0 a 3.7 en arginina, ácido glutámico de 20.1 a 19.2 y aumentos de 2.6 a 3.8 en histidina y de 8.5 a 9.4 en ácido aspártico. Los cambios en la digestibilidad *in vitro* de la proteína aumentó de 51% a 86%.

ABSTRACT.

A solid-state fermentation system was implemented for grain pearl millet (*Pennisetum americanum*) in order to improve its nutritive value, using *Rhizopus oligosporus* for fermentation. The investigation was carried out in 3 stages: a) selection of parameters of the fermentation, b) solid-state fermentation and c) chemical analysis. The best conditions for fermentation were: particle size 0.3-0.6 mm, pretreatment soaked-bolled, temperature of incubation 35°C, moisture content 80-85%. A significant growth of *Rhizopus oligosporus* was obtained at 72 hours of fermentation. An increase of proteins content (13.1% to 28.3%) and of fat and ash was obtained, due to the use of carbohydrates and crude fibre by the fungus. *Rhizopus oligosporus* utilized linoleic acid and linolenic acid and produced oleic acid and arachidic acid. Amino acid composition, was not affected after 72 hours of fermentation. The levels of leucine, arginine, glutamic acid decreased and small increases in histidine, aspartic acid were found. The changes in the protein digestibility (*in vitro*) increased from 51% to 86%.

I. INTRODUCCION:

En México una de las 15 causas principales de mortalidad, es la deficiencia nutricional, agravándose en población de menor edad ocupando entre el cuarto y sexto lugar en importancia (INEGI 1991). El problema se intensifica en las áreas rurales y urbanas de bajos recursos. Esta consecuencia es debida a que en la actualidad la producción de alimentos para el consumo humano tienen costos de producción elevados, específicamente a lo que se refiere a productos utilizados como fuentes de proteínas. Por tal razón la población de bajos recursos económicos, ingiere cantidades insuficientes de proteínas de alto valor biológico, teniendo una mayor disponibilidad de carbohidratos, especialmente en forma de almidones, entre los que se encuentran los cereales, que son consumidos en forma de pan, sopas, tortillas y galletas, entre otros. Mientras que los países industrializados destinan gran parte de los cereales y leguminosas a la producción de alimentos balanceados para ser transformados a productos de origen animal con diversos grados de eficiencia. Las fuentes de almidones pudieran ser vehículo adecuado para mejorar el balance calórico-proteico en la alimentación, mediante su conversión a proteína por medio de procesos de fermentación (Alvarez 1990, Bressani y Elias 1968).

Las proteínas pueden provenir de fuentes tradicionales o bien de nuevas fuentes de uso no convencional. Se ha demostrado ya la eficiencia de algunas de estas últimas como fuentes de proteínas de alto valor biológico para el consumo humano y esto significa la apertura de nuevos horizontes en la lucha contra la deficiencia proteínica (Viteri y Alvarado 1970). Otra de las características de las fuentes no convencionales es su rapidez de duplicación de masa en comparación con la velocidad de crecimiento de organismos superiores y en donde toda la biomasa puede ser aprovechada. Un ejemplo es la fermentación en sustrato sólido, proceso natural cuyo origen está vinculado con la historia del hombre, y que ha sido considerado como una alternativa favorable para la producción de nuevas fuentes de proteínas, debido a que se puede lograr el incremento en el contenido proteico de sustratos ricos en almidón (Alvarez 1990, Cannel y Moo-Young 1980, González y col. 1989, Peñaloza 1981).

Existen alimentos en muchas partes del mundo que dependen de las fermentaciones sólidas y que son componentes importantes en la dieta,

utilizándose en algunos casos como fuentes de proteínas, calorías y algunas vitaminas, estando al alcance de personas de bajo recursos económicos (Beauchat 1984, Hesseltine 1981, Van Veen y Steinkrau, 1970). Mientras que en nuestro país no existen estos productos alimenticios, que pudieran contribuir a resolver los problemas de desnutrición para dicha población.

Considerando la importancia del mijo perla al proveer alimento para millones de habitantes en los trópicos semiáridos del mundo, el futuro como alimento humano y animal es promisorio. Al respecto la cantidad de proteína, calidad, biodisponibilidad de nutrientes y los cambios que se llevan en el proceso son aspectos importantes especialmente para los niños de esas regiones, por lo que se hace necesario para su aprovechamiento la identificación de productos alimenticios tradicionales o dietas que tengan más nutrientes disponibles que otros productos hechos con los mismos ingredientes y la evaluación de la calidad de los productos preparados, así como su aceptación.

II.- HIPOTESIS:

Mediante la fermentación en estado sólido del mijo perla por *Rhizopus oligosporus*, se podrá obtener un producto con mejor cantidad y calidad de proteína que podría usarse y/o añadirse en la elaboración de algunos alimentos de consumo humano.

III.- OBJETIVOS:

a) General:

- Establecer el proceso de fermentación en estado sólido del grano del mijo perla, tendiente a obtener un producto con mayor contenido de proteína para su uso como alimento humano.

b) Especificos:

- Determinar las condiciones óptimas de fermentación en estado sólido de *Rhizopus oligosporus* para lograr un máximo contenido de proteína.
- Determinar la composición química y nutricional del producto obtenido por la fermentación.
- Determinar la calidad de la proteína producida.

IV.- REVISION DE LITERATURA:

1.- Mijo perla:

a) Generalidades:

El mijo perla es una gramínea originaria del occidente tropical del Africa, cultivada posteriormente en la parte central y este de Africa, así como en la India (Wesche y col. 1991).

El mijo perla pertenece a la familia Graminaea, subfamilia Panicoideae y Tribu Paniceae. Es de hojas planas, largas y puntiagudas, con flores en panojas terminales y semillas pequeñas redondas de color blanco amarillento. La semillas maduran aproximadamente en 40 días después de la polinización; éstas varían en tamaño y en el número promedio de semillas por kg, que es aproximadamente de 200,000 (Maiti y López 1986). Este cultivo se siembra en las regiones del trópico semiárido del mundo donde prevalecen temperaturas medias anuales entre los 18 y 28°C, desarrollándose en una agricultura de temporal (Maiti y López 1989, Sánchez 1978) con poca precipitación. Es capaz de enfrentarse a condiciones agroclimáticas adversas (Subramanian y col. 1986). Al hacer un análisis de los resultados de las investigaciones a nivel mundial, éstos indican que el mijo perla prevalece en zonas áridas y semiáridas del mundo, en suelos pobres y en condiciones adversas, como son la alta evapotranspiración con sequías severas, altas temperaturas y precipitaciones en un rango de 200 a 600 mm anuales (Maiti y López 1986).

Existen lugares en donde le dedican amplias superficies de cultivo, en los que se incluyen las regiones de Etiopía, Kenya, Lesotho, Somalia, Tanzania, Uganda y en algunos estados de la India en donde por ser el cereal más resistente a la sequía ocupa el cuarto lugar en la producción de cereales (Opuku y col 1981, Sánchez 1978).

La FAO (1976) reportó que el mijo perla se cultivó en Africa en una extensión de 16 millones de hectáreas, en Asia 53 millones de hectáreas, mientras que en Argentina y Colombia fueron los únicos países de Sudamérica en donde se cultivaron 24,000 hectáreas. Su introducción como cultivo en las zonas semiáridas de América es muy reciente. Estudios realizados en el Noreste semiárido de México, en donde se obtuvieron altos

rendimientos, indican que el mijo perla es un cultivo con potencial agronómico y alimenticio.

El mijo perla produce semillas fácilmente y aún los cultivos forrajeros retienen o reducen ligeramente la capacidad de producir semillas. Los rendimientos de granos del mijo perla que se han obtenido van desde los 500 a los 3,000 kg/ha dependiendo de la variedad. En México se han obtenido rendimientos de 2,000-3,000 kg/ha en algunas variedades (Maiti y López 1986).

Debido a la situación que presentan las zonas temporaleras de escasa precipitación, donde predominan la agricultura de subsistencia, como es el caso de la zona árida del sur de Tamaulipas, existe una crítica situación de baja producción de alimentos y por consecuencia un bajo nivel de ingreso.

El mijo perla es un cultivo que se presenta como una alternativa importante, debido a sus características agronómicas y alimenticias ya que se puede incorporar a nuevas áreas de producción agrícola en las regiones áridas de México.

b) Utilización:

El mijo perla es un cereal importante utilizado como alimento de uso común. Contribuyen en la dieta como fuentes de proteínas, calorías, y minerales esenciales en las poblaciones de Asia, Africa e India principalmente, en donde cerca del 85% de la producción es usada para consumo humano. (Bailey y Sumrell 1980, Dhankner y Chauhan 1987, Khetarpaul y Chauhan 1990, Mahajan y Chauhan 1988, Opuku y col. 1981 Subramanian y col. 1986), en forma de tortillas, pan, galletas y productos de pasta (Bookwalter y col. 1987, Subramanian y col. 1986).

El mijo perla en la India es consumido en diversas formas, dependiendo del gusto y preferencias culturales de la gente (Mahajan y Chauhan 1988, Subramanian y col. 1986). Elaboran un pan a base de mijo perla al que llaman roti o chapati (Subramanian y col.1986). El rabadi es un alimento fermentado tradicional consumido regularmente por la gente del noreste de la India, preparado con harina de mijo entero mezclado con mantequilla, fermentándose entre 35 y 45°C por un período de 4 a 6 hs (Dhankner y Chauhan 1987).

El mijo perla es uno de los cultivos más extensamente cosechado en Nigeria y en las regiones de Savannah en el sur del Sahara. Es usado como alimento en forma de cereal y en la producción de cerveza (Opuku y col. 1981).

Olanjuni y col. (1982) elaboraron galletas y pan utilizando mezclas de harina de trigo 45% y con un 10% de harina de mijo perla. Además de los usos del mijo perla como alimento directo para el humano, algunos tipos de mijo perla son cultivos anuales de rápido crecimiento que pueden ser utilizados como cosecha de emergencia para heno, forraje, y grano (Maiti y López 1986, Cuevas, 1992).

Considerando la importancia del mijo perla como alimento para millones de habitantes en los trópicos semiáridos del mundo, es necesario valorar el aspecto nutricional en la utilización del grano como alimento. A este respecto la cantidad y calidad de la proteína, así como la disponibilidad de nutrientes y los cambios que se llevan a cabo durante el proceso de la elaboración del alimento, son factores de estudio de suma importancia. Por lo anterior, el establecer procesos con el fin de elevar el valor nutricional del grano, sería de gran beneficio para su aceptación en el país.

c) Composición Química:

El mijo perla es una fuente de proteína (8-20%) que también proporciona energía. La energía la almacena en la forma de almidón, el cual es el principal carbohidrato encontrado en este grano variando en el rango de 63-79%. En el sorgo el rango es de 56 a 75%. Además de lo anterior, el mijo perla contiene más grasa que el sorgo, variando de 4.1 a 6.4% en diferentes variedades (Maiti y López 1986).

Subramain y col. (1986) analizaron 20 variedades de mijo perla donde obtuvieron un rango de 8.6 a 15.6% de proteína cruda, 66.6% de almidón, 26.4% de amilosa, un contenido de azúcares solubles de 2.0%, que es relativamente bajo, entre los que encontró sacarosa, estaquiosa y rafinosa, así como 4.6% de grasa que, comparándola con el sorgo y trigo, el contenido es alto.

Por otra parte Dhillon y col. (1982) estudiaron siete variedades de mijo perla de alto rendimiento, donde obtuvieron un porcentaje en proteína del 10.20 a 13.5%, un contenido de grasa de 5.9-8.2%, de azúcares 188-239 mg de

sacarosa/10 g. de harina y 273-308 mg de maltosa/10 g. de harina. Así como también fraccionaron la proteína, encontraron de 10.09-19.19% de albúmina, globulina 10.0-13.98%, prolamina 30.71-33.51% y glutelina 30.7-33.16% de la proteína total.

Nwasike y col. (1979) separaron en cinco fracciones la proteína del mijo perla, encontraron que la distribución de proteínas entre las cinco fracciones se asemeja a la establecida en el maíz.

Singh y col. (1982) y Cuevas (1992), cuantificaron el contenido de ácidos grasos en el mijo perla, donde obtuvieron de 10.5 a 28.0% de ácido palmítico, esteárico de 0.75 a 9.92%, oléico de 14 a 40%, linoléico de 20.5 a 52.5% y linolénico de 0.3 a 6.0% .

Wesche y col. (1991) estudiaron 15 variedades de mijo perla a las cuales determinaron el contenido de almidón, donde obtuvieron concentraciones en un intervalo de 54.3-64.4%, siendo similar al que presenta el trigo y la avena. En el contenido de amilosa encontraron una variación de 12.1 a 29% y de amilopectina de 71 a 87.9% siendo similar en 13 de las 15 variedades estudiadas.

Okoh y col. (1985). Separaron la proteína de siete variedades de mijo perla en cinco fracciones, encontrando la composición de aminoácidos de las cinco fracciones idéntica en todas las variedades a pesar de algunas diferencias en el contenido de nitrógeno. La prolamina constituye gran parte (40%) del nitrógeno total para todo el mijo perla.

La digestibilidad de la proteína del mijo perla comparada con otros alimentos es baja (Dhankner y Chauhan 1987). La presencia de compuestos antinutricionales como ácido fítico y polifenoles en algunas variedades de mijo perla se han detectado en cantidades considerables; se tiene el conocimiento que en cierta cantidad influyen en la digestibilidad de las proteínas, carbohidratos y en el aprovechamiento de los minerales presentes en el mijo perla (Khetarpaul y Chauhan 1990).

Wesche y col. (1991) al estudiar 15 variedades de mijo perla, encontraron compuestos fenólicos del tipo de hidroxilos, fenólicos y cumarinas, el contenido de fenoles varió de 39.4 a 337.8 mg de ácido tánico y el de taninos condensados de 1.7 a 13.0 mg catequina; estos rangos están entre los encontrados en avena y trigo. En algunas variedades encontraron un alto contenido de compuestos fenólicos lo que podría ocasionar que la proteína presente no esté nutricionalmente disponible.

Cuevas-Hernández (1992) comparó el valor nutricional del grano de mijo perla con el maíz y el sorgo. Encontró que el mijo perla tiene más proteína y ácidos grasos que el maíz y el sorgo. El ácido más abundante que encontró fue el linoléico; entre los aminoácidos más abundantes están la leucina, fenilalanina y el ácido glutámico, mientras que la tirosina se encontró en menor cantidad.

Como se puede apreciar existen compuestos que limitan el aprovechamiento de los nutrientes esenciales, por lo que es necesario no solamente evaluar el contenido y composición, sino también la calidad y la disponibilidad de los nutrientes. Se tiene escasa información con respecto a la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes cuando estos son consumidos sobre todo por los humanos, siendo de importancia el desarrollar procesos que mejoren el valor nutricional y reduzcan los compuestos que limitan el aprovechamiento de los nutrimentos esenciales.

d) Procesos del mijo perla para mejorar el valor nutricional.

La germinación y la fermentación de los granos del mijo perla son métodos efectivos para mejorar su valor nutricional, estos procesos reducen los niveles de ácido fítico y polifenoles, obteniéndose una mejor digestibilidad de la proteína y del almidón presentes en el grano alimenticio (Dhankner y Chauhan 1987, Khetarpaul y Chauhan 1990).

Dhankher y Chauhan (1987) estudiaron el efecto de la temperatura (35, 40, 45 y 50°C) y el período de la fermentación (3, 6, 9 hs) en la digestibilidad de la proteína y del almidón del rabadi. Al incrementar el tiempo de la fermentación se obtiene una mejor digestibilidad de la proteína y del almidón en todas las temperaturas. El máximo incremento en la digestibilidad de la proteína (51%) y del almidón (58%) ocurre a los 45°C después de nueve horas de fermentación.

Khetarpaul y Chauhan (1990) utilizaron la germinación y la fermentación (con levaduras y bacterias) del mijo perla para obtener su efecto en el contenido de ácido fítico y polifenoles. La germinación del mijo perla a 30°C por 24 hs reduce el contenido de ácido fítico pero no la concentración de polifenoles. La fermentación con *Sacharomyces diastaticus* y *Lactobacillus fermentum* a 30°C por 72 hs reducen los contenidos de polifenoles en el grano germinado.

Opuku y col. (1981) germinaron los granos de mijo perla a 45°C por 48 hs para la obtención de un malteado, al cual se le realizó un análisis de vitaminas y compuestos antinutricionales para determinar su valor nutricional. Estos investigadores encontraron que los niveles de vitaminas y proteína son más altos en el malteado que en los granos, los niveles de lípidos, fitatos y oxalatos se reducen en el malteado.

Subramanian y col. (1986) estudiaron la influencia de las características físicas (capacidad que tiene el grano y la harina del mijo perla de esponjarse, y su fracción soluble en agua) y químicas (proteína, almidón, amilosa, azúcares y grasas) en la calidad del roti. De 20 variedades estudiadas, 16 indican que las características físicas se deben al contenido de amilosa, azúcar, grasa y ceniza, asociadas a la influencia de la calidad sensorial del roti.

Bailey (1980) preparó un concentrado proteico a base de mijo perla obteniendo el 80% de la proteína; el concentrado presentó esencialmente los aminoácidos de la proteína original de la harina del grano. Por lo que propuso que el concentrado proteico pudiera ser utilizado como ingrediente proteico en la elaboración de alimentos.

En la utilización del mijo perla con un contenido de compuestos antinutricionales que limiten la digestibilidad de la proteína, almidón y el aprovechamiento de minerales, la fermentación en estado sólido se presenta como una alternativa para mejorar el valor nutricional del mijo perla. La fermentación en estado sólido presenta perspectivas halagadoras para la obtención de ingredientes o productos alimenticios de bajo costo.

2. Fermentaciones en estado sólido:

a) Generalidades:

Las fermentaciones sólidas ocurren espontáneamente en la naturaleza. La evidencia más común es el enmohecimiento del pan, frutas, vegetales y parte del biodeterioro de alimentos sólidos.

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos texturizados y porosos sin la presencia de agua libre. El agua es necesaria, pero se encuentra en forma absorbida dentro de la matriz sólida (Cabrero 1987, Cannel y Moo-young

1980, Hesseltine 1972, Paredes-López y Harry 1988, Nandakumar y col. 1994). La mayoría del sustrato está inicialmente inaccesible debido a la heterogeneidad del medio de cultivo, su disponibilidad puede aumentar, disminuir o permanecer constante durante la fermentación (González y col. 1989).

La fermentación en sustrato sólido con hongos ha sido empleada desde hace mucho tiempo en la preparación de alimentos orientales. El desarrollo de la fermentación en sustrato sólido a través de la historia se presenta en el cuadro 1. Sin embargo, a pesar de su uso tan extendido, el conocimiento de la fisiología y microbiología de estos procesos fermentativos no habían sido estudiados y aún se desconocen muchos aspectos (Alvarez 1990, Cabrero 1987, Grant y col. 1978). El proceso de fermentación en estado sólido es usado en escala comercial para la producción de diferentes alimentos fermentados, obtención de enzimas, metabolitos secundarios y para la bioconversión de desperdicios orgánicos en productos útiles (Pandey 1992, Ramakrishna y col. 1994).

Cuadro 1.- Historia y desarrollo de la fermentación en estado sólido.

PERIODO	DESARROLLO
2600 a.C.	Pan realizado por los egipcios
a. C. en Asia	Quesos hechos con <i>Penicillium roqueforti</i>
2500 a.C.	Fermentación de pescado/preservación con azúcar, sal, almidón etc.
Siglo séptimo	Proceso del koji de China o Japon por budistas.
Siglo diezyochoavo	Obtención de vinagre.
1900-1920	Enzimas fungales.
1920-1940	Enzimas fungales, ac. glucónico, fermentador rotatorio, ac. cítrico.
1940-1950	Desarrollo de la fermentación industrial, producción de penicilina.
1950-1960	Transformación de esteroides por cultivos fungales.
1960-1980	Enriquecimiento proteico.
1980- a la fecha	Obtención de otros productos, ácidos, alcoholes hormonas, etc.

Fuente: Pandey 1992.

Las fermentaciones sólidas presentan algunas ventajas sobre las fermentaciones líquidas tradicionales (Cuadro 2), la mayoría de estas ventajas están asociadas con el bajo contenido de agua requerido en este tipo de fermentaciones (Alvarez 1990, Cabrero 1987, Hesseltine 1972).

Cuadro 2.- Ventajas y desventajas de la fermentación sólida con respecto a la fermentación líquida.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
UTILIZA SUSTRATOS SIMPLES	TIPO DE MICROORGANISMO LIMITADO, SOLO LOS QUE PUEDEN CRECER EN CONDICIONES DE BAJA HUMEDAD.
OCUPA MENOR ESPACIO, NO NECESITA EQUIPO COMPLEJO.	HETEROGENIDAD DEL MEDIO
CRECIMIENTO PARECIDO AL NATURAL	PUEDE REQUERIRSE CANTIDADES RELATIVAMENTE MAYORES DE INOCULO.
DISMINUYE CONTAMINACION POR BACTERIAS DEBIDO A LA BAJA HUMEDAD.	
RENDIMIENTOS ALTOS	FERMENTACION DE MATERIALES EN GRAN ESCALA PRESENTA PROBLEMAS DE CONTROL DE NUTRIENTES CONCENTRADOS EN EL SUSTRATO, TEMPERATURA, pH, HUMEDAD.
EL PRODUCTO DESEADO PUEDE SER EXTRAIDO DIRECTAMENTE DEL REACTOR	
NO HAY LIQUIDO RESIDUAL	
LAS ESPORAS SON USADAS DIRECTAMENTE EN LA FERMENTACION SIN EL USO DE TANQUES DE CULTIVO O INOCULO PREFORMADO	
PRODUCTO FINAL SE INCORPORA DIRECTAMENTE A LA ALIMENTACION	EN ALGUNOS CASOS EL SUSTRATO TIENE QUE SER PRETRATADO PARA SU MAXIMO APROVECHAMIENTO

FUENTE: HESSELTINE, 1972.

b) Tipos de fermentación en estado sólido:

La fermentación en estado sólido se divide en dos grupos (Pandey 1991):

b.1.- Fermentación sólida estática sin agitación:

Los materiales inoculados permanecen en reposo durante la fermentación, tradicionalmente se ha aplicado en la maduración de quesos, en el proceso del koji (Beauchat, 1984; Steinkraus 1983; Wood y Young 1975) en la elaboración del tempe así como para el enriquecimiento proteico de materiales con alto contenido de almidón.

b.2.- Fermentación sólida con agitación continua u ocasional:

Este grupo a su vez se subdivide en:

Fermentación con agitación ocasional sin aireación.

Fermentación con agitación lenta continua sin aireación.

Fermentación con agitación ocasional con aireación.

Fermentación con agitación continua y con aireación.

En este grupo se incluye cualquier sistema con remoción o movimiento de los materiales durante la fermentación, usualmente con el fin de mejorar el intercambio gaseoso y el control de la temperatura. Se han usado tambores rotatorios para la producción del koji (Beauchat, 1974); mezcladoras para el enriquecimiento proteico a través del crecimiento de micelio con varios materiales, así como en la degradación de desechos sólidos municipales y agrícolas, amontonándolos y removiéndolos periódicamente.

La práctica de la fermentación en estado sólido no necesita de equipos complejos y por eso puede ser aplicada como una tecnología de bajo costo. Así se pueden ahorrar en el costo de producción de alimentos ricos en proteínas.

En nuestro país existen pocas investigaciones acerca de la producción de biomasa mediante fermentaciones en estado sólido utilizando hongos filamentosos sobre diversos sustratos, al respecto deben señalarse trabajos realizados con harina de yuca, desechos de la industrialización de la piña, tuna cardona, residuos de bagazo de naranja, vaina de mezquite y sorgo, encaminados a la obtención de productos alimenticios con un contenido proteínico de alta calidad, para ser utilizados en la elaboración de alimentos balanceados para animales (González y col. 1984, 1987, 1989).

c) Parámetros de la fermentación sólida:

Los parámetros de importancia son: microorganismo, humedad, concentración de inóculo, temperatura, pH, agitación, aireación, forma y tamaño de partículas.

Microorganismos.- Basado en el tipo de microorganismos presentes en la fermentación en estado sólido se dividen los microorganismos en dos grupos principales: Natural (silvestres o nativos), cuyo ejemplos son el ensilaje y la composta que utilizan microflora natural. Puro (individual o mezclado) son generalmente usados a nivel industrial que requiere de un control y la utilización de un sustrato seleccionado (Pandey 1992).

En las fermentaciones sólidas, la selección de un microorganismo adecuado, es importante para su desarrollo. Diversos grupos de microorganismos pueden crecer en sustrato sólido, sin embargo el bajo contenido de agua en este tipo de fermentaciones, favorecen para el desarrollo de los hongos. Los hongos crecen en el medio sólido produciendo proteína a partir del consumo del sustrato, adicionado con fuentes inorgánicas de nitrógeno y otros minerales. La ventaja de utilizar los hongos para producción de biomasa para el consumo animal y humano, es el bajo contenido que poseen en ácidos nucleicos al compararlos con las bacterias y con las levaduras (Cuadro 3). Dentro de este grupo, los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus* se han usado extensamente por su capacidad de síntesis de amilasas y proteasas. Existen pocas especies de estos géneros que en condiciones específicas producen micotoxinas (Hesseltine 1981, Mohyuddin y Trilok 1977, Peñaloza 1981, Sugama y Okazaki 1979).

Cuadro 3.- Análisis Químico de diferentes tipos de microorganismos (base seca).

COMPONENTES %	HONGOS	BACTERIAS	LEVADURAS	ALGAS
PROTEINAS	10 a 50	40 a 7	40 a 45	10 a 60
GRASAS	2 a 7	10 a 13	2 a 6	74 a 80
AC. NUCLEICOS	1 a 3	13 a 34	4 a 10	1 a 5

FUENTE: Aiba y col. citados por González 1989.

Diversas especies de *Rhizopus* son consideradas de interés para la industria de alimentos. Han sido utilizadas en fermentaciones sólidas especialmente en Asia (China, Korea, Japón, Indonesia, Malasia, Singapur

etc.) para la preparación de muchos alimentos fermentados. *Rhizopus* no solo mejora la digestibilidad y el contenido de proteína, sino que también previene la formación de sustancias tóxicas como aflatoxinas (Soccol y col. 1994). *Rhizopus oligosporus* ha sido utilizado para enriquecimiento de proteína y estudios de cinéticas de crecimiento en fermentaciones en sustrato sólido (Pandey 1992), su actividad lipolítica es mayor que su actividad aminolítica y proteolítica, pero se conoce que presenta proteasas que rompen las proteínas de los granos (Alvarez 1990, Cannel y Moo-Young 1980, González y col 1984, Jurus y Sundberg 1976, Wang y col. 1975).

Humedad.- El nivel de agua se ajusta según los requerimientos de los microorganismos (Cannel y Moo-Young 1980, Peñaloza 1981). Cuando el contenido de agua es muy alto los espacios vacíos entre las partículas se llenan de agua desalojando al aire y provocando disminución del oxígeno en la masa, y además podría estimular la contaminación bacteriana (Alvarez 1990, Cabrero 1987, Peñaloza 1981). Por otro lado, si el contenido de agua es bajo el crecimiento de los hongos se inhibe.

En la elaboración de alimentos fermentados, existen diferentes rangos de humedad para su adecuada obtención (Beauchat 1984, Peñaloza 1981).

Cantidad de inóculo.- Usualmente para asegurar un rápido crecimiento, se requiere una alta concentración de esporas en la inoculación, así como para competir con otros microorganismos por el sustrato. La cantidad óptima de inoculación varía de 10^5 a 10^7 esporas/g de material seco (Peñaloza 1981).

Temperatura.- Los hongos pueden crecer en un amplio rango de temperatura entre los 20 y 45°C, cuya influencia tiene efectos complejos. Altas temperaturas inhiben la germinación de esporas pero no afectan significativamente el desarrollo del micelio. Para la producción de enzimas y micotoxinas la temperatura ideal varía entre 28 y 35°C. El micelio de *A. niger* se desarrolla en los 35 y 45°C, pero se consigue un mayor rendimiento en los 35 y 40°C (Cabrero 1987, Finger y col. 1976, Peñaloza 1981).

pH.- Los hongos crecen a pH ácidos entre 3.0 y 4.5; el efecto del pH inicial en las fermentaciones sólidas no está bien establecido. Durante la fermentación el pH tiende a disminuir dependiendo de la cantidad de urea y sales de amonio que intervengan en la fermentación (Peñaloza 1981).

Aireación y agitación.- Son parámetros claves en la transferencia de masa dentro de las partículas. La transferencia de oxígeno entre las partículas depende de los espacios libres, de la aireación y la agitación o mezclado (Cannel y Moo-Young 1980, González y col. 1989, Hesseltine 1972, Peñaloza 1981). El flujo de aireación sobre la producción de biomasa tiene un comportamiento tal que es óptimo a flujos volumétricos de aire bajos, suficientes para favorecer la remoción del bióxido de carbono producido por la respiración y la transferencia de masa intrapartícula, al hacer más accesible el oxígeno disuelto en agua procurando condiciones cercanas a la isothermicidad alrededor de este punto, la eficiencia disminuye. Al reducirse el flujo de aire por debajo de este punto, se restringe el suministro de aire y el hongo tiende a la esporulación, a flujos mayores del óptimo la producción de biomasa disminuye por dificultarse la fijación de la spora al sustrato al existir perturbaciones o pequeñas turbulencias en el fermentador (González y col. 1989, González y col. 1990). En las fermentaciones estáticas la aireación desempeña las funciones de agitación, el aumento en el flujo del aire mejora el desarrollo del micelio y el consumo del sustrato (Barrios y Anaya 1987, Silman 1980).

Forma y tamaño de las partículas.- En las reacciones bioquímicas de las fermentaciones sólidas el oxígeno es esencial, y para ello el oxígeno debe de difundirse en la capa acuosa que rodea a la partícula sólida o penetrar en los poros del sustrato. En consecuencia, el tamaño y la forma de las partículas determinan el grado de porosidad (Finger y col. 1976). El tamaño de partícula óptimo varía dependiendo del sustrato, del microorganismo a utilizar y de la cantidad de oxígeno presente en el medio. Las partículas pequeñas tienen la ventaja de poseer una mayor relación de superficie a volumen. Esta relación tiene una gran influencia sobre la transferencia de masa inter e intrapartícula (González y col. 1989, Moctezuma y col. 1986).

d) Aplicación de las fermentaciones solidas en la industria de alimentos:

Los alimentos producidos por fermentaciones en estado sólido se pueden clasificar en seis categorías, en base a los métodos empleados y al tipo de producto obtenido (Paredes y Harry 1988):

- 1.- Alimentos producidos por fermentación por hongos seguidos por una adición de sal.
- 2.- Alimentos producidos utilizando bacterias.
- 3.- Alimentos producidos en dos períodos de fermentación, una fermentación ácido-láctica seguida por una fermentación fúngica en estado sólido.
- 4.- Alimentos producidos por fermentación alcohólica a partir de sustratos ricos en carbohidratos, usando levaduras y hongos.
- 5.- Productos alimenticios preparados a partir de masas fermentadas usando principalmente bacterias ácido-lácticas.
- 6.- Ingredientes para alimentos, pueden ser preparados usando fermentación en estado sólido.

Existen alimentos que dependen de las fermentaciones sólidas y que actualmente son producidos por grandes industrias, entre los cuales están el koji, miso, salsa de soya, tempe, sake, sufu, ontjom, bongkrek (Beauchat 1984, Hesseltine 1981, Van Veen y Steinkrau 1970). Así como la obtención de otros productos y la aplicación de otros procesos. Cada uno varía en el sustrato y el microorganismo utilizado como se puede observar en el cuadro 4.

Se han realizado valoraciones nutricionales de algunos de estos alimentos, obteniéndose buenos resultados en enriquecimiento específicos, así como un aumento de la digestibilidad y una aceptabilidad organoléptica alta. Por ejemplo, el tempe hecho a base de soya, no tiene el sabor típico de la soya (Van Veen y Steinkrau 1970).

El koji, se prepara con arroz cocido, arroz con soya, o soya con salvado de trigo. Los materiales se esterilizan, se distribuyen en bandejas, se inoculan con *Aspergillus oryzae* o *Rhizopus oligosporus*, y se deja fermentar por tres días a 25-30°C en condiciones aeróbicas (Beauchat 1984, Van Veen y Steinkrau 1970, Wood y Young 1975). El koji obtenido se usa como iniciador o intermediario en la fabricación de varios productos.

Salsa de soya.- La mezcla de soya con trigo tostado se fermenta como en el proceso anterior hasta obtener koji, luego se añade salmuera y se incuba anaeróticamente a 35-38°C por 1 a 3 meses, el líquido se separa y finalmente se refina (Beauchat 1984, Young y Wood 1974).

Miso.- Se obtiene por fermentación sólida anaeróbica de soya mezclada con arroz; como iniciador se usa el koji (Beauchat 1984, Wood y Young 1975).

Tempe.- Se prepara con soya y se inocula con esporas de *Rhizopus oligosporus*; la mezcla se distribuye en pequeñas porciones que se envuelven en hojas de banano y se fermentan durante 20 a 24 hs. El tempe es una pasta de sabor fresco y agradable que se consume ampliamente en Indonesia (Beauchat 1984, Van Veen y Steinkrau 1970, Wood y Young 1975).

Entre los sustratos mas utilizados en la elaboración de estos alimentos están la soya, el arroz y el trigo. No se encontró literatura en donde se mencione el mijo perla como sustrato para una fermentación sólida, En este trabajo se investigó la posibilidad de utilizar al mijo perla como sustrato en una fermentación sólida, con el fin de obtener un alimento rico en proteínas. En esta investigación se aplicaron en parte los fundamentos actuales que se aplican a los alimentos anteriormente mencionados.

Cuadro 4.- Microorganismos, sustratos y productos en el proceso de la fermentación en estado sólido.

MICROORGANISMO	SUSTRATO	PROCESO/PRODUCTO
<i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus niger</i>	ALMIDON RESIDUOS DE PLATANO MAIZ YUCA CASCARA DE CITRICOS	ENRIQUECIMIENTO PROTEICO. PROTEINA. KOJI, ETANOL. CINETICA DE CRECIMIENTO. ENRIQUECIMIENTO PROTEICO, CINETICAS DE CRECIMIENTO.
<i>Aspergillus oryzae</i>	ARROZ	ALCOHOL, ALDEHIDOS, CETONAS, KOJI, MISO.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	YUCA, SOYA	CINETICAS DE CRECIMIENTO, TEMPE
<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Trichoderma viridae</i>	GARBANZO YUCA SALVADO DE TRIGO	ALIMENTO PROTEICO. PROTEINA. PROTEINA, ENZIMAS.

FUENTE: PANDEY 1992.

V. MATERIALES Y METODOS:

1. Microorganismo y sustrato:

Se utilizó *Rhizopus oligosporus* cepa ATCC 22959 adquirida en la American Type Culture Collection en forma liofilizada, la cual fué propagada en Agar Papa Dextrosa (PDA) (Sigma, U.S.A.) en tubos de ensaye a 25°C por 5 días. Los cultivos se almacenaron a 4°C y se sembraron cada tres meses para su conservación.

Como sustrato para la fermentación se utilizó el grano de mijo perla (*Pennisetum americanum*), cosechado en la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., el cual se limpió y posteriormente se almacenó a 4°C en recipientes de plástico sellados herméticamente.

2. Producción de inóculo:

De los tubos de ensaye con la cepa de *Rhizopus oligosporus*, se sembró en matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad total; conteniendo 50 ml del medio de cultivo PDA, y se incubó a 35°C por cinco días, se le agregó agua destilada estéril y se agitó por 20 min, obteniéndose una suspensión. Se determinó la concentración de esporas al microscopio mediante una cámara Newbauer, obteniéndose una concentración de 1×10^6 esporas/ml.

3. Preparación y tratamiento del sustrato:

Se utilizaron granos triturados para el proceso de la fermentación. Para la obtención de los granos triturados, se molieron mediante un molino de discos con extremos lisos marca Wiley, utilizando mallas de 0.5, 1 y 2 mm. De esta manera se obtuvieron diferentes tamaños de partícula. Posteriormente se utilizó un sistema Rop-Tap como proceso de tamizado con diferentes mallas para obtener una homogeneización en el tamaño de las partículas. Se obtuvieron tres tamaños de partículas diferentes, (los cuales se tomaron como parámetros para evaluar la fermentación) I. El que pasa por malla 9 (2mm) y se retiene en la malla 14 (1.2 mm). II El que pasa por la malla 14 y se retiene en la malla 28 (0.6mm). III El que pasa por malla 28 y se retiene en la malla 48 (0.3 mm). (Figura 1).

4. Selección de los parámetros de fermentación:

Para la selección de las condiciones de fermentación se realizaron pruebas a nivel matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad total, en donde se tomaron las siguientes variables:

a) Tamaño de partícula del sustrato:

- 1.- 0.3 mm a 0.6 mm.
- 2.- 0.6 mm a 1.2 mm.
- 3.- 1.2 mm a 2.0 mm.

b) Tratamiento al sustrato:

- 1.- remojado.
- 2.- remojado-cocido.

Para la obtención del sustrato remojado y del cocido se realizó lo siguiente: los granos se remojaron durante 16 hs en tres veces su peso en agua acidificada con ácido láctico, a un pH 3.5 obteniéndose sustrato remojado.

Después del remojo se cocieron las partículas en 1.5 veces su peso húmedo de agua desionizada a 90-95°C durante 30 min. Se drenaron y se pusieron a enfriar, obteniéndose sustrato cocido.

c) Humedad inicial del sustrato. Se acondicionó cada tratamiento a una humedad de 70, 80 y 85%.

d) Temperatura de incubación. Se ensayaron tres temperaturas diferentes, 30, 35 y 40°C, para la incubación del microorganismo.

e) Tiempo de incubación. Se determinó mediante la observación del desarrollo del hongo hasta lograr el máximo crecimiento.

Para la determinación de los parámetros se utilizaron 20 g de sustrato en cada matraz, se inoculó con 0.2 ml de la suspensión de esporas y se incubó para efecto de la fermentación en una incubadora (felisa modelo 146-A) Visualmente se evaluó el mejor crecimiento de los tratamientos.

De los tratamientos donde se obtuvo desarrollo del hongo, se repitió el proceso por duplicado con las condiciones seleccionadas y se procedió a determinar el contenido de proteína cruda por el método Kjendhal a las 24, 48, 72 y 96 hs, para obtener el tiempo donde se alcanza el mayor contenido de proteína.

5. Cinética de fermentación en sustrato sólido:

Los resultados obtenidos en la etapa anterior permitieron seleccionar las condiciones de fermentación más favorables para alcanzar el mayor contenido de proteína, y con estas condiciones se procedió a la realización de la cinética de fermentación. La fermentación se realizó mediante el sistema de charolas de régimen estacionario o sistema de cubeta (Ward, 1989), modificación al sistema utilizado por Abdullah y col. en 1985, que es una fermentación en estado sólido sin agitación y con aireación. Se utilizó un recipiente de plástico de capacidad de 5 litros, tapadera autoclavable (figura 2) con un diámetro de 24 cm., el cual se divide a la mitad con una malla de plástico que sostiene a otra malla de acero inoxidable de # 45, que a su vez soporta al sustrato. En la parte inferior se colocó agua estéril acidulada pH 3.5. Un tubo de vidrio se colocó por debajo de la malla. Un total de 200 g de sustrato en peso húmedo, con un espesor de 2 cm fué empacado sobre la malla de acero inoxidable y se colocó en el fermentador; se inoculó con 5 ml de la suspensión de esporas. Los fermentadores ya empacados fueron colocados en una incubadora a 35°C, temperatura la cual se mantuvo constante. La aireación utilizada fué de 10 ml y se suministró mediante un compresor de tanque estacionario. El aire pasa a través de un filtro de membrana sartorius con superficie filtrante de 25 mm y con un tamaño de poro de 0.4 micras, la filtración se llevó a cabo como medida de esterilidad. Al salir el aire del filtro sale estéril y se satura en la solución estéril acidulada, posteriormente pasa sobre el lecho empacado manteniendo la humedad y la remoción de compuestos volátiles. La humedad relativa y la temperatura se monitoreó utilizando un higrómetro Cole-Palmer.

6. Tratamiento y análisis de la muestra:

Se realizaron muestreos directos a las 24, 48 y 72 hs para los análisis correspondientes. Los ensayos se realizaron por triplicado en diferentes fechas y los análisis se realizaron por duplicado.

7. Análisis Químico Proximal:

a) **Humedad.** Se determinó la humedad de la muestra directamente al muestreo por medio de la termobalanza, para la determinación se utilizaron

10 g y se colocaron en el plato de la termobalanza, y por desecación de la muestra mediante rayos infrarojos sobre la balanza se obtiene el porcentaje de humedad.

Para los análisis posteriores la muestra se secó hasta peso constante a 60°C, una vez seca se dejó enfriar en un desecador y se colocó en frascos perfectamente cerrados. Se guardó en refrigeración hasta su utilización.

b) **Proteína cruda.** Se utilizó el método de Kjendahl para la determinación del nitrógeno total. Para la digestión se utilizó ácido sulfúrico y un catalizador de selenio. En la destilación se empleó ácido bórico al 4% para recibir el destilado. Se realizó la titulación con solución valorada de HCl. La proteína cruda se calculó por multiplicación del nitrógeno total por el factor 6.25. Método 995.04 (AOAC. 1990).

c) **Extracto etéreo.** La extracción del extracto etéreo se realizó por el método de Golfisch, utilizando éter etílico como solvente, y se cuantificó por peso extraído. Método 920.39 (AOAC, 1990).

d) **Fibra cruda.** Se utilizó 1 a 2 g de muestra desgrasada, y se llevó a ebullición, primero con ácido sulfúrico 0.255 N y después con NaOH 0.313 N. La acidez se eliminó con lavados de agua destilada caliente. Posteriormente se incineró a 600°C, hasta peso constante. La pérdida en peso debido a la incineración corresponde a la fibra cruda. Método 7.077 (AOAC. 1990).

e) **Cenizas.** Se determinaron las cenizas por pérdida en peso de la muestra después de la incineración a 600°C toda la noche. Método 924.05 (AOAC. 1990).

8. Acidos grasos totales:

a) **Esterificación del aceite.** La grasa fué extraída con eter etílico y se agregó 1 g en un matraz bola, se adicionó 10 ml de metanol y 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitó vigorosamente hasta disolver la muestra. Posteriormente se procedió a reflujar a baño maría de 3-4 hs.

Se realizó la extracción de la muestra esterificada a través de la mezcla de cloroformo-agua. Se adicionó a un matraz de extracción, y se agregó 200 ml de agua destilada y 8 ml de cloroformo hasta completar 25 ml agitandose fuertemente. Se dejó reposar hasta que se separaron las fases cloroformo-muestra y agua. Se recuperó la fase inferior que corresponde a la de cloroformo-muestra, de este recuperado se tomó un microlitro para inyectar en el cromatógrafo de gases (Equipo Varian 3,700) y obtener el perfil de ácidos grasos.

b) Condiciones del cromatógrafo de gases para la obtención del perfil de ácidos grasos.

- Detector: Ionización de flama.
- Sensibilidad: 1×10^{11} .
- Columna: GP 10%, SP-2330 on 100/120 Chromosorb WAW 6'X1/8"SS).
- Temperatura de columna: 150 a 190°C con incrementos de 5-5°C.
- Inyector: un microlitro.
- Temperatura del inyector : 25°C .
- Presión de gas: 40 psi.
- Flujo de gas nitrógeno: 20 ml/min.
- Flujo de aire: 300 ml/min.
- Flujo de hidrógeno de 30 ml/min.
- Integrador Nelson Perking Elmer Modelo 1.020.
- Se corrió el perfil de ácidos grasos en el cromatógrafo de gases por 25 min.
- Se utilizaron estándar de ácidos grasos Sigma Chemical Co.

9. Determinación de la calidad de la proteína:

a) Análisis de aminoácidos.

La preparación de la muestra consistió en un deshidratación, molido, extracción de lípidos y determinación del contenido de proteína (Ashwort, 1987). La hidrólisis de la muestra se manejó con ácido clorhídrico sin ácido per fórmico e hidrólisis con oxidación en ácido per fórmico (Gehrke y col. 1987). La muestra fué separada por cromatografía en fase inversa, las condiciones del análisis fueron:

Columna: Ultraesphere ODS C18.

Eluyentes: Gradiente lineal en 30 min de:

a) Acetato de sodio 50 mmolar pII 6.8

b) Metanol R.A.

Flujo: 1.5 ml/min.

Detector: Fluorescencia.

b) Proteína digestible.

Se utilizó la solución enzimática de pepsina (Sigma) al 0.2% para la digestión, la solución enzimática fué precalentada a 42-45°C, se agregaron 150 ml a la muestra desgrasada, se puso a 45°C por 16 hs con agitación constante. Se filtró sobre papel Whatman # 2 y se lavó tres veces con agua

destilada caliente. Del residuo se determinó nitrógeno por el método Kjeldhal. Método 971.09 (AOAC, 1990),

$$\% \text{ de digestibilidad} = \frac{\text{proteína total} - \text{proteína no digerible}}{\text{proteína total}} \times 100$$

10. Análisis Estadísticos.

Se realizó análisis de varianza usando el diseño completamente al azar. Los promedios se separaron por la prueba de diferencia mínima significativa de Student. (Reyes-Castañeda 1980).

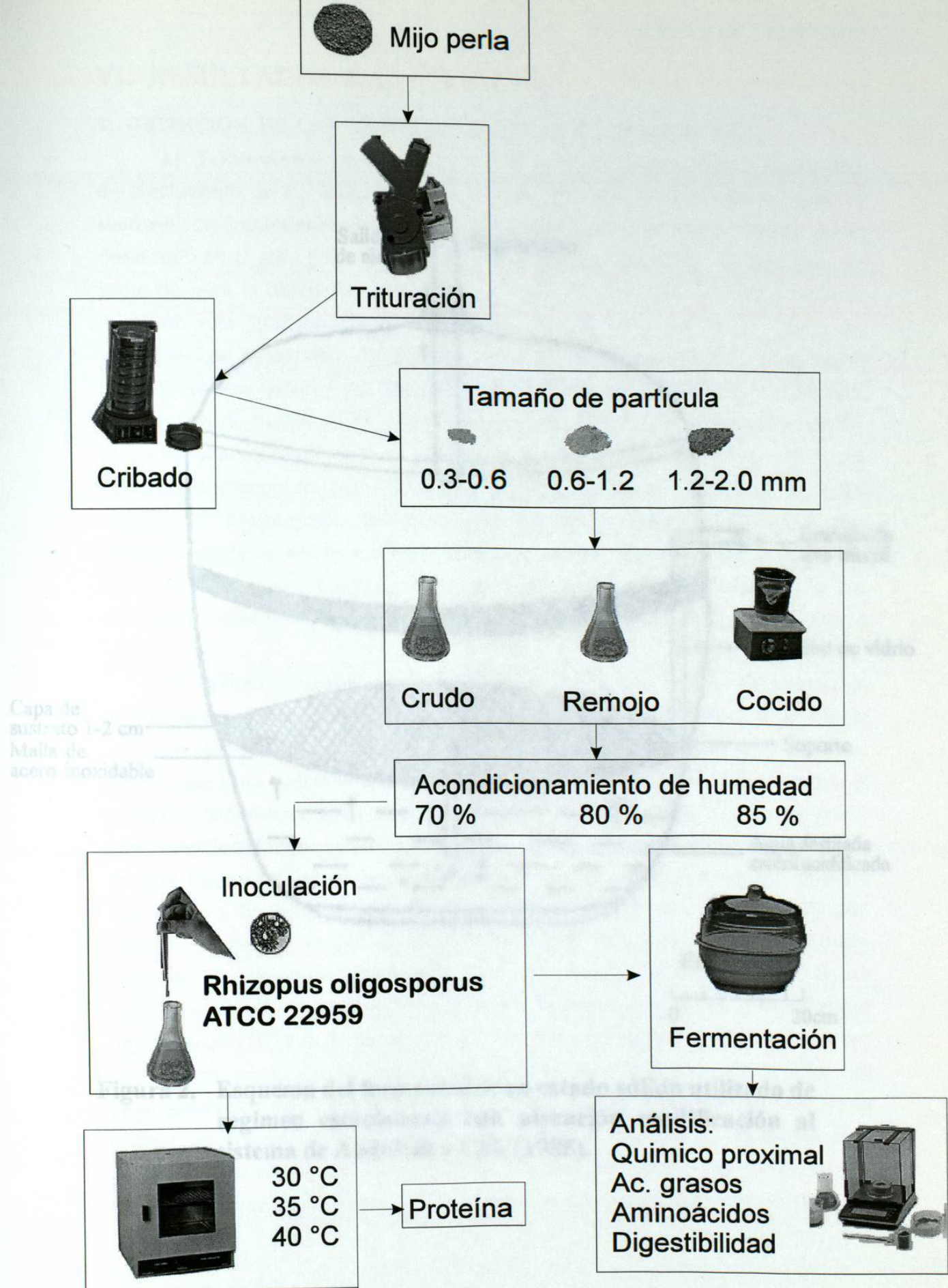


Figura 1.- Diagrama de flujo del proceso utilizado.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. OBTENCION DE LAS CONDICIONES DE LA FERMENTACION

a) Tratamiento del sustrato. Con el fin de determinar la capacidad de crecimiento de *R. oligosporus* en el sustrato se procedió a tratar el sustrato con tratamiento térmico. Debido a que el hongo no se desarrolló en el sustrato crudo, se agregó el agua que se requería para la obtención máxima de humedad, que era de 70% y solo se presentó una hidratación de 50% y en el cual se inoculó, no observándose desarrollo del hongo. Después de la aplicación de tratamientos físicos para hacer viables las partes para el hongo. En estudios de Soccol y col. (1964) se observó el crecimiento de 99 cepas de *R. oligosporus* en sustrato crudo, solo tres cepas presentaron un excelente desarrollo y que correspondían a las especies *R. oryzae* y *R. delenar*, mientras que la especie *R. oligosporus* no se desarrolló en el sustrato crudo, estableciendo un método para la obtención de sustrato estéril, y se hacen descripciones más detalladas sobre la obtención de sustrato estéril.

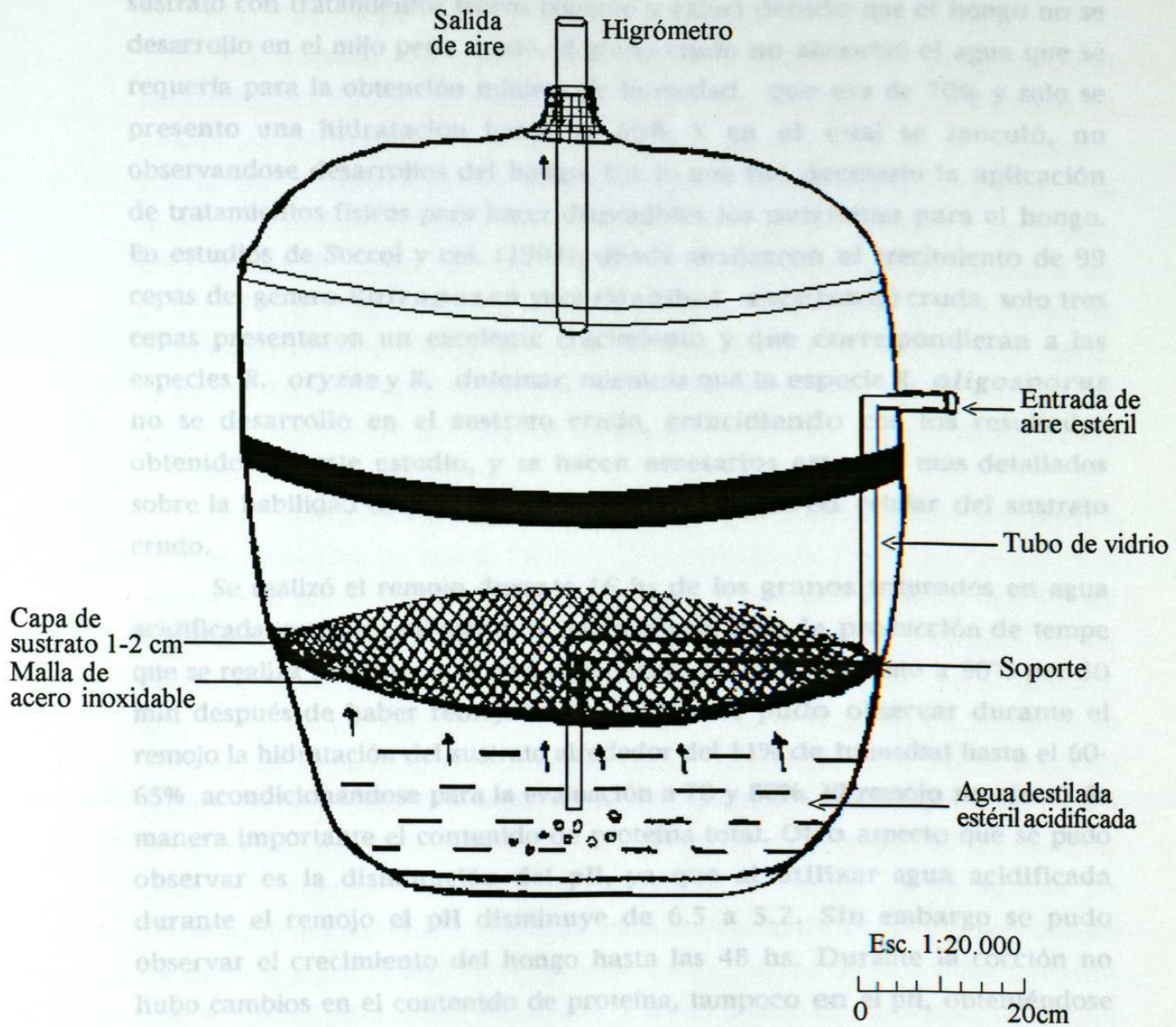


Figura 2. Esquema del fermentador en estado sólido utilizado de regimen estacionario con aireación modificación al sistema de Abdullah y Col. (1985).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION:

1. OBTENCION DE LAS CONDICIONES DE LA FERMENTACION:

a) **Tratamiento del sustrato.** Con el fin de determinar la capacidad de crecimiento de *R. oligosporus* en el mijo perla; se procedió a tratar el sustrato con tratamientos físicos (remojo y calor) debido que el hongo no se desarrollo en el mijo perla crudo. El grano crudo no absorbió el agua que se requería para la obtención mínima de humedad, que era de 70% y solo se presento una hidratación hasta un 56%. Y en el cual se inoculó, no observandose desarrollos del hongo. Por lo que fue necesario la aplicación de tratamientos físicos para hacer disponibles los nutrientes para el hongo. En estudios de Soccol y col. (1994), donde analizaron el crecimiento de 99 cepas del género *Rhizopus* en yuca (*Manihot esculenta*) cruda, solo tres cepas presentaron un excelente crecimiento y que correspondieran a las especies *R. oryzae* y *R. delemar*, mientras que la especie *R. oligosporus* no se desarrollo en el sustrato crudo, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio, y se hacen necesarios estudios mas detallados sobre la habilidad de las especies de penetrar la pared celular del sustrato crudo.

Se realizó el remojo durante 16 hs de los granos triturados en agua acidificada, este procedimiento se ha empleado para la producción de tempe que se realiza con soya; y el otro tratamiento fué el cocimiento a 90°C por 30 min después de haber remojado. Por lo que se pudo observar durante el remojo la hidratación del sustrato alrededor del 11% de humedad hasta el 60-65% acondicionandose para la evaluación a 70 y 80%. El remojo no afectó de manera importante el contenido de proteína total. Otro aspecto que se pudo observar es la disminución del pH, ya que al utilizar agua acidificada durante el remojo el pH disminuye de 6.5 a 5.2. Sin embargo se pudo observar el crecimiento del hongo hasta las 48 hs. Durante la cocción no hubo cambios en el contenido de proteína, tampoco en el pH, obteniéndose una humedad final de 85%. En este tratamiento de remojo-cocido se observó desarrollos a las 24 hs de incubación. El crecimiento observado fue principalmente en la superficie de la masa con una nula penetración de la misma, la cocción libera nutrientes lo que favoreció al hacerlos más disponibles para el microorganismo, ya que el hongo no es capaz de penetrar las paredes celulares. Por lo que se puede deducir que la cepa no

tiene la capacidad de penetrar la pared celular del grano, y que es necesario el cocimiento para romper la estructura del grano y lograr que los nutrientes esten disponibles para el desarrollo del microorganismo.

Se evitó la contaminación por otros microorganismos al adicionar el ácido láctico en el agua de remojo.

b) Efectos de las diferentes condiciones de cultivo.

b.1 Tamaño de partícula. El efecto de tamaño de partícula en el desarrollo del hongo, se pudo observar a manera que al incrementar el tamaño de partícula del sustrato, existe una *disminución en el desarrollo*, por lo que se obtuvo un mayor desarrollo en el tamaño 0.3-0.6 mm. Esto indica que la fermentación con partículas pequeñas, presentan suficiente área de superficie, para un mejor aprovechamiento de los carbohidratos. En el caso de partículas grandes se reduce el área de superficie y el volumen, inhibiendo el poder de penetración del hongo en el grano de mijo perla. Estos resultados coinciden con los trabajos efectuados con levaduras por Gibbons and Westby (1987) y los de Roukas (1994) en el fruto de algarrobo de España.

b.2 Humedad. Otro importante factor que afecta el funcionamiento de la fermentación en estado sólido es el contenido de humedad inicial en el sustrato. El propósito fue determinar el nivel óptimo de humedad inicial para un mejor desarrollo del hongo en estudio. Los mejores desarrollos del hongo se obtuvieron al incrementar el contenido de humedad en el sustrato, que fueron en los valores del 80 y 85%, mientras que a 70% de humedad se obtiene un desarrollo menos eficiente. La baja humedad en el sustrato reduce la transferencia de masa, afectando la difusión de solutos y de gas en la célula durante la fermentación inhibiendo el crecimiento de los hongos. (Nagadi y Correia 1992). En los diferentes procesos que se aplican las fermentaciones en estado sólido. Se encontró variaciones en los porcentajes de humedad, por ejemplo en el proceso de Koji varía de 31 a 40%, mientras que el óptimo para obtener compost es de 45 a 60% de humedad. La síntesis de proteína en materiales amiláceos es mayor a niveles de 60% de agua en los sustratos (Peñaloza 1981). Por lo que el nivel de agua se ajusta según los requerimientos del o de los microorganismos utilizados.

Se puede concluir que el estudio de tamaño de partícula y humedad es fundamental, ya que estos tienen gran influencia en la transferencias de masas interpartícula e intrapartícula, facilitando así mayor difusión de

nutrimentos y una mayor degradación del sustrato sólido por las enzimas extracelulares del microorganismo.

b.3 Temperatura de incubación. Los hongos pueden crecer en un amplio rango de temperatura (20 a 45°C). Por lo que se trató de abarcar este rango midiendo el desarrollo a los 30, 35 y 40°C. El hongo presentó un excelente desarrollo a las 24 hs de incubación a la temperatura de 35°C. A temperaturas más bajas del orden de los 30°C también hubo crecimiento, pero tarda más en desarrollarse, requiriéndose de más tiempo de incubación. A la temperatura de 40°C el crecimiento del hongo fue menos abundante, el hongo se comportó como un microorganismo mesófilico, con un rendimiento máximo a los 35°C.

Para determinar el tiempo óptimo de fermentación donde se alcanza el mayor contenido de proteína, se repitió el proceso con las condiciones seleccionadas, que fueron las siguientes:

Tratamiento al sustrato: remojo-cocido.

Tamaño de partícula del sustrato: 0.3-0.6 mm.

Humedad inicial del sustrato: 85 %

Temperatura de incubación: 35°C

pH inicial del sustrato: 5

Se determinó el porcentaje de proteína a las 24, 48 y 72 hs. La fermentación muestra su efecto hasta después de las 24 hs de incubación produciéndose una masa compacta, con un olor y aspecto agradable (figura 3). Se pudo observar un aumento en el contenido de proteína cruda de un 12% hasta 32% a las 72 hs de fermentación, después de las 72 hs no se detectaron cambios significativos en el contenido de proteína (figura 4).

2. CINETICA DE FERMENTACION:

La principal limitación de la fermentación en sustrato sólido es la unificación de las condiciones de crecimiento, por lo que resulta una baja densidad de ramificación del hongo con una escasa accesibilidad y aprovechamiento al sustrato y la dificultad de controlar las condiciones de fermentación, especialmente contenido de humedad y los cambios de temperatura (Abdullah y col. 1985). En el presente trabajo se evaluó el sistema diseñado, que se basó en el sistema charolas de régimen estacionario. El sistema diseñado permitió, con las condiciones

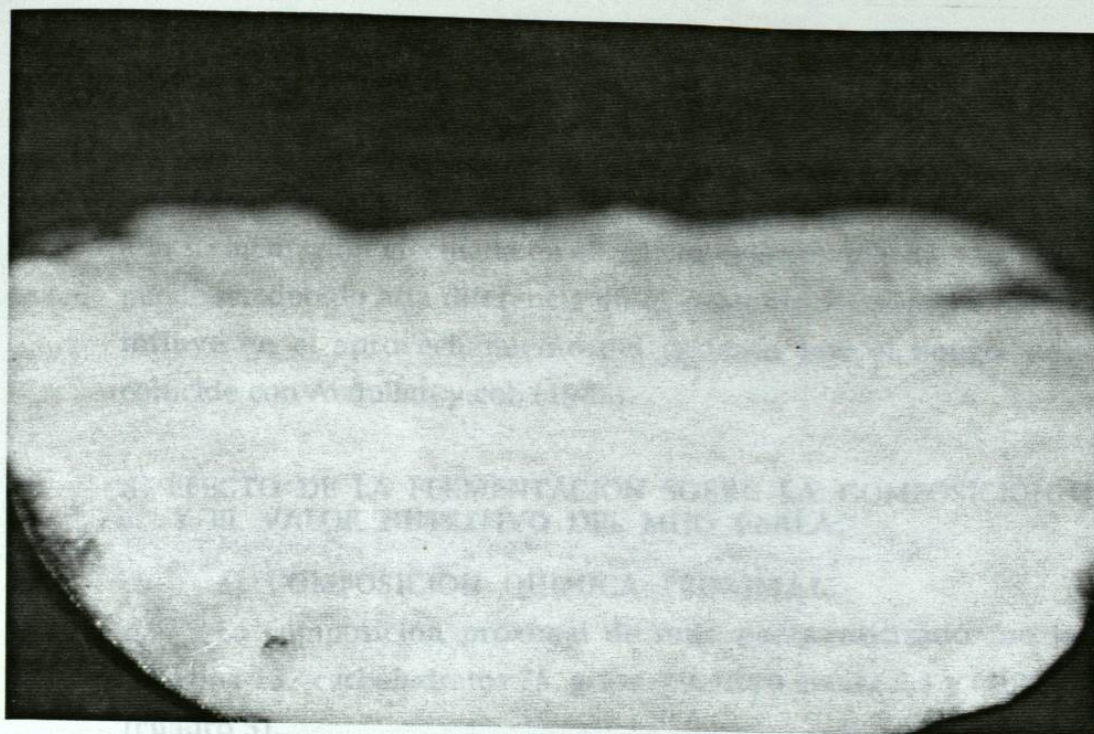


Fig. 3. - Desarrollo de *Rhizopus oligosporus* en mijo perla

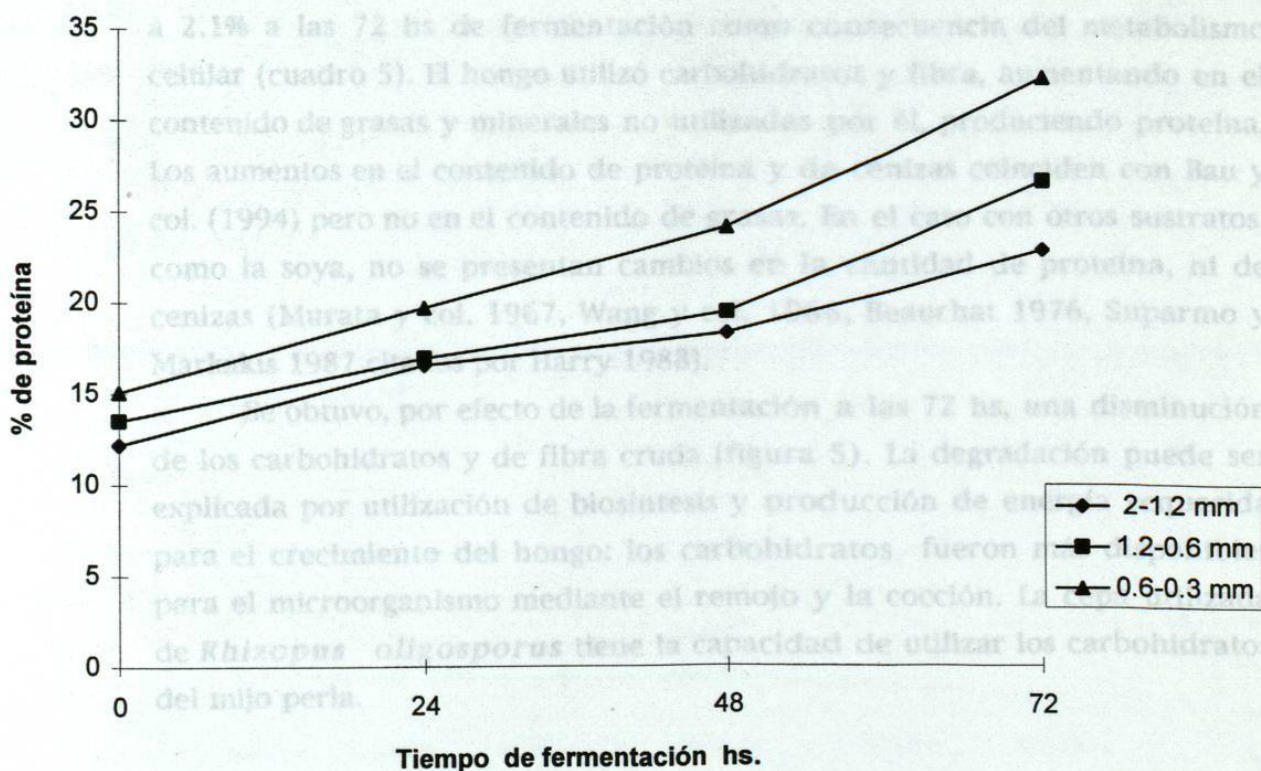


Fig. 4.- Porcentaje de proteína obtenido en la fermentación por *Rhizopus oligosporus* en diferentes tamaños de partícula de mijo perla.

seleccionadas, un adecuado desarrollo del microorganismo; se logró mantener la humedad y la temperatura constante en el fermentador.

Se observó una disminución en el contenido de proteína con respecto a la fermentación efectuada en el matraz erlenmeyer de 32 a 28%. Quizá esto puede ser debido a la diferencia en el contenido y espesor del sustrato, que influye en el aprovechamiento del sustrato por el hongo. Resultado que coincide con Abdullah y col. (1985).

3. EFECTO DE LA FERMENTACION SOBRE LA COMPOSICION QUIMICA Y EL VALOR NUTRITIVO DEL MIJO PERLA.

a) COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL.

La composición proximal de mijo perla utilizado fué la siguiente: proteína 13, carbohidratos 75, grasa 4.9, fibra cruda 2.3 y cenizas 1.6, (cuadro 5).

Los efectos en la composición proximal debido a la fermentación se observaron con aumentos en el contenido de proteína del 13.1 hasta 28.3% en el contenido de grasa de 4.9, hasta 9.5 y en el contenido de cenizas de 1.6 a 2.1% a las 72 hs de fermentación como consecuencia del metabolismo celular (cuadro 5). El hongo utilizó carbohidratos y fibra, aumentando en el contenido de grasas y minerales no utilizadas por él, produciendo proteína. Los aumentos en el contenido de proteína y de cenizas coinciden con Bau y col. (1994) pero no en el contenido de grasas. En el caso con otros sustratos, como la soya, no se presentan cambios en la cantidad de proteína, ni de cenizas (Murata y col. 1967, Wang y col. 1968, Beauchat 1976, Suparmo y Markakis 1987 citados por Harry 1988).

Se obtuvo, por efecto de la fermentación a las 72 hs, una disminución de los carbohidratos y de fibra cruda (figura 5). La degradación puede ser explicada por utilización de biosíntesis y producción de energía requerida para el crecimiento del hongo: los carbohidratos fueron más disponibles para el microorganismo mediante el remojo y la cocción. La cepa utilizada de *Rhizopus oligosporus* tiene la capacidad de utilizar los carbohidratos del mijo perla.

CUADRO 5.- CAMBIOS EN LA COMPOSICION PROXIMAL DE MIJO PERLA POR EFECTO DE LA FERMENTACION CON *R. oligosporus*.

TRATAMIENTO	PROTEINA	GRASA	CENIZAS	FIBRA CRUDA	** E.L.N.
	(g/100 g en base seca)				
1 CRUDO	13.1 d	4.9 c	1.6 b	5	75.3
2 REMOJO	14.0 cd	3.5 d	0.9 c	4.6	76.8
3 REMOJO-COCIDO	14.4 cd	2.7 c	1.1 c	4.4	77.3
4 FERMENTADO 24H	15.8 c	3.5 d	1.1 c	4.6	74.9
5 FERMENTADO 48H	20.9 b	6.7 b	1.2 bc	3.2	67.9
6 FERMENTADO 72H	28.3 a	9.5 a	2.1 a	2.1	57.8

media de tres determinaciones

** calculado por diferencia

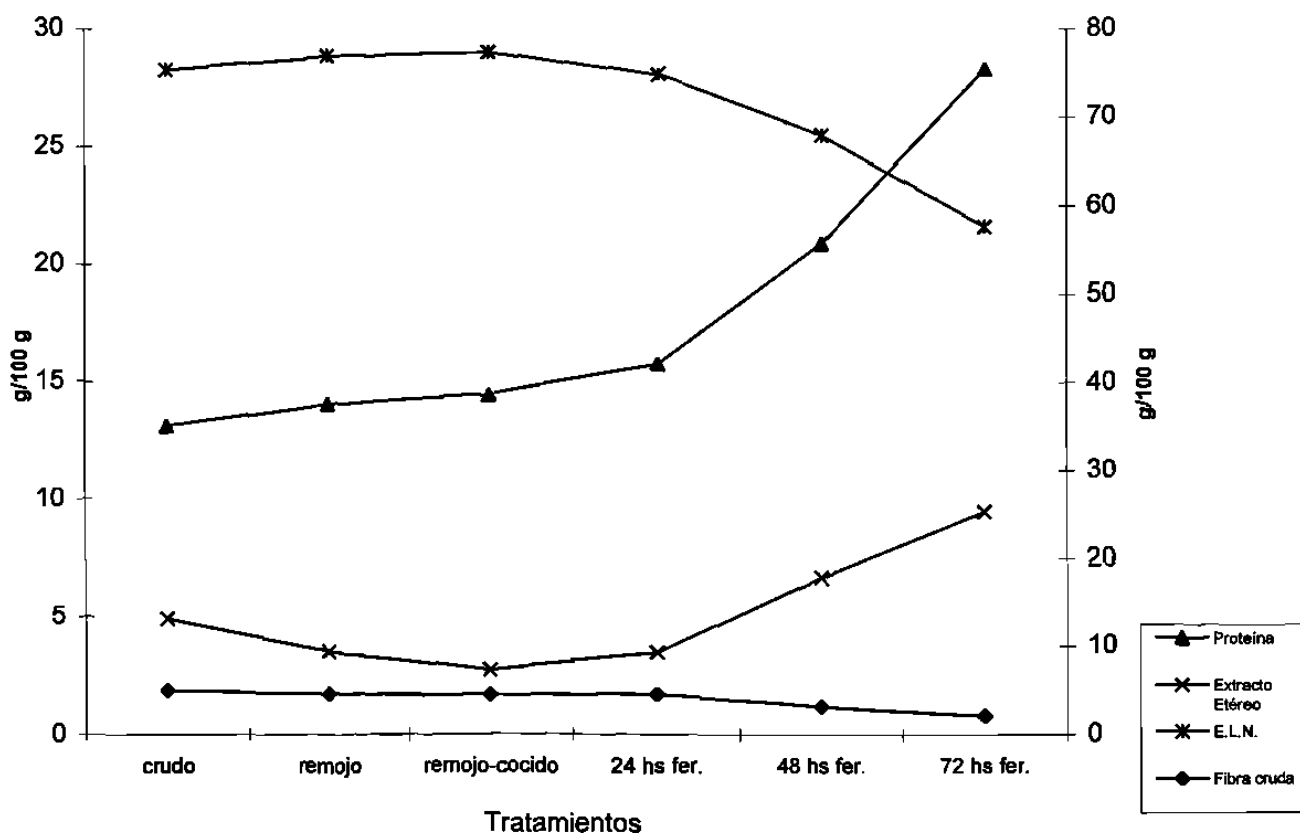


Fig. 5.- Comportamiento en el contenido de proteína, extracto etéreo, carbohidratos y fibra cruda de mijo perla por efecto de la fermentación con *Rhizopus oligosporus*

b) ACIDOS GRASOS.

Se analizaron los cambios en el perfil de ácidos grasos por efecto de la fermentación a las 72 hs por *R. oligosporus* en el mijo perla. Como se observa en el cuadro 6 los principales ácidos grasos del mijo perla son palmítico (C 16), oléico (C 18:1), linoléico (C 18:2). La fermentación por *R. oligosporus* produjo cambios significativos en cuatro ácidos grasos en el oléico, linoléico, linolenico y araquídico. No se obtuvieron cambios importantes en el palmítico, y palmitoleico y esteárico. Los cambios que se produjeron fueron en aumentos del 30% aproximadamente en el oléico, en el araquídico aumento cinco veces más su peso y los ácidos grasos que disminuyeron fueron el linoléico casi un 50%. Al respecto del consumo del linoléico al utilizar *Rhizopus* en cacahuete, soya, frijol utilizados como sustratos, se observo el mismo comportamiento general de consumo, en fermentaciones efectuadas por Wagenknecht y col. 1961, Murata y co, 1967, Beauchat y Worthington 1974 y Harry 1988.

Por lo anterior, al parecer el ácido linoléico es importante para el crecimiento del hongo. Siendo el ácido linoléico un ácido graso esencial para humano, por lo que puede considerarse como una disminución en el valor nutricio del producto obtenido, sin embargo los cereales no son considerados buena fuente de grasas, por lo que al ganar valor con el incrementó de proteína, se compensa la disminución en la concentración de este ácido graso.

CUADRO 6.- EFECTO DE LA FERMENTACION EN EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS DEL MIJO PERLA POR *R. oligosporus*.

ACIDO GRASO mg/100 g.	MIJO PERLA SIN FERMENTAR	MIJO PERLA FERMENTADO 72 hs
PALMITICO C16	19.3	18.1
PALMITOLEICO C16:0	0.29	0.20
ESTEARICO C18:0	4.8	5.4
OLEICO C18:1	26.16	34.7
LINOLEICO C18:2	45.8	37.5
LINOLENICO C18:3	3.4	1.6
ARAQUIDICO C20	0.2	1.0

c) Análisis de aminoácidos excepto triptofano.

Se realizó el perfil de aminoácidos a la muestra fermentada por 72 hs y se comparó con el mijo perla sin fermentar, se obtuvieron cambios en la mitad de los aminoácidos analizados como se observa en los cuadros 7 y 8. Los porcentajes de ácido glutámico, prolina, leucina y arginina disminuyeron por efecto de la fermentación y se obtuvieron aumentos en ácido aspártico, lisina y histidina.

CUADRO 7. - COMPARACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS ESENCIALES DEL MIJO PERLA FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

AMINOACIDOS g/100g de proteína	MIJO PERLA NO FERMENTADO	MIJO PERLA FERMENTADO	FAO/WHO/ONU (1985) proteína	
			adulto	niño
LISINA	3.6	3.9	1.6	5.8
TREONINA	4.6	4.9	0.9	3.4
VALINA	5.4	5.4	1.3	3.5
METIONINA	1.9	1.9		
CISTEINA	1.7	1.8	1.7	2.5
ISOLEUCINA	4.7	4.6	1.3	2.8
LEUCINA	11.2	9.7	1.9	6.6
FENILALANINA	5.9	5.1		
TIROSINA	2.0	2.8	6.9	6.3
HISTIDINA	2.6	3.8	1.3	1.9

CUADRO 8.- COMPARACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES DEL MIJO PERLA FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

AMINOACIDOS g/100 g de proteína	MIJO PERLA SIN FERMENTAR	MIJO PERLA FERMENTADO
ARGININA	6.0	3.7
ACIDO ASPARTICO	8.5	9.4
SERINA	5.4	5.1
ACIDO GLUTAMICO	20.1	19.2
PROLINA	5.9	5.8
GLICINA	3.9	3.7
ALANINA	8.5	8.5

d) Proteína digestible.

La digestibilidad de la proteína del mijo perla se incrementa por efecto de la fermentación de 51% hasta un 98.2% (Cuadro 9), por lo que se obtuvo un aumento considerable, debido a la actividad proteolítica del hongo, liberando péptidos del sustrato aumentando la susceptibilidad de la proteína al ataque enzimático.

CUADRO 9.- COMPARACION DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LA PROTEINA DEL MIJO PERLA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.

TRATAMIENTOS	% DE DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i>
<u>MIJO PERLA</u>	
1.-SIN FERMENTAR	51.0
2.-GERMINADO POR 24 Hrs.	77.2*
3.-FERMENTADO CON <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. brevis</i>	82.4*
4.-FERMENTADO CON <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. fermentum</i>	90.1*
5.-FERMENTADO CON <i>R. oligosporus</i> x 48 Hrs.	77.4
6.-FERMENTADO CON <i>R. oligosporus</i> x 72 hrs.	86.1

*datos obtenidos de Khetarpul y Chauhan (1990).

VII. CONCLUSIONES:

1.- DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE FERMENTACION DE *Rhizopus oligosporus* EN MIJO PERLA.

El tiempo óptimo de fermentación fue de 72 hs con las siguientes condiciones:

Tratamiento al sustrato.- El remojo y la cocción a 90°C por 30 min dió sustrato mas adecuado para el crecimiento del hongo, con una fermentación uniforme constante.

Tamaño de partícula.- Se obtuvo un mejor desarrollo en el menor tamaño de partícula que se ensayó que es la de 0.3-0.6 mm.

La humedad inicial del sustrato 80-85% y la temperatura de incubación de 35°C.

El diseño del fermentador utilizado, basándose en el sistema estático con aireación, con capacidad de 200 g permitio mantener las condiciones adecuadas para el desarrollo de *R. oligosporus*.

El método aplicado no requiere de equipo sofisticado y es de bajo costo.

2.- EFECTO DE LA FERMENTACION SOBRE LA COMPOSICION PROXIMAL Y EL VALOR NUTRITIVO DEL MIJO PERLA.

La fermentación produjo un aumento en las concentraciones de proteínas, grasas, y cenizas y redujo las concentraciones de carbohidratos y fibra cruda.

Rhizopus oligosporus consumió ácido linoleico, aumentó el nivel de ácido oléico. En relación a los aminoácidos existieron aumentos en ácidos aspártico, y en histidina, con disminuciones en ácido glutámico, leucina y arginina.

La digestibilidad de la proteína *in vitro* aumentó a las 72 hs de fermentación de 51% a 86%.

Las características de la cepa *Rhizopus oligosporus* utilizada en combinacion con tratamientos físicos provee cambios en el valor nutricio del mijo perla, obteniéndose una harina que puede utilizarse para la elaboración de diversos productos alimenticios.

VIII. APORTACIONES ORIGINALES DEL TRABAJO:

- Se desarrollo un método sencillo y de bajo costo para la obtención de una harina con un porcentaje alto de proteína y de buena digestibilidad.
- Se obtuvieron aumentos en la concentración de proteína, grasa, y minerales del mijo perla debido al consumo de carbohidratos y fibra cruda por el hongo.
- Se investigaron los cambios en la composición química proximal, en el perfil de ácidos grasos, aminoácidos y en digestibilidad *in vitro* de la proteína producida.
- Se obtuvo una harina que puede utilizarse como ingrediente proteico de buena digestibilidad.

IX. LITERATURA CITADA

- 1.- Adeyemi, I.A.(1988). Ogi quality of sorghum flour ory-millet from fermented sorghums grains. *J. Food Sci.* 53:641-642.
- 2.- Abdullah, A.L., Tengerdy, R. P., y Murphy, V. G. (1985). Optimización of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 27:20-27.
- 3.- Alvares Lopez, María Teresa. (1990). Estudio de la fermentación sólida de sorgo y soya descascarados utilizando *Rhizopus oligosporus*. Tesis de Maestria. Universidad Iberoamericana, México. D.F.
- 4.- A.O.A.C.(1990). Official Methods of Analysis, 15th de. Association of Official Analytical Chemists, Washington , D.C.
- 5.- Bailey, A.G., y Sumrell. (1980) Preparation of protein concentrate from pear millet. *J. Agric. Food Chem.* 28:475-477.
- 6.- Barrios-Gonzalez, J., y Anaya, S. (1987). Desarrollo de un sistema para el estudio de la germinación de esporas de *Aspergillus niger*. *Rev. Lat. Microbiol.* 3:9:18.
- 7.- Bau. H., Villaume, C., Evrard, J., Quemener, B., Nicolas, J., y Mejean, L. (1994). Effect of solid-state fermentation using *Rhizopus oligosporus* sp T-3 on elimination of antinutritional substances and modification of biochemical constituents of deffated rapeseed meal, *J. Sci. Food Agric.* 65:315-322.
- 8.- Beauchat, L.R. (1984). Fermented soybean foods. *Food Tecnology.*38:64-70.
- 9.- Beauchat, L.R., y Worthington, R.E. (1974). Changes in the lipid content of fermented peanuts. *J. Agr. Food Chem.* 22:509-512.
- 10.- Bookwalter, G.N., Lyle, S.A. y Warner. (1987). Millet processing for improved stability and nutritional quality without functionality changes. *J. food Sci.* 52:399-402.
- 11.- Bressani, R., y L.G. Elias. (1968). Vegetable protein value: En *Advances in food resarch*, Academic Press, New York. N.Y. Vol. 16, pp. 23-53.
- 12.- Cabrero Mendoza, María de los Angeles. (1987) Obtención de biomasa fungal en estado sólido utilizando como sustratos desechos de tuna cardona. Tesis de Maestria. Universidad Iberoamericana. México, D.F.
- 13.- Cannel, E y Moo-Young.(1980). Solid-state fermentation systems.Process. *Biochem.* 15:2-7.
- 14.- Cuevas Hernandez, Baltazar. (1992). Estudio nutricional del mijo perla

- (*Pennisetum americanum* (L.) Leake) y su utilización en alimentación de pollos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- 15.- Dhankner, N. y Chauhan, B. (1987). Effect of temperature and period of fermentation on protein and starch digestibility (in vitro) of rabadi. A pearl millet fermentad food Sci. 52:489:490.
 - 16.- Dhillon, S., Popli, S. y Dhinosa, K.S. (1982). Chemical composition and protein fractions of some high yielding varieties of bajra. Bull. Grain. Tech. 20:155-159.
 - 17.- Finger, S., Hatch, R y Regan, T. (1976). Aerobial microbial growth in semisolid matrices. Heat and mass transfer limitaciones. Biotechnol. Bioeng. 18:1193-1218.
 - 18.- González H.E., Revah, S. y Alvarez, N. (1984). Mejoramiento de la calidad de la proteína del sorgo (*sorghum bicolor* L. Moenh) mediante un proceso de fermentación sólida. Tecnol. Aliment. 19:22:28
 - 19.- González, H. E. (1987). Utilización de desechos agroindustriales para la producción de alimentos mediante procesos de fermentación en estado sólido. Avances en Ingeniería Química, Vol. 1. Editorial AMIDIQ, pp. 344-353.
 - 20.- González, H.E., Moreno-Terrazas. R. y Castro, M. (1990). Adaptación de un reactor estático de charolas para una fermentación en estado sólido con sorgo (*Sorghum bicolor*). Biotam 2:25-32.
 - 21.- Graham, D., Steinkraw, C. W. y Hackler. (1976). Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media. Appl. Environ. Microbiol. 48:381-387.
 - 22.- Grant, G., Han, Y. W. y Anderson, A.W. (1978). Pilot scale semisolid fermentation of straw, Appl. Environ. Microbiol. 35:549-553.
 - 23.- Harry, I.G.(1988). Desarrollo de procedimientos fermentativos para la elaboración de tempe a partir de frijol común y su incorporación en algunos alimentos. Tesis de Maestria. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México.
 - 24.- Hesseltine, C.W.(1981). Future of Fermented Foods. Process Biochemistry April/ may. pp. 2-6.
 - 25.- Hesseltine , C.W. (1972). Solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 14:517-532.
 - 26.- Jurus, A. y Sundberg, W. J. (1976). Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybean in tempeh, Appl. Environ. Microbiol. 32:284-

- 27.- Khetarpul, N. y Chauhan, B, M. (1990). Effects of germination and fermentation on *in vitro* starch and protein digestibility of pearl millet. *J. Food Sci.* 55:883-884.
- 28.- Khetarpul, N. y Chauhan, B, M. (1990). Effects of germination and pure culture fermentation by yeast and lactobacilli on phytic acid and polyphenol content of pearl millet. *J. Food Sci* 55:1180-1182.
- 29.- Mahajan, S. y Chauhan, B.M. (1988). Effect of natural fermentation on extractability of minerals from pearl millet flour. *J. Food Sci.* 53:1576-1577.
- 30.- Maiti. R.K. y Lopez. U. (1986). Potencial del mijo perla en las regiones semiáridas de México. *Boletín. Vol. I y II. Fac. Agron. U.A.N.L.*
- 31.- Miall, L.M.(1975). Historical development of the fungal fermentation industry. Cap. 6. The filamentous, fungi, Editorial Edwar Arnold. Londres.
- 32.- Moctezuma, A., González, E. y Vernon, E. (1986). Efecto de la aireación sobre la cinética de crecimiento microbiano en una fermentación en medio sólido. *Cuaderno de investigaciones de la Universidad Iberoamericana.* 2:2-12
- 33.- Mohyuddin, M. y Trilok, R.S. (1977). Nutritive value of rye and wheat breads assesed with *Aspergillus flavus*. *J. Agric. Food Chem.* 25: 200-201.
- 34.- Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Rhaghavatrao, K.S.M., y Ghildyal. (1994). Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 29:545-551.
- 35.- Neumann, P.E., Walker, C.E. y Wang, H (1984). Fermentation of corn gluten meal with *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*. *J. Food Sc.* 49:1200-1201.
- 36.- Nwasike, C.C., Mertz, E. T., Pickett, R.C., Glover, D.V., Chibber, B.A., y Vanscoyoc, S.W. (1979). Lysine level in solvent fractions of pearl millet. *J. Agric. Food. Chem.* 27:1329-1330.
- 37.- Okoh, P.N., Nwasike, C.C., y Ikediobi, C.O. (1985). Studies on seed protein of pearl millets. I Amino acid composition of protein fractions of early and late maturing varieties. *J. Agric. Food Chem.* 33:55-57.
- 38.- Olanjunji, O., Akinrele, I.A., Edwards, C.C. y Koleoso, O.A. (1982). Sorghum and millet processing and uses in Nigeria. *Cereal Foods World* 27:277-

280.

- 39.- Opuku, A., Ohenhen, S. y Ejiotor, N. (1981) Nutrient composition of millet (*Pennisetum typhoides*) grains and malt. *J. Food Sci.* 29:1247-1248.
- 40.- Pandey, A. (1991) Aspects of fermenter desing for solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 26:355-361.
- 41.- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 27:109-117.
- 42.- Paredes-López, O. y Harry, G.I.(1988). Food biotechnology review: Traditional solid-state fermentations of plant raw materials application, nutritional significance, and future prospects. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 27:159-187.
- 43.- Pelleft, P. y Young, V. (1980). Evaluación nutricional de alimentos proteínicos. Universidad de las Naciones Unidas. WHTR-3/UNUP-129.
- 44.- Peñaloza, W.. (1981). Fermentación sólida de la pulpa de cafe. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas y Farm. Instituto de Nutrición Centroamérica y Panama. Universidad de San Carlos, Guatemala C.A.
- 45.- Ramakrishna, S.V., Saswathi, N., Sheela, R. y Jamuna, R. (1994). Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyl transferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme Microb. Technol.* 16:441-444.
- 46.- Reyes-Castañeda, P. (1980) Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas, México.
- 47.- Roukas, T. (1994). Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:296-301.
- 48.- Sanchez, R.R. (1978),. Producción de granos y forrajes. 2a Ed. Limusa, Méx., pp. 333-337.
- 49.- Silman, R. (1980). Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 22:411-420.
- 50.- Singh, P., Gupta, V.P. Y Sukhijn, P.S. (1982) Fatty acid composition in pearl millet. *Milwai Newsletter.* 1:2-3.
- 51.- Soccol, C.R., Marin, B., Raimbault, M., Lebeault, J.M. (1994). Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:330-336.
- 52.- Steinkraus, K.H. (1983). Industrial applications of oriental fungi fermentations En: The filamentous fungi. *Fungal technology.* Editor Smith D. . Londres Engl. Cap, 7. pp. 171-175.
- 53.- Subramanian, V., Jambunathan, R. y Ramainn, C.D. (1986). Physical and

- chemical characteristics of pearl millet grain and their relationship to roti quality. *J. Food Sci.* 51:1005-1008.
- 54.- Sugama, S., Okazaki, N. (1979). Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *J. ferment. technol.* 57:408-412.
- 55.- Van Veen, A.G. y Steinkrau, K.H. (1970). Nutritive value and wholesomeness of fermented foods. *J. Agr. Food Chem.* 18:576-578.
- 56.- Viteri, F., y Alvarado, J. (1970). Evaluación de la calidad de la proteína en humanos con énfasis en metodología. En: Recursos Proteínicos en América Latina. Memoria de una conferencia a nivel latinoamericano. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Guatemala C.A. 24-27 febrero pp. 53.
- 57.- Wang, H.L., Swain, E.W. y Hesseltine, W. (1975). Mass Production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh ferm. *J. Food Sc.* 40:168-170.
- 58.- Wesche-Ebeling, P., Cuevas, B., Maiti, B., Rodrigues, R.K. y López, U. (1991). Contenido y tipos de compuestos fenólicos y almidón en granos de 15 variedades de mijo perla (*Pennisetum americanum* L. Leeke). Publicaciones Biológicas. F.C.B. U.A.N.L. México. 5:31-36.
- 59.- Wood, B.J. y Young, F.M. (1975). Oriental food fermentations. En: The filamentous fungi. Industrial Mycology. Vol. 1. Editor Smith E. Editorial Edward Arnold. Londres England. Cap. 13. pp. 265-267.
- 60.- Xavier, S., y Lonsane, B.K., (1994). Factors influencing fungal degradation of total soluble carbohydrates in sugarcane-pressmud under solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 29:295-301.
- 61.- Young, F.M. y Wood, B. J. (1974). Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation En: Advances in applied microbiology. Editor D, Lerlman. Editorial Academic Press. New York, N.Y. Vol. 17 pp. 157-173.

ANEXO Abreviaturas.

a.C. = Antes de Cristo.

ac. = Acido.

AOAC = Association of Official Analytical Chemists.

ATCC = American Type Culture Collection.

°C = Grados Centígrados.

cm = Centímetro.

E.L.N. = Extracto Libre de Nitrógeno.

etc. = Etcétera.

fig. = Figura.

g = Gramo(s).

ha = Hectárea.

HCl = Acido Clorhídrico.

h(s)= Hora(s).

mg = Miligramos.

min = Minuto(s).

ml = Mililitros.

mm = milímetros.

NaOH = Hidróxido de Sodio.

PDA = Papa Dextrosa Agar.

kg = Kilogramos.

