

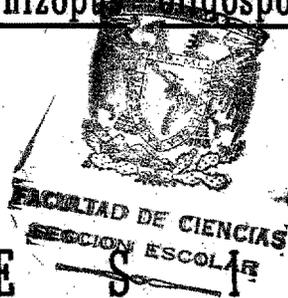
Luis Espinosa



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**MEJORAMIENTO PROTEICO DEL SORGO
(Sorghum bicolor, (L) Moench),
MEDIANTE UN PROCESO FERMENTATIVO
CON (Rhizopus oligosporus).**



T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Rubén Darío Moreno Terrazas Casildo

México, D. F.

Febrero de 1985



A mi mamá

por su cariño y entrega.

A mi papá

porque me brindo la oportunidad de
llegar a estos niveles, por su comprensión
y paciencia.

A mis hermanos

por el empuje y ejemplo.

A mi abuelita " Maña " .

A mi director de Tesis y amigo
Eduardo González A. (Chalo)
porque gracias a él fue posible
la realización de este trabajo,
independientemente de que, con
su ayuda hallé ubicación y conocí
la realidad dentro del panorama
de la ciencia en México.

Integrantes del jurado.

M. en C. Eduardo E. González H.,

M. en C.C. Elvira Aguirre A.,

M. en C. Alejandro Martínez M.,

Biol. Luis E. Eguiarte F.,

Biol. Enrique Moreno S.

Gracias.

Quiero agradecer también a :

M. en C. Fernando García
Jefe del Depto. de Biotecnología
del Instituto de Investigaciones
Biomédicas de la UNAM.

Por las facilidades prestadas
para realizar el escalamiento
a nivel de reactor biológico
dentro de su laboratorio.

Ing. Jose Luis Camacho
Ex-jefe del Depto. de Tecnología
de alimentos de la Div. de Nutri
ción experimental, ciencia de
los alimentos del INN.

Por permitir la ejecución de
los aminogramas en esa insti
tución.

M. en C. Elvira Aguirre

Por su preciada asesoría en la
elaboración de esta Tesis.

M. en C. Sergio Revah M.

Por su valiosa colaboración a
lo largo de todo este trabajo.

Laboratorio de Microcine de la
Facultad de Ciencias
U N A M

Por su colaboración en la rea
lización de las fotografías de
este reporte y en especial a
Mardocheo Palma, quien las ela
boró personalmente.

Laboratorio de Biotecnología
de la Div. de Ciencias Biológicas
y de la salud.
U A M Iztapalapa

Ya que todas las personas que
trabajan ahí siempre estuvieron
dispuestos a brindar ayuda con
sus consejos en la parte experi
mental de la Tesis.

Martha Castañeda

Debido a su ayuda durante la
realización de los aminogramas

Lourdes Gordillo M. T.

Por su labor mecanográfica mara
tónica en la elaboración del
documento.

Rosalía Andrade V.

Sin la cual, la redacción del documento hubiera sido desastrosa.

Horacio Viazcán C.

Por su colaboración en la elaboración de las gráficas.

A mis amigos

A todas las personas que directa o indirectamente ayudaron no solo a elaborar la tesis sino que también me hicieron salir adelante en el sinuoso camino de la carrera.

I N D I C E

R E S U M E N

I ANTECEDENTES

II JUSTIFICACION

III INTRODUCCION

III.1 SORGO

III.1.1 CLASIFICACION

III.1.2 PRODUCCION

III.1.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA PLANTA

III.1.4 CARACTERISTICAS DEL GRANO

III.1.5 COMPOSICION DEL GRANO

III.1.5.1 Generalidades

III.1.5.2 Carbohidratos

III.1.5.3 Lípidos

III.1.5.4 Proteínas

III.1.5.5 Pigmentos fenólicos

III.1.5.6 Pigmentos no fenólicos

III.1.5.7 Vitaminas

III.1.5.8 Minerales

III.1.5.9 Hormonas

III.1.6 VARIEDADES Y USOS

III.2 Rhizopus oligosporus, Saito

III.3 FERMENTACION

III.3.1 GENERALIDADES

III.3.2 FERMENTACIONES TRADICIONALES

III.3.2.1 Tempeh

III.3.2.2 Cambios durante la fermentación
del tempeh

III.4 NUTRICION ANIMAL

IV METODOLOGIA

IV.1 GENERALIDADES

IV.2 EXTRACCION DE TANINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS

IV.3 OBTENCION DE MICELIO DE Rhizopus oligosporus EN
MEDIO LIQUIDO

IV.4 PROCESO DE FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI

IV.4.1 GENERALIDADES

IV.4.2 TEMPERATURA

IV.4.3 TIEMPO DE INCUBACION

IV.4.4 pH

IV.4.5 HUMEDAD

IV.4.6 TAMAÑO DE PARTICULA DEL SUSTRATO

IV.4.7 TAMAÑO DE INOCULO

IV.4.8 CONDICIONES DE ESTERILIDAD, GELATINIZACION
Y DESEMPAQUE

IV.4.9 AIREACION (CANTIDAD DE OXIGENO)

IV.5 PROCESO DE FERMENTACION A NIVEL DE REACTOR BIOLOGICO
DE 20 L (FERMENTADOR)

IV.5.1 ESCALAMIENTO

IV.5.2 LOTE No. 1

IV.5.3 LOTE No. 2

IV.5.4 LOTE No. 3

IV.6 VALORACION DEL SORGO FERMENTADO EN RELACION A LAS
NECESIDADES PROTEINICAS Y DE AMINOACIDOS PARA ANIMALES

V. RESULTADOS

- V.1 EXTRACCION DE TANINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS
- V.2 CARACTERISTICAS BROMATOLOGICAS DE Rhizopus oligosporus DESARROLLADO EN MEDIO LIQUIDO
- V.3 FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI
 - V.3.1 TEMPERATURA
 - V.3.2 TIEMPO DE INCUBACION
 - V.3.3 pH
 - V.3.4 HUMEDAD
 - V.3.5 TAMAÑO DE PARTICULA DEL SUSTRATO
 - V.3.6 TAMAÑO DE INOCULO
 - V.3.7 CONDICIONES DE ESTERILIDAD
 - V.3.8 GELATINIZACION Y DESEMPAQUE
 - V.3.9 AIREACION (CANTIDAD DE OXIGENO)
 - V.3.10 ANALISIS BROMATOLOGICOS DEL SORGO FERMENTADO
- V.4 FERMENTACION A NIVEL DE REACTOR BIOLOGICO (FERMENTADOR)
 - V.4.1 LOTE No. 1
 - V.4.2 LOTE No. 2
 - V.4.3 LOTE No. 3
- V.5 AMINOACIDOS PRESENTES EN EL SORGO, EN EL HONGO Y EN EL PRODUCTO FERMENTADO

VI DISCUSION

VII CONCLUSIONES

A P E N D I C E I

B I B L I O G R A F I A

INDICE DE TABLAS

TABLA No. 1

VITAMINAS EN EL SORGO Y EN EL MAIZ

TABLA No. 2

PATRON PROVISIONAL DE LA FAO PARA REQUERIMIENTOS DE AMINOACIDOS ESENCIALES EXPRESADO EN g/100 g DE PROTEINA

TABLA No. 3

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA POLLOS DE ENGORDA HEMBRAS Y MACHOS DE INICIACION (1a. -4a. SEMANA) Y DE CRECIMIENTO (3a.-4a. SEMANA) EXPRESADO EN g/100 g DE PROTEINA.

TABLA No. 4

NECESIDADES DIARIAS DE AMINOACIDOS PARA GALLINAS PONEDORAS DE 20 A 50 SEMANAS DE EDAD EXPRESADAS EN g/100 g DE PROTEINA EN CLIMA CALIDO Y FRIO.

TABLA No. 5

NECESIDADES DE AMINOACIDOS ESENCIALES PARA PUERCOS (Sus scrofa) DADO EN g/100 g DE PROTEINA.

TABLA No. 6

PORCENTAJES DIARIOS DE AMINOACIDOS REQUERIDOS POR OVEJAS (Ovis aries) DADO EN g/100 g DE PROTEINA.

TABLA No. 7

CANTIDAD DE PROTEINA QUE NECESITA DIARIAMENTE EL CABALLO (Equus caballus) DE DIFERENTES PESOS A 12 Y 24 MESES DE DESARROLLO Y SU CANTIDAD DE DIETA DIARIA.

TABLA No. 8

MEDIO LIQUIDO PARA EL CRECIMIENTO DE Rhizopus oligosporus.

TABLA No. 9

TABLA DE OLIGOELEMENTOS UTILIZADOS PARA AGREGAR AL MEDIO DE LA FERMENTACION.

TABLA No. 10

CUADRO COMPARATIVO DE EXTRACCIONES DE TANINOS CON LA PERDIDA DE ALMIDONES, GRASAS Y PROTEINAS DESPUES DE ESTOS TRATAMIENTOS EXPRESADO EN PORCIENTO .

TABLA No. 11

RESULTADOS EN PORCIENTO DE PROTEINAS Y GRASAS REALIZADOS EN Rhizopus oligosporus DESARROLLADO EN MEDIO LIQUIDO.

TABLA No. 12

CAMBIOS EN EL PORCIENTO DE PROTEINAS DURANTE LA FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI.

TABLA No. 13

CUADRO DE LA FERMENTACION OBTENIDA A NIVEL DE CAJA PETRI.

TABLA No. 14

RESULTADOS EN PORCIENTO DE LAS CANTIDADES DE PROTEINAS, ALMIDONES Y GRASAS DEL SORGO SIN FERMENTAR Y DEL SORGO FERMENTADO A NIVEL DE CAJA PETRI.

TABLA No. 15

PORCIENTO DE PROTEINAS DE LA FERMENTACION DEL SORGO CON RESPECTO A LA AGITACION A NIVEL DE FERMENTADOR.

TABLA No. 16

CAMBIOS EN LA HUMEDAD Y EN LA TEMPERATURA DEL AIRE A LA SALIDA OCURRIDO DURANTE LA FERMENTACION A NIVEL DE FERMENTADOR.

TABLA No. 17

AMINOACIDOS DEL SORGO (Sorghum bicolor L. Moench) VARIEDAD GUANAJUATO EXPRESADO EN g/100 g DE PROTEINA.

TABLA No. 18

AMINOACIDOS DE Rhizopus oligosporus DESARROLLADO EN MEDIO LIQUIDO (g/100 g DE PROTEINA).

TABLA No. 19

AMINOACIDOS DE LA FERMENTACION DEL SORGO CON Rhizopus oligosporus (g/100 g) DE PROTEINA.

TABLA No. 20

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DE LOS AMINOGRAMAS DEL SORGO, (Sorghum bicolor L. Moench), DEL HONGO Rhizopus oligosporus Y DEL SORGO FERMENTADO CON Rhizopus oligosporus, LAS DIFERENCIAS DE LOS AMINOACIDOS DEL SORGO ANTES Y DESPUES DE FERMENTAR Y EL PATRON DE LA FAO/WHO PARA A-A EXPRESADOS EN g/100 g DE PROTEINA.

TABLA No. 21

CUADRO COMPARATIVO DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DIARIOS DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS PARA DIFERENTES ANIMALES CON RELACION A LOS AMINOACIDOS DEL SORGO FERMENTADO EXPRESADOS EN g/100 g DE PROTEINA.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1

PLANTA DE SORGO (Sorghum bicolor) CON Y SIN HOJAS (A) Y CON VASTAGOS (B).

FIGURA No. 2

DIVERSOS TIPOS DE PANOJAS SEGUN LAS VARIETADES DEL SORGO.

FIGURA No. 3

ESTRUCTURA DE LA CARIOPSIS MADURA.

FIGURA No. 4

CORTE DE GRANOS DE SORGO MOSTRANDO LA MATRIZ Y LOS CUERPOS PROTEINICOS DENTRO DEL ENDOSPERMO Y ALGUNOS GRANULOS DE ALMIDON.

FIGURA No. 5

MICELIO ALGODONOSO DE Rhizopus oligosporus

FIGURA No. 6

HIFAS NO SEPTADAS DE Rhizopus oligosporus OBSERVADAS EN CONTRASTE DE FASES 100 x.

FIGURA No. 7

ESPORANGIO DE Rhizopus oligosporus

FIGURA No. 8

ESPORAS DE Rhizopus oligosporus DESARROLLADAS EN TUBO DE ENSAYE UTILIZADAS COMO INOCULO.

FIGURA No. 9 Y 10.

FERMENTADOR UTILIZADO EN EL ESCALAMIENTO, VISTO DESDE 2 ANGULOS DIFERENTES.

FIGURA No. 11

SEMILLAS DE SORGO ANTES Y DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS TERMICO-ALCALINOS.

FIGURA No. 12

DESARROLLO DE MICELIO EN LAS AREAS DE EXPOSICION DEL SORGO

FIGURA No. 13

DESARROLLO SUPERFICIAL DEL HONGO PROVOCADO POR LA GELATINIZACION Y EL EMPAQUE DEL SUSTRATO.

FIGURA No. 14 Y 15 .

SORGO FERMENTADO Y DETALLE, VISTOS EN EL MICROSCOPIO DE DISECCION.

FIGURA No. 16.

PRODUCTO FERMENTADO EN EL LOTE No. 2

FIGURA No. 17 Y 18

SORGO FERMENTADO EN EL LOTE No. 3 EN DOS DIFERENTES ANGULOS.

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA No. 1

PERDIDA PROTEINICA DEL SORGO DEBIDO A LOS TRATAMIENTOS CON NaOH A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA LA EXTRACCION DE TANINOS Y FENOLES TOTALES.

GRAFICA No. 2

PORCIENTO DE PROTEINAS, ALMIDONES Y GRASAS PARA EL SORGO VARIEDAD GUANAJUATO CON Y SIN TRATAMIENTO TERMICO ALCALINO.

GRAFICA No. 3

PROMEDIO DE LOS INCREMENTOS PROTEINICOS DEL SORGO DURANTE LA FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI.

GRAFICA No. 4

CAMBIOS EN LOS AMINOACIDOS DEL SORGO FERMENTADO CON RESPECTO A LOS DEL SORGO SIN FERMENTAR.

GRAFICA No. 5

CAMBIOS EN EL PORCIENTO DE PROTEINAS DURANTE LA FERMENTACION CON RESPECTO A LA ACITACION A NIVEL DE FERMENTADOR.

RESUMEN

Semillas de sorgo (Sorghum bicolor (L.) Moench) con contenidos de taninos fueron sometidos a tratamientos térmico-alcálinos para eliminar las altas - concentraciones de éstos, sin perder cantidades considerables de proteínas, grasas y almidones. La semilla tratada se utilizó como sustrato básico para llevar a cabo una fermentación sólida a nivel de caja Petri con el hongo - Rhizopus oligosporus Saito (NRRL-2710), teniendo controlados el pH, temperatura, humedad, tamaño de partícula de sustrato, tamaño de inóculo, aireación y tiempo de incubación. Se incrementó la cantidad de proteína en valores cercanos al 8% y se mejoró la calidad de ésta al aumentarse las proporciones de lisina, metionina, fenilalanina, treonina e isoleucina, como producto de la fermentación.

Posteriormente se realizó un escalamiento a nivel de reactor biológico en que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos a nivel de caja Petri.

Por último se estableció una relación entre los requerimientos proteínicos y los aminoácidos esenciales para diferentes animales monogástricos y las cualidades que en este sentido reúne el sorgo fermentado, encontrándose que puede tener utilidad como base para la fabricación de dietas en estos animales, por la cantidad y calidad de sus proteínas.

I. ANTECEDENTES

Los procesos para la obtención de diversos productos a través de una fermentación han sido investigados en los últimos años en todo el mundo. Los nuevos estudios han estado principalmente enfocados a la utilización de desperdicios sólidos y de sustancias de escaso valor nutritivo, tales como bagazo de caña, pajas de cereales, cereales cultivados a gran escala, pulpa de café, estiércol, etc. Estos sustratos sólidos a través de una fermentación, ya sea aerobia o anaerobia, pueden reeditar sustancias líquidas, sólidas o gaseosas, entre las que se pueden mencionar: metano, ácido láctico, abonos ricos en nitrógeno orgánico, alcoholes, productos con alta cantidad de proteína utilizados como complementos alimenticios, sólo por mencionar algunos (Gómez et al., 1982).

También se han realizado estudios para la obtención de alimentos de consumo humano y de animales a través de fermentaciones tradicionales, de origen oriental, como son el miso, sufu, shoyu, etc., en donde, aislando el hongo que provoca la fermentación en alguna leguminosa o cereal, se hicieron variaciones para fermentar otro tipo de cereales, Hesseltine (1965). Hesseltine y colaboradores (1967), utilizaron una nueva técnica alterando el sustrato original de soya, para observar si especies de Rhizopus se desarrollaban en arroz, trigo, sorgo y cebada. Por otro lado se han llevado a cabo trabajos acerca de la fermentación de sorgo por medio de la microflora incidente para implementar el balance y la disponibilidad de los aminoácidos de las proteínas y determinar la accesibilidad del almidón (Kazanas y Fields, 1981).

En nuestro país, se han realizado investigaciones en este sentido: el INIREB (Instituto Nacional de Recursos Bioticos) ha impulsado estudios para el aprovechamiento de la pulpa de café, complementada con estiércol bovino por medio de una fermentación anaerobia, de donde se puede obtener

.. metano (Young, 1982)

Los departamentos de biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y de la UAM Iztapalapa, han desarrollado procesos para la fermentación del estiércol mezclado con melaza y urea, en condiciones de anaerobiosis, obteniendo un producto llamado "biofermel", el cual puede ser adicionado a la dieta de bovinos (Alvarez et al., 1979).

El Instituto de Investigaciones Eléctricas (Cuernavaca, Mor.) ha realizado técnicas para la producción de metano a consecuencia de una fermentación sólida con estiércol adicionando diversas sustancias como: desechos agrícolas, lirio acuático (Eichhornia crassipes) o vinazas --- (Martínez, 1982).

De la Torre y Gómez * (1981) han empleado aguas municipales en un medio de cultivo definido que al fermentarse rindieron cantidades significativas de ácido acético y etanol.

Raimbault y Revah (1982) han investigado la posibilidad de hacer una fermentación utilizando hongos aislados de la yuca mexicana (Manihot -- esculenta) y de alimentos tradicionales mexicanos y orientales para la conversión de sustratos sólidos ricos en carbohidratos, tales como el lirio acuático (Eichhornia crassipes) y yuca (Manihot esculenta)

Ceballos et al., (1981) fermentaron soya (Glycine max) con Rhizopus oligosporus para producir en el laboratorio el alimento tradicional llamado tempeh.

* En Gómez et al., 1982

II. JUSTIFICACION

Debido a la creciente necesidad que existe para producir alimentos, no sólo a nivel nacional sino mundial, la investigación y el desarrollo tecnológico se han visto en la tarea de producir nuevos alimentos que contengan un balance energético y proteínico apropiado a bajo costo.

Los elevados costos de producción y la inaccessibilidad de alimentos ricos en proteínas, no sólo se presenta a nivel humano, sino que abarcan también la producción pecuaria.

Una de las principales soluciones que se está implementando es la producción microbiana de proteína por medio de las fermentaciones, tanto -- para obtener proteína pura con diferentes usos, como para el mejoramiento de alimentos, utilizando sustratos ricos en almidones, en celulosa, desechos de la industria alimentaria, etc. (Senez, et al., 1979).

Por tal motivo, el trabajo realizado en esta tesis se enfocó en la -- obtención de un aditivo nutricional que mejore cualitativa y cuantitativa -- mente la proteína del sustrato fundamental, a través de un proceso de fermentación sólida.

El medio que se seleccionó fue un cereal rico en almidón, de baja proteína con una producción agrícola alta como es el sorgo. Este cereal -- ocupó el segundo lugar en la producción nacional agrícola durante 1982 -- (SAM-SARH, 1982), y que ha sido explotado grandemente en nuestro país -- durante los últimos años. Sin embargo, la mayoría de las variedades sebra das en México presentan grandes cantidades de taninos, los cuales al in -- teractuar con las proteínas del grano forman un complejo que impide la -- total asimilación de éstas. El sorgo generalmente es utilizado como forra je, pero no es recomendable como dieta única para ganado.

Para eliminar los taninos fue necesario realizar previamente un tratamiento térmico-alkalino, eliminando así hasta un 90% de taninos, sin disminuir considerablemente la cantidad de proteína presente en la semilla como lo recomiendan Blessin, et al. (1962).

El organismo utilizado para llevar a cabo la fermentación fue Rhizopus oligosporus, que es un hongo inocuo que ha sido utilizado en Oriente desde hace miles de años para fermentar granos como soya, arroz y trigo (Nelson y Richardson, 1967).

La idea de haber seleccionado una fermentación sólida obedece a que esta metodología requiere un equipo más simple que las fermentaciones en medio líquido, gastos menores de energía para su operación y sin procesos finales de separación (Senez et al., 1979).

III. SORGO

III.1.1 CLASIFICACION

El sorgo es una planta perteneciente a la familia Gramineae, la cual se divide en dos subfamilias: la Panicoideae y la Pooideae. La subfamilia Panicoideae se caracteriza por tener espiguilla dorsalmente - - comprimida y que incluye a la tribu Andropogoneae, a la que pertenece el sorgo. Otros miembros de esta subfamilia y tribu son la caña de azúcar - (Saccharum officinarum), el maíz (Zea mays) y el arroz (Oryza sativa). Pertenecientes a la otra subfamilia, la subfamilia Pooideae son el trigo (Triticum sp), la cebada (Hordeum sp) y la avena (Avena sativa) (Sánchez, 1976).

La clasificación más utilizada para diferentes especies de sorgos cultivados y silvestres es la hecha por Moench en 1794, que los incluye en el genero Sorghum y que es el más aceptado en la actualidad. En - este momento la especie que es utilizada con mayor frecuencia y que alcanza una explotación a nivel mundial es Sorghum bicolor (L) Moench (Clayton, 1961).

Se cree que el sorgo es una planta originaria del este central de Africa, es utilizado como cereal básico y probablemente su cultivo se inició hace aproximadamente 5000 a 7000 años en Etiopía o Sudán. Después se extendió a toda Africa por medio de tribus migratorias. Ha sido reportado en la India y Europa desde los comienzos de la era cristiana (Wall y Ross, 1970).

En América, la introducción del sorgo se llevó a cabo en el siglo XIX, en Estados Unidos en 1857 y en Colombia en 1879, aunque hubo - -

... introducciones de menor importancia durante el siglo XVIII; se utilizó como forraje y para la producción de almibar (Wall y Ross, 1970).

El sorgo fue introducido a México en 1944 por la oficina de estudios especiales de la S.A.G., utilizando variedades traídas de los Estados Unidos para sustituir a otros cultivos con rendimientos deficientes en zonas de poca precipitación pluvial (Cejudo, 1978).

III.1.2 PRODUCCION

Debido a sus características de adaptación a la sequía, el sorgo se ha extendido rápidamente en las últimas décadas, llegando a ocupar en la actualidad el quinto lugar en la producción mundial de cereales y el segundo a nivel nacional. Como consecuencia, en México, en el año de 1982 se cultivaron 1 340 072 ha, con una producción total de 4 956 302 Tons (SAM-SARH, 1982).

III.1.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA PLANTA

El sorgo es una planta que crece en zonas templadas subhúmedas y semi-áridas, es tropical o subtropical y puede desarrollarse en regiones con una temperatura promedio de 18.5°C y con más de 120 días libres de heladas al año (Simonds y Orth, 1980).

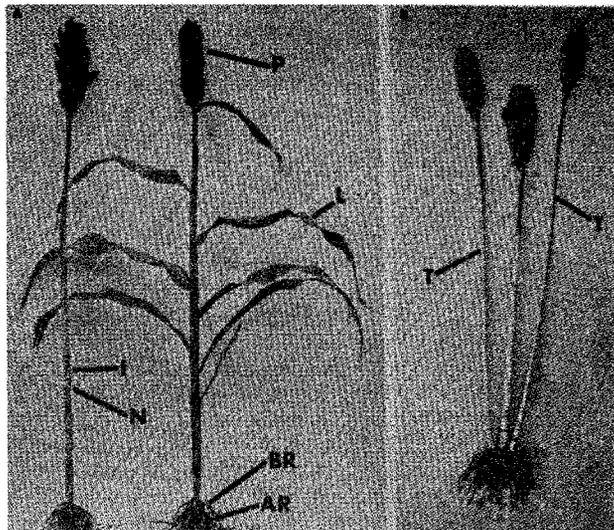


Figura No. 1

Planta de sorgo (*Sorghum bicolor*) con y sin hojas (A) y con vástagos (B), (AR) raíces adventicias, (BR) raíces principales, (I) entrenudo, (N) nudo, (P) panículo (T) vástagos.

El sorgo resiste la sequía y el calor mejor que otras plantas, - pero su rendimiento se reduce; algunos sorgos están sujetos a latencia en temporadas de sequía y germinan cuando aparece la humedad, tienen más raíces y menor área foliar que el maíz, así como una cutícula cerosa que aparentemente conserva la humedad. El sorgo es una planta anual, pero en condiciones tropicales puede ser perenne (Wall y Ross, 1970).

La planta de sorgo presenta variedades que poseen tallos que van desde los 50 cm hasta los 5 m de altura, con una estructura vegetativa similar a la del maíz. El tallo presenta de 7 a 18 o más nudos y entrenudos, el diámetro en la base varía de menos de 2.5 a 5 cm. Puede ser jugoso o seco, dulce o no dulce. Las hojas nacen de cada nudo y están alternadas y opuestas; están formadas por una lámina con nervaduras paralelas y bordes enteros. También tiene una vaina que envuelve al entrenudo arriba del nudo de inserción prolongándose hasta el nudo inmediato superior con lo -

... que le proporciona al tallo protección y soporte. Las hojas son erectas y aproximadamente miden de 60 a 100 cm (Wall y Ross, 1970. Simonds y Orth, 1980).

En la parte superior del tallo hay una inflorescencia caracte - rística la cual esta formada por racimos compuestos denominada "panoja" (Fig. No. 2). Esta panoja presenta un eje central dividido en nudos y -- entrenudos, las ramificaciones primarias aparecen agrupadas en los nudos, que se vuelven a dividir hasta dar ramificaciones de tercer orden que -- originan una o varias espiguillas en donde se localizan los frutos (se - millas) o carióspsides. En cada flor hay órganos femeninos y masculinos y puede ser "autopolinizada"; generalmente cada panoja presenta de 800 a - 3000 semillas (Wall y Ross, 1970).

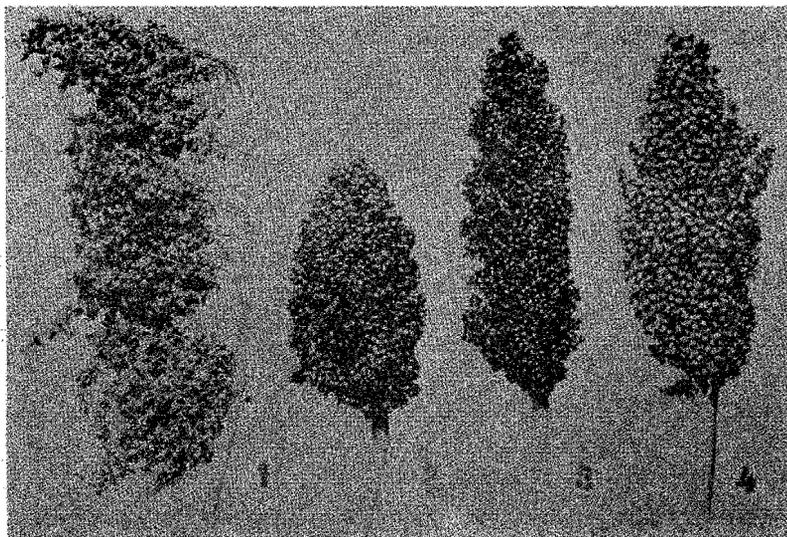


Figura No. 2

Diversos tipos de panojas según las variedades de sorgo.

Las flores o espiguillas aparecen de dos en dos, siendo una de ellas estéril y pedicelada y la otra fértil y sésil; generalmente las espigas estériles se secan después de que las espigas fértiles maduran (Simonds y Orth, 1980).

La flor fértil consta de un raquis corto en el que aparecen una flor inferior estéril que se reduce a una escama y otra flor fértil que contiene al androceo con tres estambres y al gineceo con el ovario, del que salen dos estilos que terminan cada uno en un estigma plumoso, todo esto protegido por una lemma que se encuentra entre la segunda gluma y la cariopsis hasta su madurez, una pálea localizada entre la lemma estéril y la cariopsis y dos brácteas externas denominadas glumas (Wall y -- Ross, 1970).

III.1.4 CARACTERISTICAS DEL GRANO

La semilla madura consta de dos partes principales: El embrión o germen y el endospermo, que están protegidos por tres envolturas. La primera muy delgada denominada cubierta cuticular; la siguiente pericarpio y por último la testa, la cual se fusiona con la anterior. (Fig. No. 3) - (Wall y Ross, 1970).

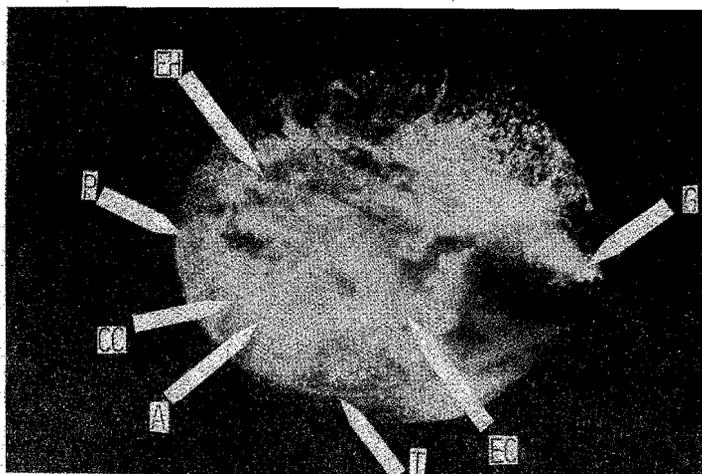


Figura No. 3

Estructura de la cariopsis madura. T (testa), P (pericarpio), CC (cubierta cuticular), A - (aleurona), EC (endospermo córneo), EH (endospermo harinoso) y G (germen).

Cuando el endospermo madura, contiene células con almidón e incluye una capa simple externa de células que recibe el nombre de aleurona, ésta continúa rodeando a la semilla. Las células del endospermo depositan almidón en dos regiones: una llamada región córnea externa o dura y otra denominada región harinosa interna suave o almidonosa. La proporción de estas regiones varía en las distintas variedades. Esta capa es alta en proteínas, grasas, minerales y actividad enzimática. El endospermo contiene mayor cantidad de proteínas en las células periféricas, las cuales disminuyen en las capas internas y por el contrario, los granos de almidón aumentan; estos granos se encuentran envueltos -- por la matriz de la proteína (Sanders, 1955. Watson, 1955) (Fig. No. 4).



El pericarpio se compone principalmente de cuatro capas: el epicarpio, el mesocarpio, las células de cruce y las células tubulares. El epicarpio es la capa externa que contiene grasas y algunas veces pigmentos fenólicos. La capa media o mesocarpio varía en grosor y localización y contiene algunas veces pequeños gránulos de almidón. La capa de células de cruce se encuentra de manera similar que en el maíz. Las células tubulares se hayan extendidas longitudinal o elípticamente y junto están las células de cruce alargadas, formando una cubierta angosta de una o varias células de espesor (Artschwager et al., 1949)

La testa es una capa continua excepto por el hilum. La porción distal de la testa presenta células alargadas, su pared interna es gruesa, las células que rodean al embrión son más delgadas y brillantes que en otras regiones. La región por la cual penetra el integumento corresponde al hilum. Las células externas están fuertemente pigmentadas por-

... compuestos fenólicos (Artschwager et al., 1949).

El germen o embrión consiste en un eje embrionario y un escudillo, éste formado por dos células vacuoladas de parénquima, una raíz primaria y una plúmula terminal (Artschwager et al., 1949).

El embrión del sorgo tiene una fuerte capa cementante entre el escudillo y el endospermo y glándulas cementantes que sobresalen del escudillo hacia el endospermo.

El escudillo comprende la mayor parte del embrión y encierra a casi todo el eje de éste. La plúmula está envuelta por una vaina protectora llamada coleoptilo y una raíz primaria o radícula cubierta por la coleorriza. La región comprendida entre el nudo del coleoptilo y el plato del escudillo se denomina mesocotilo (Paulson, 1962).

III.1.5 COMPOSICION DEL GRANO

III.1.5.1 Generalidades

La composición del grano de sorgo es comparable a la de otros granos usados como alimento. Como el maíz y el trigo, el grano de sorgo es bajo en fibra y cenizas. El nivel de proteínas es un poco más alto que el del maíz y el del arroz. El contenido de grasas es más bajo que en el maíz o en la avena, pero más alto que el del arroz, el trigo o la cebada. El contenido de cenizas es menor que en otros cereales con gluma fija. El grano de sorgo tiene un grado de cantidad de energía total media utilizable, cercano al del maíz y a otros cereales (Wall y Ross, 1970).

La cantidad de proteínas componentes de la semilla de sorgo -- cambia en las diferentes variedades, teniéndose que las cenizas se encuentran de 1.6 a 2.2%, las grasas de 3.1 a 4.9%, las proteínas de 6 a 15% y los carbohidratos de 80 a 85% aproximadamente, aparte de otras sustancias que están en pequeñas cantidades (Wall y Ross, 1970).

III.1.5.2 CARBOHIDRATOS

El grano de sorgo contiene diferentes tipos de carbohidratos, -- siendo el principal el almidón (60-80% del grano), sin embargo, también existen hemicelulosa en una proporción de 2 a 3% de la semilla; azúcares sencillos en una proporción de 0.9 a 2.0% (entre los que se puede mencionar a fructosa, glucosa rafinosa y estaquiosa). Además hay algunos polisacáridos solubles en agua (Wall y Ross, 1970). El almidón del sorgo es -- un polisacárido formado por amilosa y amilopectina (que son polímeros de la D-glucosa). La amilosa presenta ligaduras α -1,4 que da una cadena -- lineal, y la amilopectina presenta también ligaduras α -1,4 y un 5% de ligaduras α -1,6 que le confieren una estructura ramificada o de copa.

La relación de estos dos polisacáridos es diferente en los diver -- sos cereales ya que en los almidones comunes presenta de un 75 a un 80% de amilopectina y de un 20 a un 25% de amilosa. Los almidones de los cereales de tipo ceroso, como maíz, arroz y sorgo contienen casi únicamente -- amilopectina y solamente 1% o menos de amilosa; aunque hay sorgos que presentan almidones comunes o sea que son variedades no cerosas (Deatherage -- et al., 1955).

Los gránulos de almidón del sorgo en el endospermo son casi igua -- les que los del maíz (6 a 24 mm/diam), aunque en promedio los del sorgo son un poco más alargados. Los gránulos en el pericarpio son más pequeños, en el endospermo corneo son polihédricos y en el endospermo harinoso son

... redondos y más espaciados. La densidad del almidón en el grano del sorgo es alrededor de 1.5 g/ml (Wall y Ross, 1970).

El almidón del sorgo de tipo común gelatiniza a una temperatura de 67 a 77°C, mientras que los almidones de sorgo de tipo ceroso, tienen una temperatura de gelatinización más alta que los del maíz, ya que éstos gelatinizan de 62 a 72°C (Watson, 1967).

La temperatura de gelatinización del grano de sorgo varía de acuerdo con las características del gránulo, tales como su diámetro, su densidad y la cantidad de amilosa en la semilla. Otro factor que puede influir en la temperatura de gelatinización es el almacenamiento del grano y las condiciones climáticas en las que se desarrolló la planta (Watson, 1967).

III.1.5.3 Lípidos

La semilla de sorgo contiene 3.6% de lípidos no polares conteniendo el 13% en el endospermo, 76% en el embrión y 11% en la cubierta. El tipo de lípidos que presenta son principalmente triglicéridos, pequeñas cantidades de hidrocarburos, esterolésteres, ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos, esteroides y fosfolípidos.

Presenta grasas menos saturadas que las del maíz, conteniendo más ácido oleico y ácido esteárico y menos ácido linoleico, ácido mirístico y ácido palmítico que el maíz. Contiene entre 1 y 2% de ácido linoleico. Se encuentran también lípidos asociados al almidón dándoles una influencia pastosa e insoluble (Wall y Ross, 1970)

El sorgo contiene 0.25% de grasas, que es un 50% más que las del maíz. Las principales grasas son parafinas, ésteres y fracciones -

... de alcohol en variedades cerosas (Dalton y Mitchell, 1959).

III.1.5.4 Proteínas

El grano de sorgo contiene, según la clasificación de proteínas de Osborne (1924), los siguientes tipos : albúminas solubles en agua, globulinas solubles en soluciones salinas, prolaminas (kafirinas) solubles en solución de alcohol etílico y glutelinas solubles en álcali diluido. La mayor parte de las proteínas del grano de sorgo no son extraídas con agua ni con soluciones salinas. Estas proteínas se presentan en una proporción de: kafirinas 30 a 60%, glutelinas 20 a 40%, globulinas 2 a 10% y albúminas 2 a 8%. Dichas proteínas se hallan en forma de entidades estructurales en la semilla. Las kafirinas se localizan como cuerpos proteínicos esféricos de 0.3 a 3 mm de diámetro en el endospermo. -- Las glutelinas están también en el endospermo pero no en forma de proteínas amorfas o matrices y se asocian con los cuerpos proteínicos dentro de dicho endospermo.

En el endospermo harinoso los gránulos proteínicos son más pequeños: 0.3 a 1.5 mm de diámetro y la proporción de kafirinas y glutelinas es más baja, así la reducción en tamaño y número de cuerpos proteínicos puede ser menor (Virupaksha y Sastry, 1968).

Las globulinas presentan mucho más lisina, treonina, arginina, metionina y ácido aspártico que las otras proteínas del grano. Las kafirinas son altas en ácido glutámico y en aminoácidos no polares como leucina, prolina y alanina pero son bajas en metionina, lisina, triptófano, arginina, histidina y glicina, el contenido de kafirinas está asociado con el contenido total de proteína en la semilla. Las glutelinas presen-

... tan contenidos más altos de lisina, histidina, arginina y glicina que las kafirinas (Virupaksha y Sastry, 1968).

Como la lisina, treonina y metionina son los aminoácidos esenciales más deficientes en el cereal, se ha visto que las albúminas y globulinas son las de mejor valor nutritivo, las glutelinas son intermedias y las kafirinas las más pobres. Así las altas cantidades de kafirinas en el grano son responsables del bajo valor nutritivo del sorgo. (Virupaksha y Sastry, 1968).

En general las proteínas del sorgo son bajas en lisina, treonina, metionina, arginina, histidina, glicina y tirosina. Pero contienen grandes cantidades de leucina, ácido glutámico, prolina y ácido aspártico. Lisina y treonina son el primero y el segundo aminoácidos limitantes respectivamente (Taira, 1964).

La distribución de lisina está correlacionada negativamente con el contenido proteínico, mientras que el ácido glutámico está correlacionado positivamente. A causa de esto la cantidad de proteína en el sorgo es baja por ser la lisina el primer aminoácido limitante (Taira, 1964).

La distribución y la proporción de los diferentes tipos de proteínas en la semilla es variable. Las kafirinas están prácticamente ausentes en el embrión y la corteza y son predominantes en el endospermo. La aleurona es rica en albúminas y globulinas. La periferia del endospermo córneo contiene kafirinas en abundancia, el germen presenta la mayor cantidad de proteína siguiéndole el endospermo córneo, después el endospermo harinoso y por último la cubierta (Wall y Ross, 1970).

Se ha visto que el contenido de proteínas y aminoácidos puede verse influido por el efecto de fertilizantes; de manera que éstos incrementan la proporción de ácido glutámico, prolina, alanina, isoleucina, leucina y fenilalanina; mientras que disminuyen la de lisina, histidina, arginina, treonina y glicina. Los fertilizantes nitrogenados incrementan los depósitos de kafirinas en el grano (Wall y Ross, 1970).

III.1.5.5 Pigmentos Fenólicos

El grano de sorgo presenta una serie de compuestos fenólicos que le confieren una coloración específica; estos compuestos incluyen flavonoides, glicósidos cianogénicos, taninos y ligninas. Sin embargo, muchos autores consideran a los flavonoides y glicósidos cianogénicos como taninos por presentar características fenólicas y ser hidrosolubles, con un peso molecular entre 500 y 3000 g/g mol y precipitar alcaloides y proteínas.

Los taninos se dividen generalmente en dos tipos :

- 1) Taninos hidrolizables que son ésteres de azúcares y ácidos fenólicos o de sus derivados, los que pueden ser hidrolizados fácilmente por medios químicos o enzimáticos.
- 2) Taninos condensados o no hidrolizables que son mezclas de productos de condensación de moléculas de tipo flaván combinadas en dímeros, trímeros o polímeros. Los flavonoides más importantes que los forman son los flavan-3-oles o catequinas y los flavan-3-4-dioles o leucoantocianidinas. Estos taninos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se forman como producto de la condensación de las catequinas y las leucoantocianidinas (Cejudo, 1978).

Los principales taninos que se presentan en el grano del sorgo son del tipo de los condensados, se localizan en el pericarpio y están asociados con la pigmentación de la testa. En las células vegetales los taninos generalmente se encuentran asociados a vacuolas, protegiendo al protoplasto contra la desecación, putrefacción y destrucción por microorganismos y hongos (Cejudo, 1978).

Los taninos se encuentran en semillas oscuras cafés en un rango de 1.3 a 2% comparado con el rango de 0.2 a 0.4% en otras variedades no oscuras (Barham, et al., 1946).

Otra característica de los taninos es que forman complejos con proteínas y otros polímeros como la celulosa y la pectina. Este tipo de complejos se forman de tres maneras :

1) Formación de puentes de hidrógeno entre el grupo oxhidrilo -- (-OH) de los fenoles que constituye la estructura de las leucoantocianidinas y los grupos receptores del polímero o proteína (-NH, -CO, -OH).

2) Enlaces iónicos entre los grupos aniónicos de los taninos (fenoles ionizados o grupos carboxilos) y los grupos catiónicos de los aminoácidos de las proteínas, como el grupo amino-amino de la lisina.

3) Enlaces covalentes formados por la unión entre quinonas (las que pueden estar formando parte de la estructura del tanino o pueden ser producidos por oxidación), y grupos reactivos en la proteína u otro polímero y que presentan gran estabilidad en el complejo tanino proteína (Chavan et al., 1979).

También se ha visto que los taninos cambian su comportamiento a diferentes pH (Hagerman y Butler, 1981).

III.1.5.6 Pigmentos no fenólicos

El grano de sorgo en general contiene pigmentos en el endospermo. Los principales pigmentos no fenólicos que hay en las distintas variedades de sorgo son los carotenos y las xantofilas. El sorgo amarillo llega a tener de estos pigmentos hasta 10 ppm y las variedades comunes 1.5 ppm de carotenoides. Las xantofilas se presentan en menor proporción (Wall y Ross, 1970).

III.1.5.7 Vitaminas

Manifiesta las mismas cantidades de riboflavina y piridoxina que el maíz, más ácido pantoténico, ácido nicotínico y biotina. Los niveles de tiamina y niacina son similares a los de trigo y arroz, aunque es pobre en riboflavina (Tanner et al., 1947) (Tabla No. 1). La mayor parte de las vitaminas se encuentran en el embrión.

TABLA No. 1

VITAMINAS EN EL SORGO Y EN EL MAIZ

	+ SORGO	* MAIZ	
RIBOFLAVINA	0.93	1.3	mg/kg
ACIDO NICOTINICO	25.9	22	mg/kg
ACIDO PANTOTENICO	4.6	5.7	mg/kg
COLINA	----	620	mg/kg
VITAMINA B ₁₂	----	No significativa	
PIRIDOXINA	6.9	7	mg/kg
BIOTINA	0.09	0.06	mg/kg
ACIDO FOLICO	----	0.36	mg/kg
VITAMINA E (Alfa-tocoferol)	----	22	u. i./kg

* Wall y Ross, (1970).

+ Matz, (1959).

III.1.5.8 Minerales

Contiene mayor proporción de fósforo, magnesio, potasio y silicio; menores de calcio y sodio y restos de algunos otros en proporciones de 0.5 a 150 ppm (Pinta y Busson, 1967).

III.1.5.9 Hormonas

Exhibe sustancias reguladoras del crecimiento (hormonas) tales como auxinas (ácido indolacético) y giberelinas en bajas cantidades -- (Wall y Ross, 1970).

III.1.6 Variedades y Usos

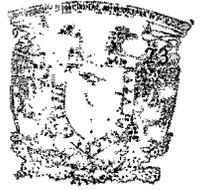
El sorgo presenta una amplia variedad en la coloración de sus semillas que van desde el blanco hasta el café rojizo oscuro con gradua ciones intermedias de rosa, rojo, amarillo, café, gris y otros colores. Estas coloraciones están dadas por los pigmentos en el pericarpio y la testa con genes específicos para la determinación de la pigmentación de cada uno.

La presencia de pigmentos en la semilla es una característica dominante (Wall y Ross, 1970).

Las variedades de color café son usadas para hacer cerveza en Africa. No obstante, estas coloraciones han sido indeseables por su amargura, además de que reducen el aumento de peso de animales en crecimiento debido a la poca disponibilidad proteínica que originan los

... pigmentos fenólicos, aún así, éstas resisten mejor el ataque de hongos y aves en climas húmedos. La ausencia de taninos determina el color blanco del sorgo, ésto aunado a su valor nutritivo permite que se utilice como alimento humano (Wall y Ross, 1970).

El sorgo rojo es utilizado en Estado Unidos y en México - para alimento de aves y ganado (FAO/WHO, 1965).



III.2 Rhizopus oligosporus, Saito

BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

Es un hongo verdadero que presenta zigosporas como estructuras de resistencia, durante su reproducción sexual, por lo que se le clasifica dentro de las Zigomycetes en el Orden de los Mucorales y a la Familia Mucoraceae (Müller y Loeffler, 1976).

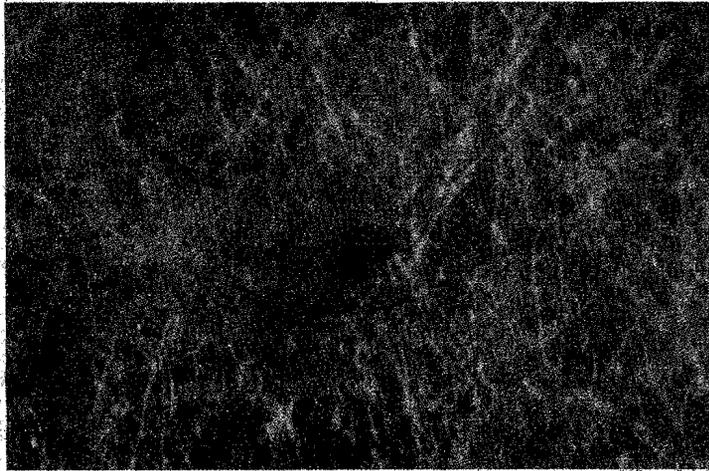


Figura No. 5

Micelio algodonoso de Rhizopus oligosporus.

BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

Es un hongo que forma un micelio algodonoso constituido por hifas no septadas polinucleadas con estolones y rizoides pobremente desarrollados (Figs. 5 y 6). Presenta como estructuras de reproducción asexual esporangióforos cortos que emergen cuando los rizoides se han formado. Los esporangios son largos y usualmente negros con

... una columela hemisférica y una apófisis en forma de copa en la base del esporangio, las esporangiosporas son sésiles y se encuentran en la cavidad esporangial (Müller y Loeffler, 1976) (Fig. 7).



Figura No. 6

Hifas no septadas de Rhizopus oligosporus observadas en contraste de fases 100 x.

La reproducción sexual se presenta muy raramente y sólo - con determinadas condiciones externas como es el hecho de la probabilidad de unión de dos talos compatibles, o sea un micelio de tipo "más" y otro de tipo "menos". En la línea de contacto de las dos colonias se desarrollan ramas laterales denominadas zigóforos que se unen en las puntas y se amplían, después en cada zigóforo se forma un septo que separa un gametangio tetranuclear de un suspensor. La pared entre los dos gametangios se disuelve, las masas del plasma y los núcleos se mezclan y la célula de fusión se rodea de una pared de varias capas. Madura esta célula y se convierte en una

... espora de resistencia llamada zigospora que cuando se presentan condiciones ambientales favorables vuelve a formar un micelio.

Es un hongo que en condiciones naturales vive en suelos forestales como saprófito (Müller y Loeffler, 1976)

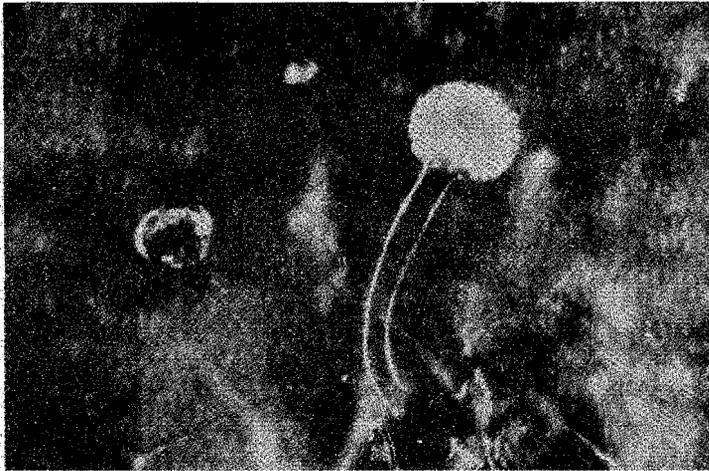


Figura No. 7

Esporangio de Rhizopus oligosporus observado en campo oscuro 100 x.

Rhizopus oligosporus puede usar carbohidratos como xilosa, glucosa, galactosa, celobiosa, trehalosa y almidones solubles, sin embargo no aprovecha la lactosa, rafinosa, inulina o eritrol. Como fuente de nitrógeno puede recurrir al sulfato de amonio y a la asparagina, ésta última le sirve también como fuente de carbono - - - (Sorenson y Hesseltine, 1966).

Presenta poca actividad amilolítica y proteolítica, pero se sabe que presenta proteasas que rompen las proteínas de la soya. Su actividad lipolítica es bastante alta y presenta pectinasas - - (Sorenson y Hesseltine, 1966).

Aunque es un hongo microaerofílico presenta crecimiento de tipo aeróbico ya que requiere oxígeno para su propio crecimiento, - aunque sus requerimientos sean bajos (Hesseltine, 1966).

Se ha visto que el crecimiento óptimo en el laboratorio en un medio de papa-dextrosa agar (DIFCO) es a los 6 días a una temperatura de 31°C por 15 ó 16 horas seguido de 6 ó 7 horas a 28°C en un sustrato de 2.5 cm de profundidad (Nelson y Richardson, 1967).

III.3 FERMENTACION

III.3.1 Generalidades

Las investigaciones acerca de las fermentaciones sólidas han sido principalmente enfocadas a aumentar el contenido proteínico de sustratos que presentan grandes cantidades de almidón o celulosa. También, aunque en menor grado, se han utilizado para la producción de enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, moléculas orgánicas y producción de esporas de hongos.

Se debe entender el fenómeno de la fermentación, como un ataque enzimático que realiza un microorganismo sobre un sustrato orgánico, aprovechando la energía que obtiene en estas reacciones, y que es el sentido general que se le da a este proceso y no al - estricto usado anteriormente que se entendía como un proceso anaerobio por el cual un microorganismo obtiene su energía (Gómez, et al., 1982).

Para producción de proteínas. los hongos pueden, debido a su crecimiento micelial, desarrollarse en los espacios más ricos en nutrientes y en algunos casos penetrar el sustrato sólido; el crecimiento se lleva a cabo produciendo nueva proteína a partir de la - proteína del sustrato original y de las fuentes de nitrógeno añadidas al medio (Senez et al., 1979).

III.3.2 Fermentaciones tradicionales

Los productos de las fermentaciones de leguminosas y gramíneas como sustrato principal o básico son alimentos de consumo humano bastante usados en países del sureste de Asia desde hace miles de años. La soya y el arroz son los principales granos utilizados en estas fermentaciones, aunque algunas se hacen mixtas con trigo (Hesseltine, 1965).

Las principales fermentaciones son el Shoyu o salsa de soya y el Miso o pasta de soya utilizadas en Japón; el Sufu o queso chino; el Tempeh en Indonesia, China y Filipinas; el Natto, el arroz rojo chino, el Nata y otras clases de alimentos fermentados (Nelson y Richardson, 1967).

Estos productos han sido utilizados como saborizantes o como alimentos de la dieta cotidiana, ya que son una fuente proteínica bastante buena debido a que, las fermentaciones incrementan tanto la cantidad como la digestibilidad de las proteínas de los cereales. -- Por otra parte, los organismos que realizan la fermentación normalmente no permiten que crezcan otro tipo de organismos que producen toxinas (Nelson y Richardson, 1967).

Así, los organismos que intervienen en las diferentes fermentaciones están caracterizados por su crecimiento veloz y su abundante producción de enzimas (Nelson y Richardson, 1967).

Aspergillus oryzae es la principal especie presente en el Shoyu y en el Miso, A. soyae también se utiliza en el Shoyu. Saccharomyces rouxii está presente en el segundo paso de la fermentación del Miso ; aunque algunas especies de géneros como Lactobacillus y

... Hansenula también pueden estar involucradas. Especies de los géneros Actinomucor y Mucor son utilizadas en la fermentación del -- Sufu. Varias especies de Rhizopus se han encontrado en la fermentación del Tempeh.

Rhizopus oryzae, Chlamydomucor oryzae y Hansenula anomala son las principales especies en la producción del Ragi. Monascus purpureus produce cambio de sabor y da el color rojo oscuro del Angkak. El Ragi es hecho con harina de arroz fermentada con mucorales y leva duras y sirve como harina para otros platillos y bebidas (Nelson y Richardson, 1967).

III.3.2.1 TEMPEH

El tempeh es un producto que se obtiene a través de la fermentación de la soya por medio del hongo Rhizopus oligosporus. A continuación se da una breve descripción del origen y forma de elaborar este alimento: Es originario de Indonesia y actualmente también es utilizado en Nueva Guinea y Surinam a nivel casero, en Holanda y en los Estados Unidos como producto exótico o vegetariano. Consiste en soya lavada y remojada por una noche a una temperatura aproximada de 25°C. Después se le quita la cáscara con la mano y se hierve durante una hora, se enfría, se escurre y se parten sus dos cotiledones poniéndolo a fermentar con un pedazo de tempeh anterior. La fermentación se lleva a cabo generalmente en hojas de plátano de un día para otro, teniendo el tempeh un aspecto pastoso debido al desarrollo del micelio blanco de Rhizopus. Hoy en día en los lugares mencionados se fabrica el tempeh a nivel industrial (Shurtleff y Aoyagi, 1980).

El tempeh tiene un olor característico que se parece al de la levadura y con apariencia de queso fresco. El tempeh se come en Indonesia frito o guisado en diversas formas. Frito adquiere un sabor de cacahuete o papa frita (Shurtleff y Aoyagi, 1980).

Su calidad nutritiva es bastante alta ya que contiene 19.5% de proteínas en peso húmedo y más del 40% en base seca (Shurtleff y Aoyagi, 1980).

El principal hongo utilizado en esta fermentación es Rhizopus oligosporus, sin embargo, en estudios hechos con tempeh elaborado en condiciones caseras se han encontrado otras especies del género Rhizopus tales como: R. stolonifer, R. arrhizai, R. oryzae, R. formosaensis y R. achamydosporus. En algunos casos, se ha encontrado una variedad no patógena de Klebsiella pneumoniae, este organismo es capaz de sintetizar vitamina B-12 y proporcionársela al tempeh (Hesseltine, 1962).

La fermentación a nivel industrial es más minuciosa ya que se controlan todos los parámetros, produciéndose y realizándose ciertas variaciones dependiendo del fabricante: se limpia la soya, se lava y remoja, se calienta a 100°C o se deja a temperatura ambiente, se drena y se pela húmeda, se hierva en agua acidificada con ácido láctico o acético a un pH de 2.5 a 3.5 durante un período entre 45 y 60 minutos, se drena nuevamente y se deja enfriar, se procede a inocular con Rhizopus oligosporus previamente desarrollado en otro medio de cultivo para su producción de esporas o algún cultivo mixto, mezclándolo en moldes, bolsas de plástico u hojas de plátano poniéndolo entre 25° y 37°C y con una humedad entre el 70 y el 85% que favorece la difusión de oxígeno (Shurtleff y Aoyagi, 1980).

III.3.2.2 Cambios durante la fermentación del tempeh

Grandes cantidades de proteínas son hidrolizadas en amino-ácidos libres. La proporción de lisina y de metionina se reduce en fermentaciones largas. El nitrógeno total permanece constante, pero el nitrógeno soluble se incrementa considerablemente. En estados tardíos de la fermentación se produce amoníaco (Sorenson y Hesseltine, 1966).

Una tercera parte de las grasas neutras son hidrolizadas a ácido palmítico, esteárico, oleico, linolénico y linoleico, este último es el que más se produce y es el único que utiliza Rhizopus (Sorenson y Hesseltine, 1966).

Con respecto a los carbohidratos las sustancias reductoras decrecen produciendo pequeños cambios de pH hacia el lado básico. La hemicelulosa disminuye. Las enzimas lipasas y proteasas se presentan en grandes cantidades, no así las amilasas y las pectinasas que sólo se encuentran en pequeñas cantidades. Hay pérdidas de peso seco aproximadamente en un 4%. El contenido de humedad en el producto varía entre 55 y 65%. El total de sólidos solubles en agua se incrementa durante la fermentación (Sorenson y Hesseltine, 1966).

Estudios citológicos demuestran que la mayoría del crecimiento se da en la superficie de la soya con relativamente poca penetración (Sorenson y Hesseltine, 1966).

III.4 NUTRICION ANIMAL

Para que los animales, incluyendo al hombre, puedan crecer y conservarse deben de tener fuente adecuada de proteínas en su alimentación. Las proteínas son componentes clave de todos los seres vivos y están presentes en las células como compuestos estructurales, como anticuerpos, enzimas y hormonas. Son compuestos indispensables del núcleo y protoplasma de todas las células y son casi la única forma en que el hombre repone el nitrógeno; las proteínas son las más abundantes de los compuestos orgánicos de los seres vivos en general, y tienen funciones importantes y esenciales en ellos, por esto es patente la importancia que tiene en los animales, la calidad y cantidad de proteínas en su dieta diaria (Krause y Hunscher, 1972).

Las proteínas que presentan todos los aminoácidos esenciales para cada animal se conocen como "proteínas completas", para ser consideradas como tales deben suministrarse en cantidad suficiente y en la relación correcta para mantener el equilibrio de nitrógeno y promover el crecimiento; ejemplos de estas proteínas son: la ovalbumina, la caseína y las proteínas de la "carne". Las que no completan estos requerimientos son llamadas "proteínas incompletas" y son incapaces de reemplazar o construir nuevos tejidos, como por ejemplo: La zeína del maíz (Krause y Hunscher, 1972).

Las proteínas de los cereales se consideran como proteínas parcialmente incompletas, sólo el germen de trigo presenta proteínas completas (Krause y Hunscher, 1972).

Para que sean utilizadas las proteínas deben ser digeridas (disociadas en aminoácidos) y transportadas por la sangre a las células

... las. Cada célula utiliza los aminoácidos disponibles para sintetizar todas las proteínas que requieren sus funciones y para hacer uso de los aminoácidos que le proporcionan energía. Además algunas células del hígado, sintetizan proteínas y sustancias nitrogenadas no proteínicas que son requeridas para el funcionamiento del metabolismo animal (Mitchell, et al., 1970. Robinson, 1978).

Hablar del metabolismo proteínico es ver qué sucede en los organismos con los aminoácidos derivados de la dieta. En general, - se dan dos tipos diferentes de aminoácidos, por un lado los aminoácidos esenciales que son aquellos que no pueden ser sintetizados -- por los animales, y por otro los no esenciales que sí pueden ser sintetizados. El hombre requiere de ocho aminoácidos esenciales que son: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y la histidina, que se cree sea esencial únicamente durante el desarrollo (Krause y Hunscher, 1972).

El cuerpo del hombre adulto contiene alrededor de 10 Kg. de proteína. Por medio de aminoácidos o de sales de amonio marcadas con N²⁵, se ha llegado a la conclusión de que hasta un 3% (300 g) de esta proteína puede ser reemplazada diariamente (Munro, 1969).

Los requerimientos del lactante son de 0.24 g/100 g de nivel de recambio, reduciéndose a 0.14 g/100 g al año de edad, disminuyen -- progresivamente durante la niñez hasta llegar al adulto. Estos -- valores son aceptados sólo si las necesidades energéticas son completas (Munro, 1969).

Los valores requeridos de aminoácidos esenciales para la dieta diaria de humanos se observan en la Tabla No. 2.

TABLA No. 2

PATRON PROVISIONAL DE LA FAO PARA REQUERIMIENTOS
DE AMINOACIDOS ESENCIALES EXPRESADO EN g/100 g
DE PROTEINA *

VALINA	1.7
ISOLEUCINA	4.3
TREONINA	3.3
TRIPTOFANO	1.1
FENILALANINA	2.9
LEUCINA	4.9
LISINA	4.3
METIONINA	1.7
CISTEINA	1.7
TIROSINA	2.5

* FAO/WHO, 1965

La importancia de las aves de corral (Gallus sp) estriba principalmente en su utilidad como alimento para el hombre, ya que durante su desarrollo tienen diferentes precisiones de proteína. Existe una relación entre la energía metabólica fecal y la energía urinaria endógena, la cual establece los niveles de energía metabolizable. -- Las diferencias entre estos dos tipos de energía son mínimas cuando están cercanos los valores a sus niveles de ingresos proteínicos -- máximos. Con base en estas observaciones se establecen sus necesidades de proteína; por otro lado éstas son afectadas también por los cambios ambientales de temperatura (Merck, 1981).

Los aminoácidos esenciales y sus cantidades para pollos de engorda y gallinas ponedoras se presentan en las Tablas No. 3 y 4. Aunque la glicina puede ser sintetizada por las aves de corral tiene que haber suficiente serina dietética para satisfacer esta necesidad. La cisteína y la tirosina se consideran esenciales aún cuando pueden ser sustituidas en la dieta por metionina y fenilalanina. Se dan también dos relaciones importantes entre aminoácidos individuales y vitaminas en la formulación práctica del alimento, la metionina puede ahorrar colina como donante de grupos metilo, y el triptófano puede ser usado para sintetizar niacina (WHO, 1973).

TABLA No. 3

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA POLLOS DE ENGORDA,
HEMBRAS Y MACHOS DE INICIACION (1a.-4a. Semana) Y DE
CRECIMIENTO (5a.-8a.Semana) EXPRESADO EN g/100 g DE
PROTEINA *

	INICIACION 1a.-4a.Sem. Machos	CRECIMIENTO 5a.-8a.Sem. Machos	INICIACION 1a.-4a.Sem. Hembras	CRECIMIENTO 5a.-8a.Sem. Hembras
Valina	.360	.932	.342	.720
Isoleucina	.313	.869	.298	.879
Treonina	.295	.763	.277	.583
Triptófano	.082	.222	.079	.169
Fenilalanina	.295	.763	.277	.583
Leucina	.586	1.515	.558	1.640
Lisina	.417	1.081	.396	.752
Metionina	.169	.434	.158	.339
Histidina	.169	.434	.158	.339
Cisteína	.126	.328	.118	.254
Tirosina	.252	.657	.237	.477
Arginina	.417	1.080	.396	.837
Cantidad diaria proteínas en %	23.5	20	22.1	17.8

* WHO, 1973

TABLA No. 4

NECESIDADES DIARIAS DE AMINOACIDOS PARA GALLINAS PONEDORAS
DE 20 A 50 SEMANAS DE EDAD EXPRESADAS EN g/100 g DE PRO -
TEINA EN CLIMA CALIDO Y FRIO. *

	<u>20-30 SEM.</u> <u>CLIMA FRIO</u>	<u>20-30 SEM.</u> <u>CLIMA CALIDO</u>	<u>30-40 SEM.</u> <u>CLIMA FRIO</u>	<u>30-40 SEM.</u> <u>CLIMA CALIDO</u>	<u>40-50 SEM.</u> <u>CLIMA FRIO</u>	<u>40-50 SEM.</u> <u>CLIMA CALIDO</u>
VALINA	.83	.78	.85	.75	.81	.73
ISOLEUCINA	.83	.78	.85	.76	.81	.73
TREONINA	.57	.54	.58	.52	.55	.50
TRIPTOFANO	.16	.15	.17	.15	.16	.14
FENILALANINA	.72	.68	.74	.66	.70	.63
LEUCINA	1.24	1.17	1.27	1.14	1.21	1.09
LISINA	.66	.62	.68	.61	.64	.58
METIONINA	.33	.31	.34	.30	.32	.29
HISTIDINA	.31	.29	.31	.28	.30	.27
CISTEINA	.26	.25	.27	.24	.26	.23
TIROSINA	.31	.29	.32	.28	.30	.27
ARGININA	.83	.78	.85	.76	.81	.73
% PROTEINA DE LA DIETA DIARIA	18	18	16	16	15	15
REQUERIMIENTOS DIARIOS DE ALI MENTO EN GRANOS (PROMEDIOS)	103.5	98	106	95	101	91

* WHO, 1973.

El puerco (Sus scrofa) puede sintetizar muchos aminoácidos, sin embargo, algunos de ellos no pueden ser sintetizados a velocidad suficientemente rápida para un crecimiento normal y tienen que ser administrados a la dieta.

Los aminoácidos esenciales para los puercos en crecimiento son: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, - fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Se presenta la Tabla -- No. 5 con los porcentos de proteína y aminoácidos para cerdos con diferentes pesos (Agricultural Research Council, 1981).

TABLA No. 5

NECESIDADES DE AMINOACIDOS ESENCIALES PARA PUERCOS
(Sus scrofa) DADO EN g/100 g DE PROTEINA *

VALINA	7.0
ISOLEUCINA	3.8
TREONINA	4.2
TRIPTOFANO	1.0
LEUCINA	7.0
LISINA	7.0
HISTIDINA	2.3
Met + Cys	3.5
Phe + Tyr	6.7

* Agricultural Research Council, 1981.

La lisina es el principal aminoácido con el cual se refiere a otros aminoácidos en términos de concentración de proteína para -- alimentación de los puercos, que debe ser de 0.7 g/100g de proteína, por lo tanto, si la lisina no se da en cantidad suficiente, bajan -- los límites del valor nutritivo (Agricultural Research Council, 1981).

La estimación aproximada para los puercos es de 40.4 g/100g de proteína y de 60 g/100g con aminoácidos no esenciales (Merck, 1981).

Las cantidades de proteína que necesitan las ovejas (Ovis -- aries) varían según el peso corporal dándose 9.6 g/100g con 20 Kg. de peso y 19.6 g/100g con 30 Kg de peso. Los ovinos pueden aprovechar -- nitrógeno no proteínico tal como urea y fosfato de amonio en proteína dentro del rumen (Ver tabla No. 6) (Jurgens, 1974).

TABLA No. 6

PORCENTAJES DIARIOS DE AMINOACIDOS REQUERIDOS POR OVEJAS
(Ovis aries) DADO EN g/100 g DE PROTEINA *

LISINA	2.5
METIONINA	1.1
HISTIDINA	0.8
CISTEINA	1.3
ARGININA	3.0
PROTEINA %	13

* Jurgens, 1974

Aún cuando se produce síntesis de aminoácidos en el ciego y en el intestino grueso de los caballos (Equus caballus), debe suministrarse proteína en su dieta. El caballo joven necesita mayor cantidad de proteína que el caballo adulto. Se debe aumentar la proteína en las razas de mayor peso (Ver tabla No. 7) (Merck, 1981).

Son pocos los estudios que hay acerca de los aminoácidos esenciales para el caballo, sólo se sabe que los caballos de destete requieren de 0.6% a 0.7% de lisina y los añejos 0.4% de lisina en la dieta diaria. Las cantidades de proteína para ponies y caballos se dan en la Tabla No. 7.

El perro (Canis familiaris), requiere un mínimo de proteína de un 20% de las calorías totales de la dieta necesitándose .96 kg/100g para cachorros y .48g/100g para la manutención diaria del adulto (Merck, 1981).

Para el gato (Felis doméstica), se necesita por lo menos 0.2 g/100g de proteína o sea el 28% de Kg de la dieta diaria en base seca (Merck, 1981).

Debido a las proporciones óptimas de los aminoácidos se han diseñado patrones de la composición ideal para propósitos nutricionales, los cuales van a estar determinados por la cantidad de aminoácidos que estén en mayor o menor proporción dentro de una proteína.

También la calidad nutricional de una proteína puede ser comprobada biológicamente por medio de la razón de eficiencia proteínica, que es la ganancia en peso de las ratas por peso de proteína.

... ingerida, o el número de microorganismos que crecen en una colonia por cantidad de proteína ingerida, o el número de individuos que crecen en una colonia por cantidad de proteína suministrada al medio. -- Esto nos permite observar qué tanta proteína puede ser aprovechada por estos organismos al agregarla a su dieta, o al medio de cultivo en el que se desarrollen (Merck, 1981).

TABLA No. 7

CANTIDAD DE PROTEINA QUE NECESITA DIARIAMENTE EL CABALLO (*Equus caballus*) DE DIFERENTES PESOS A 12 Y 24 MESES DE DESARROLLO Y SU CANTIDAD DE DIETA DIARIA *

<u>EDAD MESES</u>	<u>PESO (Kg)</u>	<u>g DE PROTEINA</u>	<u>TOTAL EN g DIETA DIARIA</u>
12	140	350	3200
12	265	600	3500
12	325	760	6650
12	385	900	7500
24	185	300	3450
24	365	520	5950
24	450	630	7350
24	540	740	8200

* Merck, 1981.

IV. METODOLOGIA

IV.1 GENERALIDADES

A fin de obtener las condiciones necesarias para llevar a cabo la fermentación, se hicieron extracciones de los taninos presentes en el sorgo por medio de un tratamiento térmico-alcalino variando -- las concentraciones de NaOH para tener una disponibilidad de la proteína del grano, ya que como se menciona anteriormente, estas proteínas interactúan con los taninos impidiendo que haya una disposición de las mismas, con este tratamiento se deja a las proteínas aptas -- para que sirvan como sustrato básico en la fermentación.

Se realizaron algunos análisis al sorgo incluyendo determinaciones de proteína (métodos de Biuret y Kjeldahl)*, lípidos (método de Soxhlet)*, almidones (método de Faibairn)*, y contenido de aminoácidos (método de Stein y Moore)*, a fin de conocer las condiciones iniciales de la fermentación. De igual manera se aplicaron las mismas pruebas al hongo Rhizopus oligosporus, desarrollado en un medio líquido.

En trabajos previos donde se fermentó el sorgo con R. oligosporus (Hesseltine et al., 1967), no se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que el hongo se desarrollaba pobremente. Por ésta razón, no se conocían las condiciones necesarias para lograr el crecimiento de Rhizopus en este sustrato. De ahí que hubiera de tomarse como referencia un medio que reuniera mejores características para el crecimiento del mismo como es el caso de la soya.

Los estudios para la fabricación del tempeh, son muy conocidos, sin embargo existen grandes diferencias entre la composición química de la soya y el sorgo (Wall y Ross, 1970). Durante el experimento se observó como iban afectando cada una de las condiciones el desarrollo del microorganismo, tomando en cuenta que Rhizopus produjera la mayor cantidad posible de micelio, sin provocar esporulación.

En la realización de este experimento se utilizaron lotes de 5 cajas cada vez que se probaba fermentar al sorgo, efectuando cambios en las condiciones hasta obtener las apropiadas donde hubiera producción de micelio en la mayor parte del sustrato. Esta investigación reporta las cualidades para la fermentación por separado con objeto de conocer mejor el comportamiento del hongo en un medio con bajas cantidades de lípidos y altas concentraciones de carbohidratos, así como saber, si era capaz de adaptarse a este nuevo sustrato.

Las condiciones controladas fueron temperatura, tiempo de incubación, pH, humedad, tamaño de partícula del sorgo, tamaño de inóculo, condiciones de esterilidad, gelatinización, desempaque, aireación y - cantidad de nutrientes agregados al medio.

Cuando se obtuvieron las condiciones adecuadas y se percibió, desarrollo del micelio en todo el sustrato fue entonces cuando se hicieron pruebas, para determinar si había o no incremento proteínico ya que era el principal objetivo de este trabajo.

También se realizaron pruebas para conocer el contenido de almidones (método de Faibairn)*, y lípidos (método de Soxhlet)*, después de fermentar el sorgo.

Por último se hizo una valoración de aminoácidos (aminograma)

* Ver apéndice I

... (método de Stein y Moore)* para saber el balance cualitativo y cuantitativo de éstos en el contenido de la nueva proteína.

Una vez reunidas las condiciones de la fermentación y realizadas las pruebas del contenido del alimento se probó una escala a nivel de reactor biológico, tomando como base los parámetros de la fermentación a nivel de caja Petri, variando las características necesarias para obtener un producto con las mismas cualidades que a nivel de laboratorio.

Las técnicas utilizadas para determinar la cantidad de proteínas, almidones, grasas y aminoácidos en el sorgo, en el hongo y en el producto fermentado se describen en el Apéndice I. Las técnicas para el desarrollo del hongo, el tratamiento de la semilla y las condiciones iniciales para la fermentación del sorgo y sus valoraciones se describen a continuación.

IV.2 EXTRACCION DE TANINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS

Como indica Price et al., (1979) los tratamientos alcalinos realizados en granos de sorgo para la extracción de taninos permiten a las proteínas del grano estar en disposición de ser aprovechadas al reducirse por estos tratamientos las interacciones entre los taninos y las proteínas de la semilla. Por otro lado, las pruebas realizadas por Blessin et al., (1962) para la eliminación de taninos, demostraron que sometiendo el grano de sorgo a un tratamiento alcalino con NaOH al 20%, a una temperatura de 20°C y en un tiempo que varía entre 4 y 8 minutos se podía extraer una cantidad apreciable de taninos al remover el pericarpio del grano, que es la capa

.. que contiene un mayor porcentaje de éstos. Mediante el procedimiento anterior se evita el daño al endospermo y al embrión, conservándose también, casi en su totalidad, los niveles de proteínas, almidones, cenizas y extractos de éter que contiene.

Con base en estos estudios y con los datos conseguidos por Alvarez y Escalona (1982) en el que utilizaron tratamientos alcalinos con NaOH a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20%); a una temperatura de 50°C; durante 10 minutos y con agitación constante, se reportó la cantidad de taninos y compuestos fenólicos extraídos así como los porcentajes de proteínas, almidones y extractos de éter de la semilla, obtenidos antes y después de los tratamientos. A continuación se lavó el grano varias veces para eliminar el exceso de NaOH hasta que las aguas de lavado estuvieran casi transparentes, se bajó el pH con ácido láctico concentrado, adicionándolo a las aguas de lavado hasta obtener un pH de 3.5. Posteriormente se drenó el agua, se extendió el sorgo en charolas y se sometió a secado en la estufa con aireación a una temperatura de 50°C durante 24 hs.

IV.3 OBTENCION DE MICELIO DE *Rhizopus oligosporus* EN MEDIO LIQUIDO.

Para obtener una cantidad suficiente de micelio con el fin de saber que porción de proteína sintetiza el hongo a partir de nitrógeno, así como la cantidad de grasa y aminoácidos, se prepararon 5 lotes donde se desarrolló al hongo en iguales condiciones, en un medio líquido rico en fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla No. 8) a una temperatura de 32°C durante 48 hs en agitación. El medio de cultivo fue previamente esterilizado a 15 psig durante 15 minutos e inoculado con esporas del hongo crecidas previamente en papa dextrosa agar - - (Difco). Se utilizó la cepa NRRL-2710 de *R. oligosporus* para todos los

... procesos de este trabajo.

El hongo se desarrolló hasta obtener pelotillas de micelio de aproximadamente 1 cm. de diámetro.

TABLA No. 8

MEDIO LIQUIDO PARA EL CRECIMIENTO DE Rhizopus oligosporus *

Extracto de malta	10.00 g.
Extracto de levadura	0.10 g.
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	2.00 g.
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1.40 g.
Urea	0.30 g.
$\text{K}_2 \text{HPO}_4$	0.30 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30 g.
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.40 g.
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00 mg.
$\text{Mn SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.64 mg.
$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.90 mg.
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.80 mg.
Agua destilada	1.00 l.

* González, 1978.



Una vez formadas las pelotillas de micelio, se lavaron 3 veces con 200 ml de agua destilada, se filtraron al vacío y se secaron a la estufa durante 24 hs a 60°C, quedando listo para las pruebas que se le realizaron.

IV.4 PROCESO DE FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI

IV.4.1 GENERALIDADES

Como se mencionó en el punto IV.1 se experimentó variando la totalidad de los parámetros con el fin de obtener el mejor crecimiento de micelio de R. oligosporus y así incrementar, tanto la cantidad como la calidad de proteína producida por el hongo a partir de una fuente de carbono, como es el almidón presente en el sorgo, y una fuente de nitrógeno que es agregada al medio de la fermentación.

IV.4.2 TEMPERATURA

La temperatura es uno de los principales factores que afectan a las fermentaciones (Sorenson y Hesseltine, 1966). Las temperaturas usadas para la fabricación del tempeh de soya, varían desde 25°C hasta 37°C. En estudios hechos por Stinkraus et al., 1960, para la producción de tempeh de soya a nivel comercial, se utilizaron tres diferentes temperaturas (25°C, 31°C y 37°C) obteniéndose buenas fermentaciones; es necesario aclarar que con temperaturas de 25° y 37°C las condiciones presentaron características especiales que dificultaron la producción del fermentado, por esta razón los valores utilizados para nuestro experimento oscilaron entre los 28° y 34°C.

IV.4.3 TIEMPO DE INCUBACION

El tiempo, fue otro de los parámetros que se varió tomando - como referencia el crecimiento que el hongo presenta en la soya según datos reportados por Ceballos, et al., (1981) (22 hs, a nivel de caja Petri y 36-48 hs a nivel industrial).

IV.4.4 pH

El siguiente parámetro que se varió fue el pH que va desde 3.5 hasta 5, ya que como es un sustrato nuevo en el que no hay literatura reportada, se tomaron como referencia las condiciones dadas para la fermentación de la soya, en la que se maneja un pH que va desde - 2.5 hasta 5.3 (Ceballos et al., 1981) aunque Hesseltine (1965) menciona también que el hongo durante la fermentación de la soya presenta - un crecimiento óptimo con un pH desde 3.5 hasta 7.6 .

Otra de las razones por las que se varió el pH es que en un medio sólido no se puede medir realmente el pH sino que únicamente se mide el pH del líquido agregado al medio.

El pH del líquido agregado, fue medido con un potenciómetro "Swift",

IV.4.5 HUMEDAD

La humedad fue también otra de las variables manejadas y se tomó en cuenta la alteración de la cantidad de agua agregada al medio,

... descartándose siempre la humedad relativa del sorgo, debido a que, por ser tan pequeña es despreciable. Se tomó como referencia la humedad considerada para el tempeh de soya que presenta una humedad relativa entre 70 y 85% (Shurtleff y Aoyagi, 1980), ya que un mayor porcentaje de humedad permite el crecimiento de otros tipos de hongos y bacterias así como problemas para la difusión de oxígeno. Por otra parte, una menor humedad crea resequedad en la superficie del sustrato, lo que provoca una gran oxigenación en la superficie que inhibe el crecimiento y favorece una rápida esporulación. Otros factores que influyen sobre la humedad son los productos finales del metabolismo del hongo, que son agua y bióxido de carbono principalmente (Sorenson y Hesseltine, 1966), el primero provoca un aumento en la humedad, por lo tanto es recomendable no tener valores cercanos al 85% que afecten al proceso (Shurtleff y Aoyagi, 1980). La cantidad de humedad manejada fue de 70 a 80%. El porcentaje de humedad se tomó como la cantidad de agua agregada al sustrato por gramo de sustrato.

IV.4.6 TAMAÑO DE PARTICULA DEL SUSTRATO

Debido a que el crecimiento micelial del hongo es completamente superficial (Hesseltine, 1965) y como la semilla del sorgo no presenta gran superficie de contacto para el desarrollo de micelio, hubo que probar con diversos tamaños de partícula, partiendo el grano desde dos partes hasta harina de sorgo, observando en cual era el mejor desarrollo de R. oligosporus presentando la menor esporulación posible. (La medición del tamaño de partícula de sorgo se probó con diferentes mallas).

IV.4.7 TAMAÑO DE INOCULO

La cantidad de esporas de R. oligosporus que se inocularon fueron obtenidas por el crecimiento de éstas en el medio de papa dextrosa agar (Difco) en tubos de ensaye de 75 ml inclinados, con 15 ml de medio, dejándose crecer durante 5 días a una temperatura de 32°C para obtener la mayor cantidad de esporas (Fig. No. 8), conservándose estos tubos siempre en condiciones estériles para evitar contaminación.

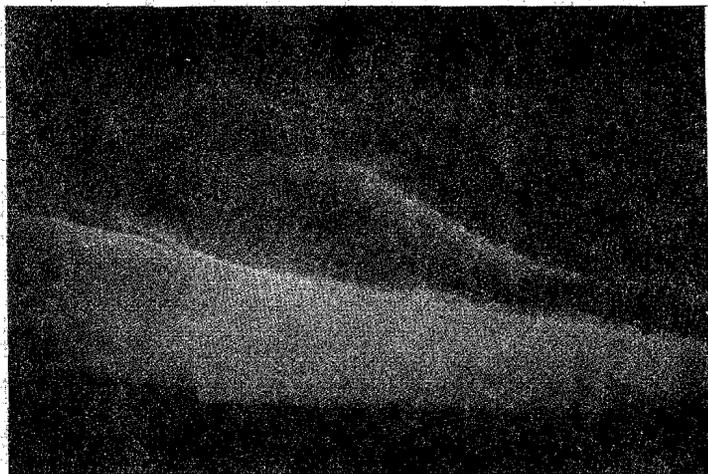


Figura No. 8

Esporas de R. oligosporus desarrolladas en tubo de ensaye, utilizadas como inóculo.

Una vez obtenidas las esporas en el tubo, se le agregaron a éste 15 ml de agua acidulada con ácido láctico agitándose con "Vortex" para desprender la mayor cantidad de esporas posibles del medio, vaciándolas después a un matraz erlenmeyer de 100 ml, también en condiciones de esterilidad, de esta solución se tomó 1 ml y se agregaron 9 ml de agua destilada, se realizaron tres conteos de esporas en la cámara de "Neubauer" agregando 1 gota de la solución diluida de esporas preparada, para saber si el tamaño de inóculo agregado no variaba. El tamaño de inóculo se tomó en cuenta basándose en el inóculo descrito para el tempeh de soya por Wang et al., (1975) quienes tomaron 1.5×10^4 esporas/g.

Después de verificar los conteos, se obtuvieron las medias de cada uno de éstos, se efectuó una prueba para estimar si había o no diferencias significativas entre las medias de los cuatro conteos y con éste comprobar si el inóculo contenía una cantidad constante de esporas (Murray, 1970). Posteriormente se determinó el promedio de esporas multiplicando el número de éstas por el volumen de la cámara; por la dilución hecha, reportándose el número de esporas por mililitro y por gramo de sustrato.

IV.4.8 CONDICIONES DE ESTERILIDAD, GELATINIZACION Y DESEMPAQUE

En un principio hubo que hacer pruebas sin esterilizar el sustrato como se hace para la fermentación de la soya; sin embargo, debido a la posibilidad que existía de contaminación, en otras pruebas se sometió al sorgo previamente tratado y triturado a esterilización de 15 psig durante 15 minutos; pero a causa de las temperaturas de esterilización, los almidones del sorgo se gelatinizaron, y se hizo necesario un desempaque del sorgo para permitir un mejor crecimiento de micelio en todo el sustrato sin que hubiera esporulación.

IV.4.9 AIREACION (CANTIDAD DE OXIGENO)

Para llevar a cabo la fermentación se utilizaron cajas de Petri de 60 mm x 15 mm variándose en ellas la cantidad de sustrato para obtener principalmente las condiciones necesarias de aireación, ya que como se vió anteriormente, R. oligosporus es un hongo aerobio que requiere oxígeno para su crecimiento; sin embargo, como es microaerofílico, si se deja una gran cámara de aire como se reporta para el tempeh de soya, la superficie se reseca, lo que inhibe el crecimiento e induce una esporulación prematura (Shurtleff y Aoyagi, 1980). De ahí que lo más conveniente sea una pequeña cámara de aire para que haya una difusión lenta que es ideal para el crecimiento.

Al medio se le adicionó una cantidad necesaria de nutrientes -- para obtener una buena relación carbono-nitrógeno, y oligoelementos para mantener las condiciones de crecimiento según los datos de González (1978) (Ver Tabla No. 9), permaneciendo siempre la cantidad necesaria -- de nitrógeno para poder dar un mayor porcentaje de proteína a partir -- del sustrato original y el nitrógeno suministrado al medio. Estos oligo elementos fueron añadidos al sustrato en conjunto con el agua que se -- agregó para obtener la humedad deseada.

TABLA No. 9

TABLA DE OLIGOELEMENTOS UTILIZADOS PARA AGREGAR AL
MEDIO DE LA FERMENTACION *

KH_2PO_4	2.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g
Urea	.3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.3 g
Ca Cl_2	.3 g
Extracto de levadura	.5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.56 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00 mg
Zn Cl_2	1.67 mg
Co Cl_2	2.00 mg
H_2O destilada	1.00 l

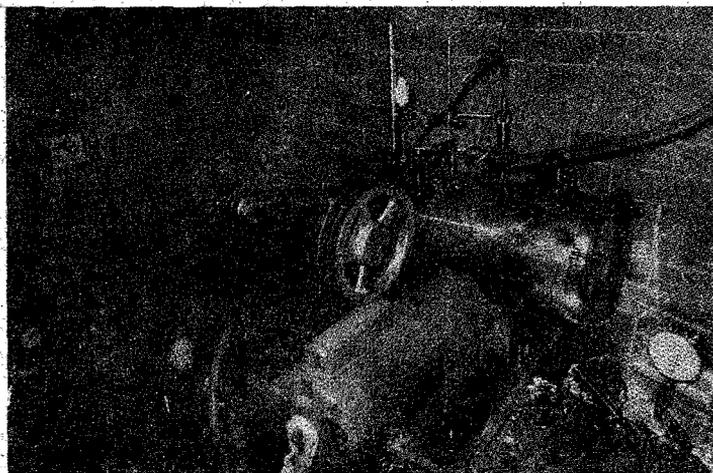
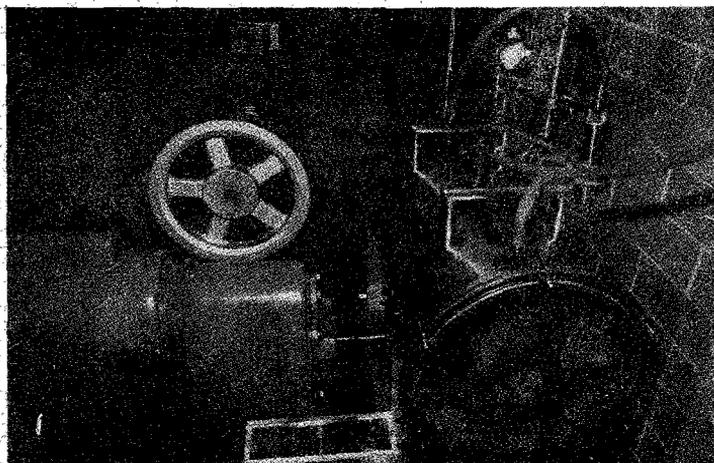
* González, 1978

IV.5 PROCESO DE FERMENTACION A NIVEL DE REACTOR BIOLÓGICO DE 20 L. (FERMENTADOR).

IV.5.1 ESCALAMIENTO

A nivel de fermentador se trabajó inicialmente con los mismos parámetros que a nivel de caja Petri, únicamente haciendo las adaptaciones convenientes.

Para llevar a cabo el estudio, se utilizó un fermentador cilíndrico de 20 dm³ de acero inoxidable con agitación de 5 rpm acoplado a un motorreductor que proporcionaba transporte radial y longitudinal, equipado con termopozo en la parte superior, cuyo fondo no llegaba a la cama del sustrato, con higrómetro que medía la humedad del aire y un difusor a todo lo largo del fermentador (figs No. 9 y 10). El fermentado fue diseñado por García F. y González E. (comunicación personal).



Figuras No. 9 y 10

Fermentador utilizado en el escalamiento,
visto desde dos ángulos diferentes.

Fueron elaborados tres lotes en los cuales variaron algunos parámetros a fin de obtener el mejor desarrollo del hongo en la semilla de sorgo y poder dar una cantidad y calidad de proteínas similar a la obtenida a nivel de caja Petri.

El inóculo de Rhizopus oligosporus fue previamente preparado en matraces Fernbach de 3 litros con 300 ml de medio papa dextrosa - agar (Difco) cada uno, inoculándolo con la cepa, desarrollándola a una temperatura de 39°C durante 72 hs , tiempo en el que se obtuvieron - una cantidad de esporas que cubría toda la superficie del medio (García F. y González E.; comunicación personal).

Pasado este tiempo se sacaron los matraces de la estufa y se les agregaron 750 ml de agua deionizada, estéril con oligoelementos (Ver tabla No. 9), se metieron a una licuadora estéril para formar una suspensión viscosa con la cual se pudiera inocular el fermentador homogéneamente.

Posteriormente, hubo de realizarse un conteo de esporas igual al descrito en el punto IV.4.7 .

IV.5.2 LOTE No. 1

El sorgo se trató con NaOH de la misma manera que a nivel de caja Petri para eliminar los taninos del grano; se enjuagó y acidificó con ácido láctico concentrado y se secó en la estufa, se fragmentó en tamaño de 5 a 8 porciones aproximadamente (malla 10) con un molino eléctrico de rodillos, se le agregaron 3 litros de agua destilada acidifi-

... cada a pH de 3.5, con oligoelementos (Ver tabla No.9), en la cantidad especificada por litro para cada litro hasta obtener una humedad del 75%.

Se cargó el fermentador con 6 Kg del grano mencionado, sometiendo a esterilización en autoclave a 15 psig durante 15 minutos, una vez esterilizado se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se inoculó con la suspensión de esporas preparada en 1.5 litros de agua deionizada estéril con esporas, inoculando a través del difusor y con movimientos de agitación para hacer más homogénea la inoculación. Se puso el fermentador en un cuarto con temperatura constante de 32°C con agitación continua a 5 rpm con un recambio de 150 ml de aire por minuto, este aire a la salida contenía una humedad del 83%. La agitación continua se realizó por medio de paletas rotatorias dentro del fermentador. La fermentación se dejó durante 60 hs con agitación, - - - 36 hs sin agitación para observar si sucedía el mismo fenómeno que a nivel de caja Petri, en el que empezaba a disminuir el nivel proteínico después de las 72 hs.

IV.5.3 LOTE No. 2

Este lote fue igual al anterior únicamente varió la agitación, la cual en lugar de ser continua se mantuvo 3 hs en agitación por 3 hs de reposo, se aumentó la humedad en el aire proporcionado al fermentador a 85%, los recambios de aire fueron de 150 ml por minuto cuando había agitación y de 300 ml por minuto sin agitación. La temperatura del aire a la salida del fermentador se bajó a 29°C para evitar un aumento excesivo en la temperatura del medio que afectara el desarrollo del hongo y provocará pérdida de humedad.

IV.5.4 LOTE No. 3

Este último se trabajó igual que los dos anteriores, pero la agitación fue nuevamente cambiada, utilizando 30 minutos por 6 hs de reposo con los mismos recambios de aire, la humedad del aire adicional se manejó igual que en el primer lote, la temperatura del aire a la salida se disminuyó a 28°C. Se manejó otra variable que era la cantidad de oligoelementos, en este lote como fuente de nitrógeno se utilizó agua de cocimiento de maíz, que contenía 4.32% de nitrógeno con 50% de sólidos en suspensión. (Scott et al., 1972). Se utilizó el agua de cocimiento en lugar de agregar sulfato de amonio y urea que fueron usadas anteriormente como fuente de nitrógeno para su incorporación en forma de nueva proteína.

Durante las tres corridas se monitorearon cada 12 hs la temperatura y la humedad del aire adicionado al fermentador. También se hicieron determinaciones de proteína para conocer en qué porcentaje el hongo pudo incorporar la cantidad de nitrógeno adicionado al medio en forma de proteína durante las fermentaciones.

IV.6 VALORACION DEL SORGO FERMENTADO EN RELACION A LAS NECESIDADES PROTEINICAS Y DE AMINOACIDOS PARA ANIMALES

Se estableció una relación entre los requerimientos proteínicos y los aminoácidos esenciales para diferentes animales y las cualidades que en este sentido reúne el sorgo fermentado.

Estas relaciones fueron elaboradas para diversos animales mono gástricos tales como: cerdos (Sus scrofa), ovejas (Ovis aries), caballos (Equus caballus), perros (Canis familiaris), gatos (Felis domestica), pollos de engorda y gallinas ponedoras (Gallus sp).

V. RESULTADOSV.1 EXTRACCION DE TANINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS

Los datos obtenidos para la extracción de taninos y compuestos fenólicos se muestran en la tabla No. 10, donde se comparan con las cantidades de proteínas, almidones y grasas antes y después de los diferentes tratamientos.

TABLA No. 10

CUADRO COMPARATIVO DE EXTRACCIONES DE TANINOS Y FENOLES TOTALES EN PORCIENTO CON LA PERDIDA PROTEINICA, DE ALMIDONES Y GRASAS - DESPUES DE ESTOS TRATAMIENTOS.

	<u>% DE ALMIDONES</u>	<u>% DE GRASAS</u>	<u>% DE PROTEINAS</u>	<u>METODO DE * AZUL DE PRUSIA % FENOLES EXTRAIDOS</u>	<u>METODO DE VAINILLA HCL * % TANINOS EXTRAIDOS</u>
Sorgo Guanajuato sin tratamiento	78.87	3.96	9.91	0000	0000
Sorgo Tamaulipas sin tratamiento	78.80	3.98	9.90	0000	0000
Sorgo Guanajuato con tratamiento 5% NaOH	78.72	3.84	9.58	76.58	75.51
Sorgo Tamaulipas con tratamiento 5% NaOH	78.09	3.76	9.62	76.58	75.51
Sorgo Guanajuato con tratamiento 10% NaOH	77.37	3.64	8.92	84.02	83.75
Sorgo Guanajuato con tratamiento 15 NaOH	77.05	3.56	8.42	91.77	90.77
Sorgo Guanajuato con tratamiento 20 NaOH	76.77	3.52	7.72	92.30	91.50

* (Alvarez y Escalona, 1982)

El tratamiento seleccionado fue el de NaOH al 5% por ser el que extraía una cantidad bastante alta de taninos y compuestos fenólicos, sin perder altas cantidades de proteínas, almidones y grasas en comparación con los otros tratamientos en los que, aunque había una mayor extracción de taninos y compuestos fenólicos, también había una mayor pérdida de proteínas y almidones, incrementándose dichas pérdidas al aumentarse las concentraciones de NaOH (Tabla No. 10).

También se observó que durante los tratamientos y debido a la agitación y los lavados, se removió todo el pericarpio de la mayoría de las semillas. (Fig. No. 11).

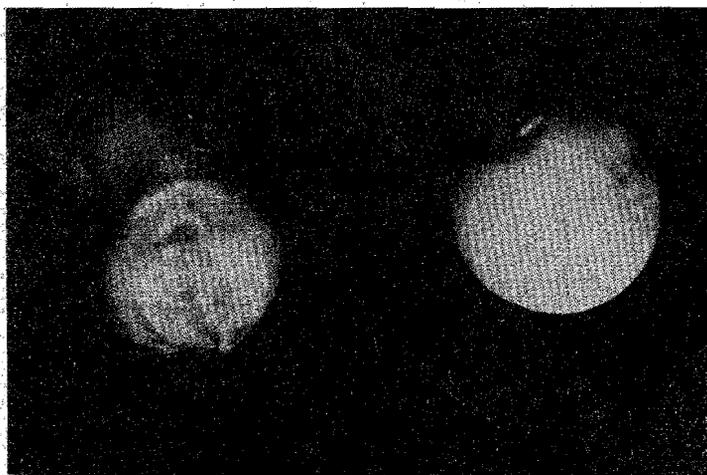


Figura No. 11

Semillas de sorgo antes y después
de los tratamientos térmico-alcali
nos.

Con las características que se manifestaron en el sorgo después del tratamiento térmico-alcalino con NaOH al 5% (Tabla No. 10), se --

... dejó a la semilla en posibilidad de utilizarse como sustrato para el proceso de fermentación.

V.2 CARACTERISTICAS BROMATOLOGICAS DE Rhizopus oligosporus DESARROLLADO EN MEDIO LIQUIDO

El hongo se desarrolló en el medio líquido dando las características que se muestran en la Tabla No. 11 donde se observa un alto porcentaje en cuanto al contenido de proteína ya que se consiguió llegar hasta valores promedio cercano al 50%, las que fueron sintetizadas a partir de nitrógeno inorgánico. Por otra parte se obtuvieron cantidades de lípidos que fluctuaron entre valores cercanos al 4%.

TABLA No. 11

RESULTADOS EN PORCIENTO DE PROTEINAS Y GRASAS
REALIZADOS EN Rhizopus oligosporus DESARROLLADO
EN MEDIO LIQUIDO.

	% DE PROTEINAS	% DE GRASAS
MICELIO (Lote # 1)	* 48.760	3.900
MICELIO (Lote # 2)	- 49.128	4.200
MICELIO (Lote # 3)	- 51.430	4.268
MICELIO (Lote # 4)	- 48.570	4.050
MICELIO (Lote # 5)	- 49.798	4.093
	$\bar{x} = 49.53 \pm 1.15$	$\bar{x} = 4.1 \pm 0.14$

* Determinado por el método de Biuret

- Determinado por método de Kjeldahl

V.3 FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI

V.3.1 TEMPERATURA

Los mejores resultados se obtuvieron a 32°C puesto que a una mayor temperatura se presentó una pérdida de humedad que provocó la proliferación de estructuras de resistencia en lugar de producir mayor cantidad de biomasa, bajando la temperatura el crecimiento micelial fue muy pobre.

Independientemente de la temperatura a la que crece el hongo, hubo que considerar que el metabolismo de éste tiende a aumentar su temperatura en determinadas horas de la fermentación, generalmente este aumento se presenta a las 15 horas de iniciada la fermentación, por lo que se fijó la temperatura a 32°C para no tener pérdidas en las que hubiera menos del 70% de humedad, que provocara la esporulación de Rhizopus oligosporus.

V.3.2 TIEMPO DE INCUBACION

Se reportó el incremento poblacional con base en el incremento directo de proteínas reportadas a diferentes tiempos de incubación y no con el número de organismos presentes en el medio, por no ser una fermentación líquida.

Los incrementos proteínicos notorios se iniciaron después de las 48 horas de incubación, manteniéndose hasta las 72 horas, en donde se inició un descenso considerable.

TABLA No. 12

CAMBIOS EN EL PORCIENTO DE PROTEINAS DURANTE LA
FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI

TIEMPO EN HORAS	24	48	72	96
% DE PROTEINA				
LOTE # 1	9.62	9.68	15.92	14.34
LOTE # 2	9.54	10.17	16.28	15.08
LOTE # 3	9.55	10.09	17.88	14.67
LOTE # 4	9.70	9.89	17.44	14.18
LOTE # 5	9.69	10.22	16.80	14.73
MEDIAS (\bar{x})	9.62 + 0.08	10.01 + 0.23	16.86 + 0.80	14.60 + 0.35

V.3.3 pH

Para determinar el pH óptimo de la fermentación se tomaron en cuenta los sólidos solubles en suspensión, ya que, en una fermentación sólida -- sólo se puede medir la cantidad de humedad añadida al medio. Por esta causa se midió únicamente el pH del agua agregada poniéndola a un pH de 3.5 hasta observar el pH final obtenido a las 72 horas de fermentación. El pH varió a través de la fermentación hasta llegar a 5.3, sin embargo, esto no alteró la producción de micelio del hongo.

V.3.4 HUMEDAD

El mejor desarrollo de micelio se obtuvo con una humedad de 77%; sin embargo, no fue demasiada la diferencia en cuanto al crecimiento del hongo utilizando menor o mayor cantidad de agua entre 70 y 80% de humedad.

V.3.5 TAMAÑO DE PARTICULA DEL SUSTRATO

Se observó que al fermentar con granos enteros de sorgo el crecimiento era bastante pobre, esto fue originado principalmente por las características morfológicas de la semilla, que presenta superficies redondeadas y con poca área de contacto, lo que impedía al hongo llegar a crecer lo suficiente como para llenar la caja Petri y formar un producto compacto.

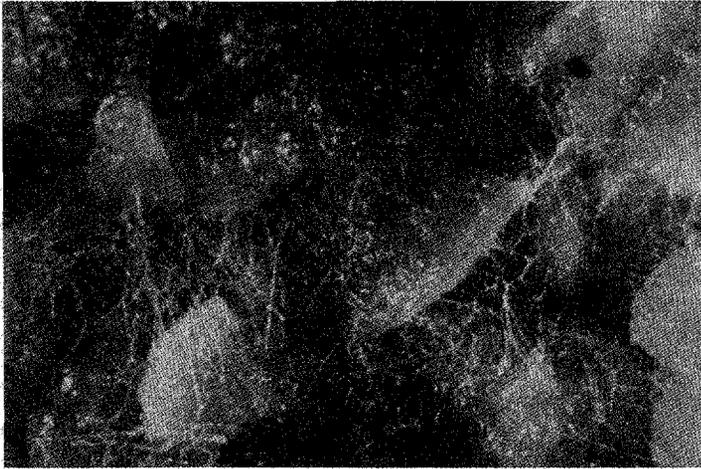


Figura No. 12

Desarrollo de micelio en las áreas
de exposición del sorgo.

Con la semilla trozada en tres o cuatro partes (malla # 20), el crecimiento fue mejor, teniendo un poco menos de problema con el hongo, sin embargo, no se llegó a tener una penetración de hifas en todo el sustrato.

Obteniendo de 5 a 8 fragmentos por grano (malla # 10), se observaron los mejores resultados con un crecimiento que abarcó la mayor parte del sustrato, teniendo buena apariencia y una mínima esporulación. (Fig. No. 12).

El sorgo en forma de harina se compacta durante la esterilización debido a las temperaturas de gelatinización del grano, por lo que tuvo crecimiento únicamente en la superficie del medio, cuando se quiso desempaquetar resultó bastante complicado, encontrándose un crecimiento escaso porque el desempaque resultó muy irregular.

Con todas estas pruebas se optó por el tamaño de partícula en el que se tuvieran de 5 a 8 fragmentos por grano (Malla # 10).

V.3.6 TAMAÑO DE INOCULO

Los conteos de esporas y sus medios muestran que no existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad de esporas de R. oligosporus desarrollados en papa dextrosa agar (Difco).

El promedio obtenido de esporas fue de 2.53×10^8 esporas/ml ó --- 1.9481×10^8 esporas/g de sustrato a una humedad del 77%.

V.3.7 CONDICIONES DE ESTERILIDAD

En las pruebas sin esterilizar el medio de fermentación, se observó que algunas veces existía crecimiento de R. oligosporus, en otras ocasiones no había crecimiento del hongo al haber competencia con otro tipo de microorganismos no identificados que le conferían un olor desagradable al producto y en otros casos se llegó a presentar un pobre desarrollo del hongo, percibiéndose también el olor desagradable. Por estas razones se decidió mantener condiciones de esterilidad a diferencia de

... como se maneja la fermentación de la soya para la obtención del tempeh.

V.3.8 GELATINIZACION Y DESEMPAQUE

Durante el proceso de esterilización del sorgo fragmentado, los almidones se gelatinizan a consecuencia de altas temperaturas de esterilización, formándose una pasta que durante la fermentación no permitió la penetración de las hifas del hongo con facilidad (Fig. No. 13), por lo que después de la esterilización hubo que desempacar esta pasta dejando porciones pequeñas que tuvieran una superficie de contacto suficiente para el crecimiento del hongo, que es la característica principal de adaptación y con esto evitar la esporulación precoz.

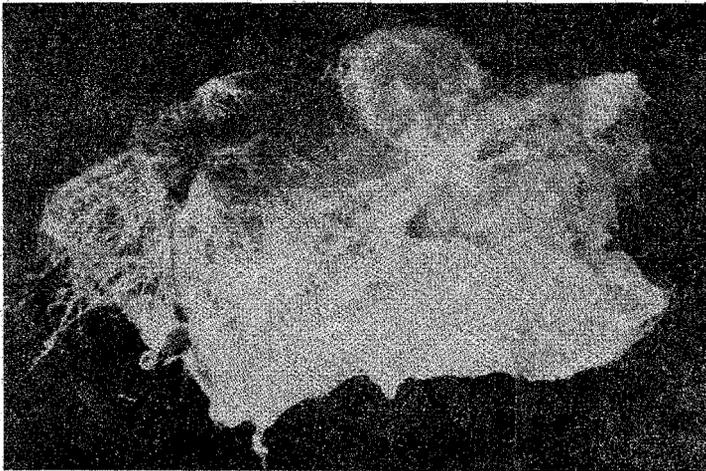


Figura No. 13
Desarrollo superficial del hongo provocado por la gelatinización y el empaque del sustrato.

V.3.9 AIREACION (CANTIDAD DE OXIGENO)

Los requerimientos de oxígeno que presenta Rhizopus oligosporus son bajos, por lo que una baja difusión de aire es lo más recomendable para el crecimiento, considerando esto, hubo que dejar una pequeña cámara de aire dentro de la caja de Petri que permitiera la lenta difusión. La baja difusión se consiguió colocando tres gramos de sustrato en cajas de petri de 60 mm x 15.

V.3.10 ANALISIS BROMATOLOGICOS DEL SORGO FERMENTADO

Cuando se hubieron fijado todos los parámetros para la obtención del sorgo fermentado, se pudo conseguir un producto con olor a levadura y con suficiente desarrollo micelial visible dentro de toda la caja, - para poder realizarle los análisis bromatológicos correspondientes. En la tabla No. 13 se da un resumen de las condiciones iniciales bajo las que se realizó la fermentación del grano a nivel de caja Petri.

TABLA No. 13CUADRO DE LA FERMENTACION OBTENIDA A NIVEL DE
CAJA PETRI

1. Sorgo tratado con NaOH al 5% a 50°C durante 10 minutos lavado y acidificado a pH 3.5 y secado en estufa a 50°C durante 24 hs .
2. Se troza el sorgo en 5 ó 6 pedazos incluyendo las partículas más pequeñas. (Malla # 10)
3. Se ponen 3 gramos del sorgo trozado en cajas de Petri (60 mm x 15 mm) hasta alcanzar junto con el agua del inóculo una humedad de 77%.
4. Se les agrega agua destilada y acidulada (el agua destilada debe de contener oligoelementos en una proporción de 1 ml/l y estar a un pH de 3.5)
5. Se esterilizan las cajas en autoclave a 15 psig durante 15 min.
6. Se enfrían y se desempacan. (manteniendo las condiciones de esterilidad)
7. Se inocula 1 ml de una suspensión de esporas de R. oligosporus - diluida en agua destilada estéril con una cantidad de esporas de 1.9581×10^8 esp/g de sustrato.
8. Se introducen las cajas en la estufa a 32°C y se dejan durante 72 hs .
9. Se sacan las cajas y el producto se deshidrata en la estufa durante 24 hs a una temperatura de 60°C.

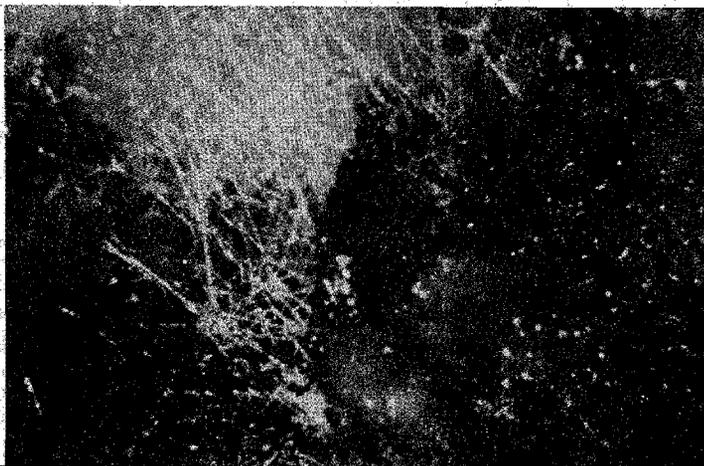
Los resultados de las pruebas de proteínas, almidones y grasas se muestran en la tabla No. 14 donde se nota un incremento en el porcentaje de proteínas con respecto al sorgo sin fermentar y una disminución en las cantidades de almidones y grasas, también comparados con el sorgo antes de la fermentación.

TABLA No. 14

RESULTADOS EN PORCIENTO DE LAS CANTIDADES DE PROTEINA, ALMIDONES Y GRASAS DEL SORGO SIN FERMENTAR Y DEL SORGO FERMENTADO A NIVEL DE CAJA PETRI.

	<u>% PROTEINAS</u>	<u>% ALMIDONES</u>	<u>% GRASAS</u>
Sorgo sin fermentar	9.58	78.72	3.84
Sorgo fermentado			
Lote # 1	15.92	74.22	2.12
Lote # 2	16.28	74.08	2.20
Lote # 3	17.88	73.77	2.08
Lote # 4	17.44	73.93	1.96
Lote # 5	16.80	73.80	2.06
MEDIAS (\bar{X})	$16.86^{+0.80}$	$73.96^{+0.19}$	$2.08^{+0.09}$

El producto final a nivel de caja Petri se puede observar en las Figs. No. 14 y 15, donde se ve el desarrollo micelial en todo el sustrato con muy poca esporulación y la penetración de las hifas a lo largo de las superficies de exposición de las semillas.



Figuras No. 14 y 15
Sorgo fermentado y detalle, vistos en el
microscopio de disección.

V.4 FERMENTACION A NIVEL DE REACTOR BIOLÓGICO (FERMENTADOR)

V.4.1 LOTE No. 1

En este lote se observó poco crecimiento micelial no permitiendo que se compactara el sustrato como sucedió a nivel de caja Petri; esto se debió principalmente a la agitación continua. No hubo incremento en la cantidad de proteína durante las primeras 48 hs (tabla No. 15). Después de las 60 hs en las que se suspendió la agitación se inició un descenso en la cantidad de proteína y se detectó desprendimiento de olores fétidos. La temperatura del aire a la salida del fermentador varió muy poco. La humedad del aire a la salida del fermentador disminuyó en pequeña proporción (tabla No. 16).

TABLA No. 15

PORCIENTO DE PROTEINAS DE LA FERMENTACION DEL SORGO CON
RESPECTO A LA AGITACION A NIVEL DE FERMENTADOR.

LOTE # 1

<u>TIEMPO</u> <u>CON AGITACION CONTINUA</u>	<u>% DE PROTEINA</u>
24 hs	9.62
48 hs	9.70
72 hs	9.40
96 hs	8.79

LOTE # 2

<u>3 hs DE AGITACION</u> <u>3 hs DE REPOSO</u>	<u>% DE PROTEINA</u>
24 hs	9.18
48 hs	9.45
72 hs	11.20
96 hs	10.20

LOTE # 3

<u>30 Min. DE AGITACION</u> <u>6 hs DE REPOSO</u>	<u>% DE PROTEINA</u>
24 hs	9.80
48 hs	10.50
72 hs	17.89
96 hs	15.32

TABLA No. 16

CAMBIOS EN LA HUMEDAD Y EN LA TEMPERATURA DEL AIRE A LA SALIDA
OCURRIDOS DURANTE LA FERMENTACION A NIVEL FERMENTADOR.

HUMEDAD

<u>HORAS</u>	<u>CORRIDA # 1</u>	<u>CORRIDA # 2</u>	<u>CORRIDA # 3</u>
0	83%	85%	83%
12	94%	72%	91%
24	96%	73%	75%
36	95%	68%	71%
48	91%	73%	69%
60	---*	68%	67%
72	---*	73%	64%
84	---*	71%	67%
96	---*	71%	68%

* Se suspendió el monitoreo por detectarse descomposición al carecer de agitación.

TEMPERATURA

<u>HORAS</u>	<u>CORRIDA # 1</u>	<u>CORRIDA # 2</u>	<u>CORRIDA # 3</u>
0	32°C	29°C	28°C
12	32°C	30°C	28°C
24	31°C	30°C	28°C
36	31°C	29°C	28°C
48	30°C	31°C	29°C
60	---*	30°C	29°C
72	---*	30°C	29°C
84	---*	31°C	30°C
96	---*	31°C	29°C

* Se suspendió el monitoreo por detectarse descomposición al carecer de agitación.

V.4.2 LOTE No. 2

En el Lote No. 2 hubo un incremento proteínico muy pobre (Ver tabla No. 10), por no haber un desarrollo de micelio considerable. - Esto fue causado nuevamente por un exceso de agitación y aunque se - había disminuido con respecto al lote anterior, fue demasiada. Sólo hubo un desarrollo apreciable en las partes que no abarcaban las pa - letas de agitación (Fig. No. 16). Se detectó también una baja de pro - teína después de las 72 horas (Tabla No. 15). La humedad del aire a la salida disminuyó y la temperatura aumentó de uno a dos grados (Tabla No. 16).

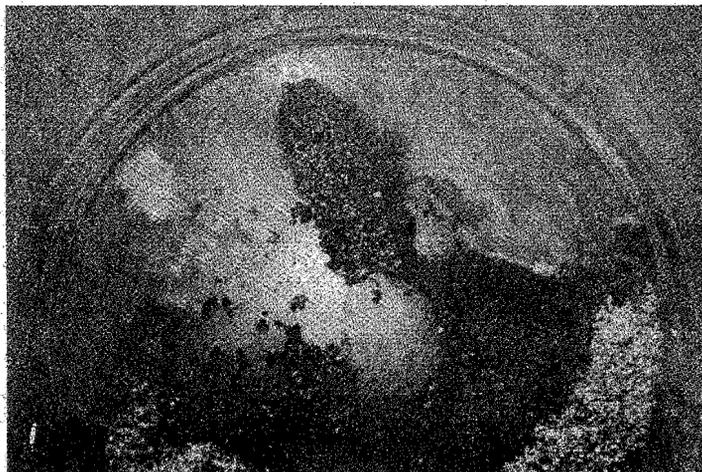
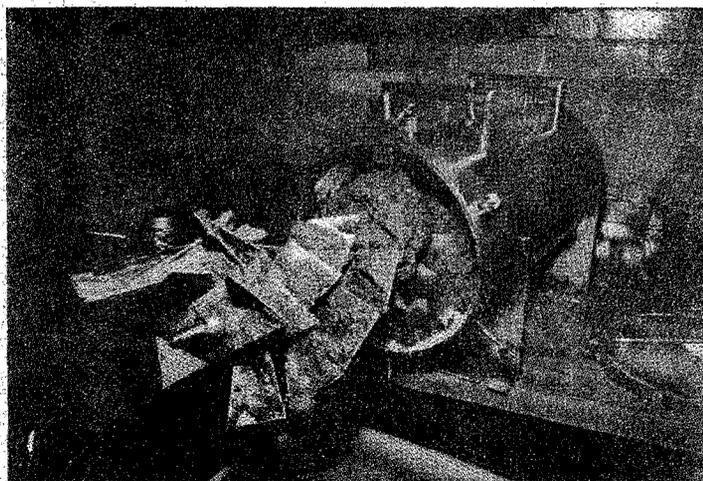
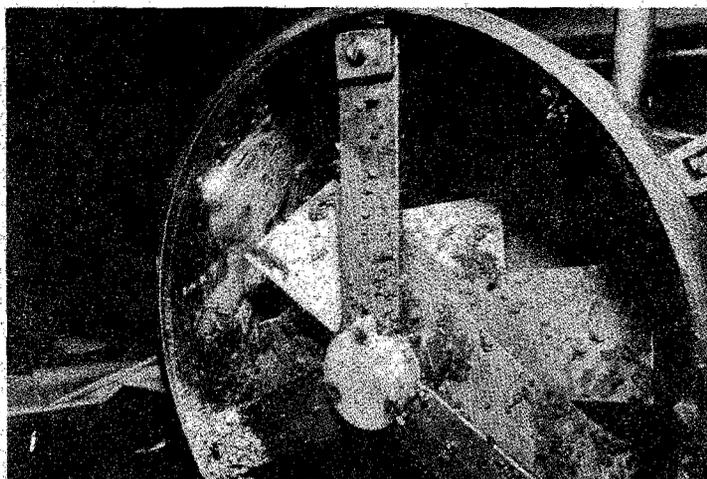


Figura No. 16
Producto fermentado en el Lote No. 2

V.4.3 LOTE No. 3

Se obtuvo un mayor aumento de proteína que el obtenido a nivel de caja Petri (Tabla No. 15), con un desarrollo de micelio notorio a simple vista (causado por una agitación correcta) y un olor a levadura. La temperatura y humedad del aire disminuyeron un poco con respecto a los lotes anteriores (Tabla No. 16); sin embargo, se mantuvieron dentro de los valores adecuados y no afectaron en ningún momento a la fermentación por lo que la esporulación fue mínima (Figs No. 17 y 18).

Los cambios en cuanto a humedad y temperatura del aire inyectado al fermentador tuvieron algunas variaciones en los tres lotes ya que no se pudieron controlar muy bien dentro del cuarto de incubación, pero esto no afectó sensiblemente ninguno de los tres, debido a que no rebasó los límites de tolerancia en que se desarrolla el hongo (Tabla No. 16).



Figuras No. 17 y 18
Sorgo fermentado en el lote No. 3
en dos diferentes ángulos.

V.5. AMINOACIDOS PRESENTES EN EL SORGO, EN EL HONGO Y EN EL PRODUCTO FERMENTADO.

Los aminoácidos presentes en el sorgo están indicados en la Tabla No. 17, denotan las cantidades de cada aminoácido que hay en el sorgo para la variedad "Guanajuato" utilizada en este trabajo, observándose cantidades bajas de lisina, treonina, metionina y triptófano, dentro de los aminoácidos limitantes, y que en general son bajas para todos los cereales, habiendo pocas variaciones con respecto a otras variedades estudiadas por Virupaksha y Sastry en 1968, teniendo grandes cantidades de leucina, prolina, ácido aspártico y ácido glutámico. (Ver Tabla No. 17).

TABLA No. 17

AMINOACIDOS DEL SORGO (Sorghum Bicolor L. Moench) VARIEDAD GUANA-
JUATO EXPRESADO EN g/100 g DE PROTEINA

VALINA	5.21	AC. ASPARTICO	6.85
ISOLEUCINA	3.95	SERINA	4.40
TREONINA	3.23	AC. GLUTAMICO	21.50
TRIPTOFANO	0.65	PROLINA	8.16
FENILALANINA	5.00	GLICINA	3.32
LEUCINA	13.30	ALANINA	9.54
LISINA	2.17	CISTEINA	2.32
METIONINA	1.51	TIROSINA	1.63
HISTIDINA	2.20	ARGININA	2.70

Para los requerimientos de aminoácidos de los patrones de la FAO (Ver Tabla No. 2.), se ha visto que el sorgo está bastante por debajo en cuanto a las necesidades de lisina, treonina, metionina, triptófano, por lo que no se puede considerar como un alimento ideal - aparte de - - otras características ya mencionadas para cualquier animal.

El resultado obtenido del aminograma realizado para R. oligosporus desarrollado previamente en un medio líquido, reportó contener aminoácidos constructores de proteínas con lo que se comprobó nuevamente una formación de proteína a partir de nitrógeno inorgánico (Tabla No.- 18).

TABLA No. 18

AMINOACIDOS DE Rhizopus oligosporus DESARROLLADO EN MEDIO LIQUIDO (g/100 g DE PROTEINA)

VALINA	4.88	AC. ASPARTICO	12.02
ISOLEUCINA	3.81	SERINA	6.40
TREONINA	5.80	AC. GLUTAMICO	17.60
TRIPTOFANO	.65	PROLINA	5.13
FENILALANINA	4.51	GLICINA	5.61
LEUCINA	6.98	ALANINA	6.45
LISINA	5.30	CISTEINA	3.26
METIONINA	1.94	TIROSINA	4.07
HISTIDINA	1.59	ARGININA	4.00

Con el sorgo fermentado se obtuvieron nuevos datos en el corrimiento del aminograma, como se observa en la Tabla No. 19, que indica el incremento de casi todos los aminoácidos limitantes y no limitantes, lo que acrecenta la calidad de las proteínas producidas durante la fermentación.

TABLA No. 19

AMINOACIDOS DE LA FERMENTACION DEL SORGO CON Rhizopus oligosporus (g/100 g de proteína)

VALINA	4.67
ISOLEUCINA	4.05
TREONINA	3.56
TRIPTOFANO	.85
FENILALANINA	5.20
LEUCINA	11.53
LISINA	4.33
METIONINA	1.86
HISTIDINA	2.30
AC. ASPARTICO	7.05
SERINA	4.45
AC. GLUTAMICO	17.84
PROLINA	7.94
GLICINA	4.15
ALANINA	7.88
CISTEINA	4.09
TIROSINA	4.72
ARGININA	3.53

La proporción de aminoácidos del hongo y del sorgo, antes y después de fermentar, indican la relación de los cambios que aparecen cuando el hongo crece sólo en un medio líquido; cuando se desarrolla en un sustrato sólido como es el sorgo y cuando se utiliza a éste sin ningún procesamiento. (Tabla No. 20)

TABLA No. 20

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DE LOS AMINOGRAMAS DEL SORGO (*Sorghum bicolor* L. Moench), DEL HONGO *Rhizopus oligosporus* Y DEL SORGO FERMENTADO CON *R. oligosporus*, LAS DIFERENCIAS DE LOS AMINO ACIDOS DEL SORGO ANTES Y DESPUES DE FERMENTAR Y EL PATRON DE LA FAO/WHO PARA A.A. EXPRESADOS EN g/100 g DE PROTEINA.

	<u>R. oligosporus.</u>	Patrón Provisional FAO/WHO 1965	<u>Sorgo</u>	Sorgo fermentado con <u>R. oligosporus</u>	<u>Diferencias entre sorgo fermentado y sin fermentar.</u>
VALINA	4.88	1.7	5.21	4.67	- 0.54
ISOLEUCINA	3.81	4.3	3.95	4.05	0.15
TREONINA	5.80	3.3	3.23	3.56	0.33
TRIPTOFANO	0.65	1.1	0.65	0.85	0.20
FENILALANINA	4.51	2.9	5.00	5.20	0.20
LEUCINA	6.98	4.9	13.30	11.53	- 1.77
LISINA	5.30	4.3	2.17	4.33	2.16
METIONINA	1.94	1.7	1.51	1.94	0.44
HISTIDINA	1.59	---	2.20	2.30	0.10
AC. ASPARTICO	12.02	---	6.85	7.05	0.20
SERINA	6.40	---	4.40	4.45	0.05
AC. GLUTAMICO	17.60	---	21.50	17.84	- 3.66
PROLINA	5.13	---	8.16	7.94	0.22
GLICINA	5.61	---	3.32	4.15	0.83
ALANINA	6.45	---	9.54	7.88	- 1.66
CISTEINA	3.26	1.7	2.32	4.09	1.77
TIROSINA	4.07	2.5	1.63	4.72	3.09
ARGININA	4.00	---	2.70	3.53	0.83
% DE PROTEINA	51.26	---	9.58	17.66	8.08

La valoración de los resultados para el sorgo fermentado manifestó que éste reúne en general los requerimientos de aminoácidos esenciales y los porcentajes de proteínas de la ración diaria. (Tabla No. 21)

T A B L A # 21

CUADRO COMPARATIVO DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DIARIOS DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS PARA DIFERENTES ANIMALES CON RELACION A LOS AMINOACIDOS DEL SORGO FERMENTADO EXPRESADOS EN g/100 g DE PROTEINA.

Sorgo fermentado -- con <u>R.oli-gosporus</u>			Pollos de engorda - iniciación	Pollos de engorda - crecimiento	Pollos de engorda - iniciación	Pollos de engorda - crecimiento	Gallinas ponedoras 20-30 sem. clima -- frío.	Gallinas ponedoras 20-30 sem. clima - cálido	Gallinas ponedoras 30-40 sem. clima -- frío	Gallinas ponedoras 30-40 sem. clima - cálido	Gallinas ponedoras 40-50 sem. clima - frío	Gallinas ponedoras 40-50 sem. clima - cálido	
	Fuerzas	Ovejas	machos	to machos	hembras	to hembras							
VALINA	4.67	14.9	---	.36	.93	.34	.72	.83	.78	.85	.76	.81	.73
ISOLEUCINA	4.05	3.8	---	.31	.87	.30	.88	.83	.78	.85	.76	.81	.73
TREONINA	3.56	4.2	---	.29	.76	.27	.58	.57	.54	.58	.52	.55	.50
TRIPTOPANO	.85	1.0	---	.82	.22	.08	.17	.16	.15	.17	.15	.16	.14
FENILALANINA	5.20	---	---	.29	.76	.27	.58	.72	.68	.78	.66	.70	.63
LEUCINA	11.53	7.0	---	.58	1.51	.56	1.64	1.24	1.17	1.27	1.14	1.21	1.09
LISINA	4.33	7.0	2.5	.41	1.08	.39	.75	.66	.62	.68	.61	.64	.58
METIONINA	1.86	---	1.1	.17	.43	.16	.34	.33	.31	.34	.30	.32	.29
HISTIDINA	2.30	2.30	0.8	.17	.43	.16	.34	.31	.29	.31	.28	.30	.27
CISTEINA	4.09	---	1.3	.12	.33	.12	.25	.26	.25	.27	.24	.26	.23
TIROSINA	4.72	---	---	.25	.65	.23	.47	.31	.29	.32	.28	.30	.27
ARGININA	3.53	---	3.0	.41	1.08	.39	.83	.83	.78	.85	.76	.81	.73
Met + Cys	5.95	3.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Phe + Tyr	9.92	6.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Proteína en %	17.66	27-13	13.0	23.5	20	22.1	17.8	18	18	16	16	15	15
Requerimiento diario de alimento en g.	---	1800	1000 a 1300	36	106	36	106	103.5	98	106	95	101	.91

VI. DISCUSION

El utilizar NaOH al 5% con una temperatura de 50°C para el tratamiento del sorgo demostró nuevamente que los datos obtenidos por Blessin, et al. (1962) removían únicamente el pericarpio del grano, disminuyendo muy poco los niveles proteínicos de la semilla del sorgo, aumentando la disponibilidad de las proteínas y haciendo extracciones bastante considerables, al sobrepasar en un 85% la extracción de taninos y fenoles totales (Graf. No. 1)

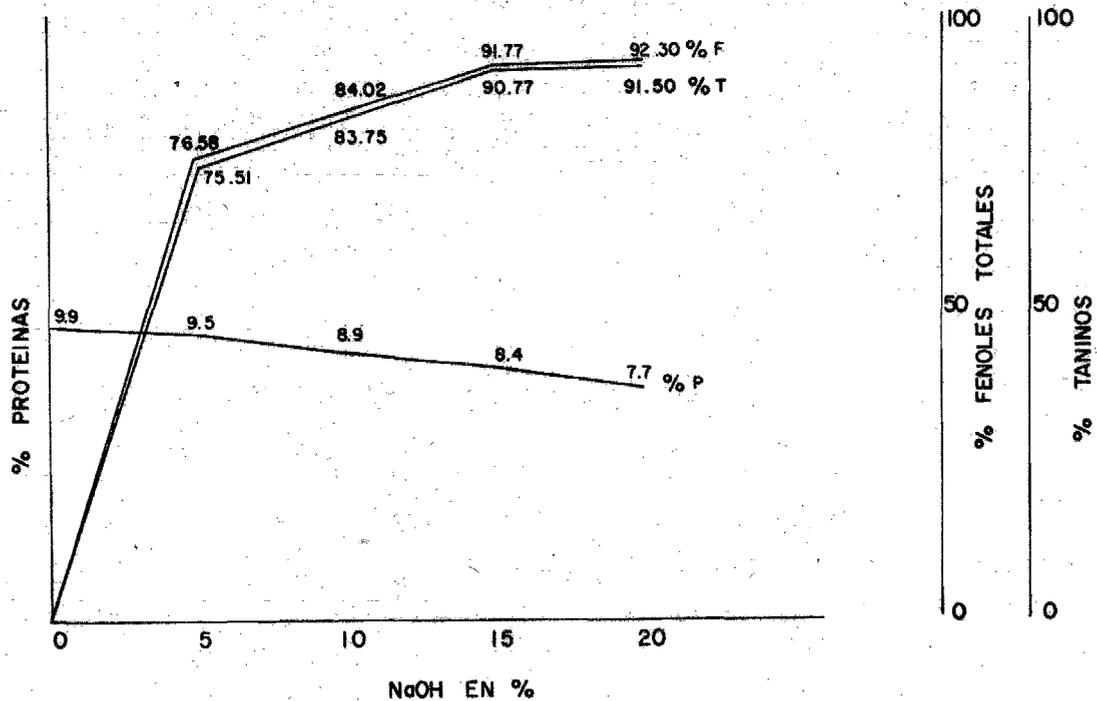
Se removieron estas cantidades tan altas de taninos y fenoles totales ya que éstos se encuentran en el pericarpio, que es la parte externa de la semilla, y en la testa, que es la capa subsecuente, y no así las proteínas que se localizan principalmente en el germen y en el endospermo debido a que no disminuyen considerablemente los niveles proteínicos (Wall y Ross, 1970).

Por otro lado también se comprobó que los lípidos y carbohidratos que contiene la semilla se remueven en muy bajas cantidades, como lo demuestra la Gráfica No. 2 .

En las investigaciones realizadas para la fermentación del sorgo, siempre utilizaron variedades blancas que no contienen taninos, no habiéndose reportado trabajos con variedades que tuvieran altas concentraciones de taninos; sin embargo, con los tratamientos térmico-alcalinos a los que fue sometido previamente el sorgo, se deja en disponibilidad a las esporas del hongo para que pasen de la fase de resistencia a la fase vegetativa, sin que haya interferencia de los taninos restantes del tratamiento térmico-alcalino.

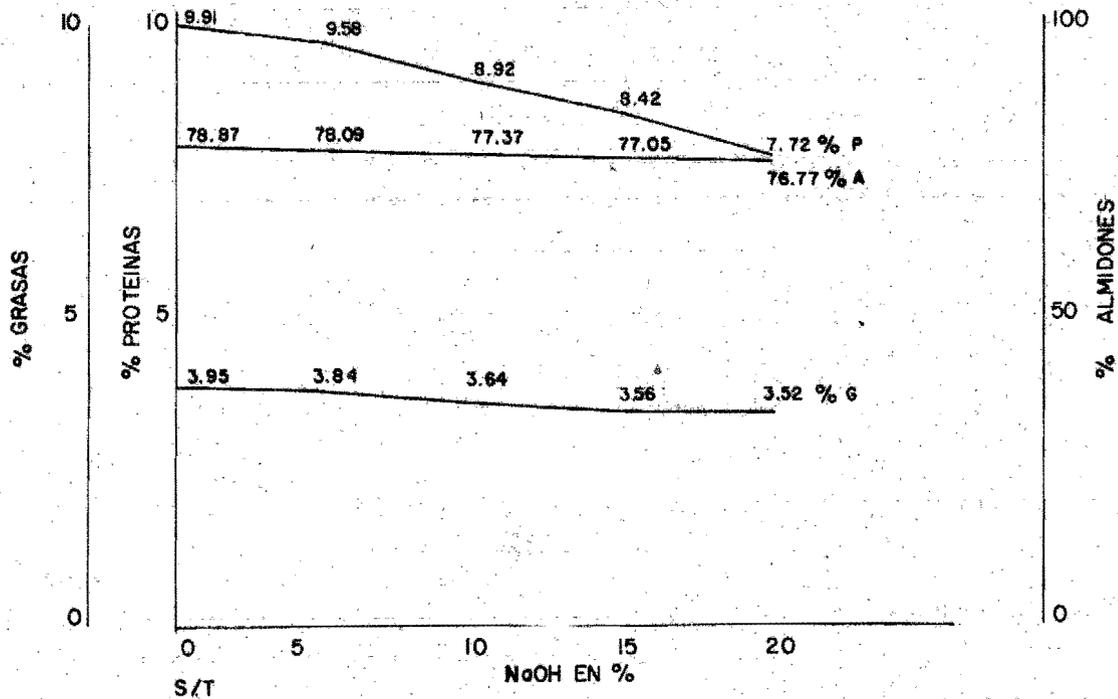
GRAFICA. I

PERDIDA PROTEINICA DEL SORGO DEBIDA A LOS TRATAMIENTOS CON NaOH A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA LA EXTRACCION DE TANINOS Y FENOLES TOTALES.



GRAFICA . 2

PORCIENTO DE PROTEINAS,ALMIDONES Y GRASAS PARA EL SORGO
 VARIEDAD GUANAJUATO CON Y SIN TRATAMIENTOS TERMICO ALCALINOS.



S/T SORGO SIN TRATAMIENTO

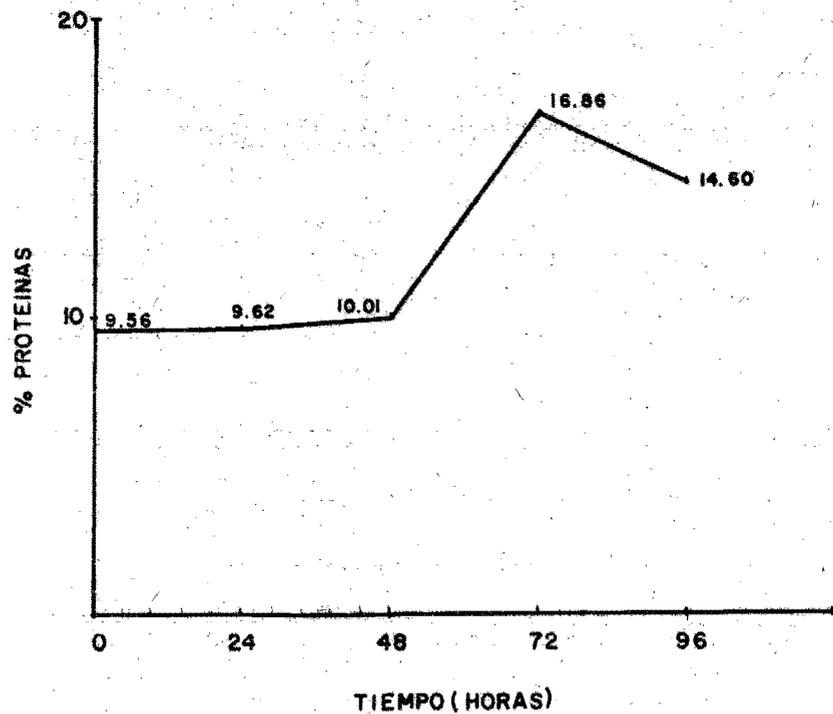
A diferencia de lo experimentado por Hesseltine (1965), donde -- después de la fermentación del sorgo con una variedad de Rhizopus se obtenía un desarrollo micelial escaso, produciendo un fermentado de poca consistencia, olor desagradable, de poca aceptación. Aquí se -- obtuvo tanto a nivel de caja Petri como a nivel de reactor biológico un producto con un buen desarrollo micelial, con poca esporulación, que provocó una buena consistencia, un olor agradable y un aspecto -- bastante aceptable.

Las pocas experiencias reportadas para la fermentación del sorgo y en las cuales no hubo éxito (Hesseltine et al., 1967), no permitieron que éstos se tomaran como marco de referencia, por ello se utilizó como base la fermentación de la soya. Sin embargo, este patrón presentó cambios tales como la morfología de la semilla, la cantidad de proteína, los lípidos y los tipos de almidones. Con estas variaciones, el tiempo inicial de desarrollo o retardo (Pelczar, et al., 1982) se alarga aproximadamente hasta las 24 horas (Gráfica No. 3).

La etapa de retardo se distingue por no presentar división celular, sino que únicamente se incrementa el tamaño de la célula más allá de las dimensiones normales y predomina una gran actividad metabólica. De las 24 a las 48 hs, se inicia el incremento proteínico y el desarrollo micelial es uniforme en todo el sustrato (Fig. No. 14), originándose un aspecto y olor agradable similar al del tempeh. Las principales discrepancias entre la fermentación del sorgo y la de la soya, radican en que en esta última la proteína disponible es únicamente -- transformada por Rhizopus, sin haber incremento, lo cual se debe a la gran cantidad de proteína (más de 35%) que presenta la soya. En la fermentación del sorgo la proteína es muy baja y sólo se incrementa al -- adicionarle nitrógeno al sustrato, de ahí que haya una transformación

GRAFICA . 3

PROMEDIO DE LOS INCREMENTOS PROTEINICOS DEL SORGO
DURANTE LA FERMENTACION A NIVEL DE CAJA PETRI.



para la síntesis de nuevas proteínas. Al haber un desarrollo proteínico se observa que R. oligosporus es capaz de incorporar nitrógeno inorgánico en este caso el del sulfato de amonio y la urea, para convertirlo en nitrógeno proteínico. Esto da como resultado un acrecentamiento aproximado de 8%, lo que demuestra que el hongo también tiene capacidad de síntesis proteínica debido a que rompe la proteína inicial por medio de proteasas, para tomar después algunos péptidos y/o aminoácidos libres y formar con éstos nuevas proteínas.

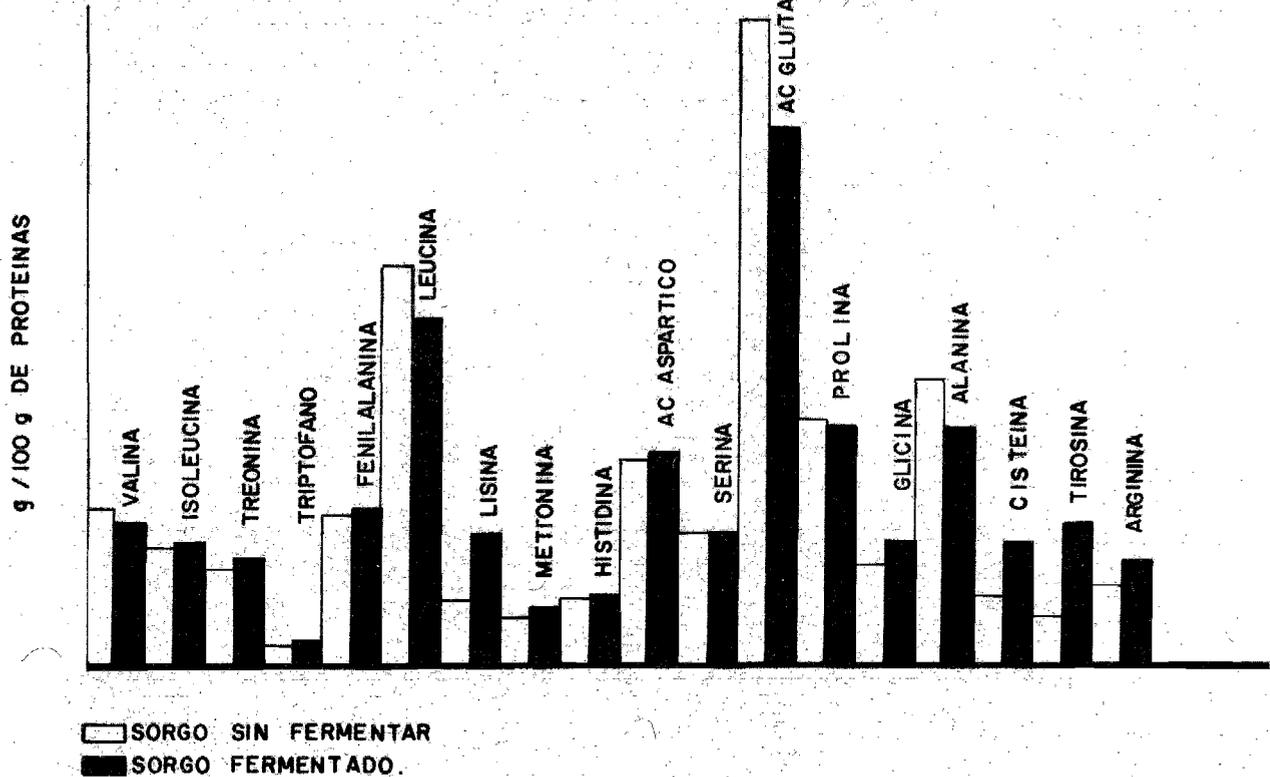
Para satisfacer su demanda de nitrógeno R. oligosporus, como resultado de la acción de las proteasas, cuenta con altas cantidades de aminoácidos como son: la leucina, el ácido glutámico y la alanina (Gráfica -- No. 4), ya que después de la fermentación se encuentran en menores cantidades.

Sorenson y Hesseltine (1966), desarrollaron estudios con soya, que advertían que la capacidad amilolítica del hongo era reducida, contrario a este planteamiento se pudo percibir que el hongo puede utilizar cantidades aceptables de almidones como fuente de carbono (Tabla No. 14). Debido a la baja disponibilidad de lípidos que tiene el sorgo (menos de 5%) para satisfacer sus necesidades de carbono, el hongo tiende a utilizar los carbohidratos de la semilla (más de 70%), por lo que puede decirse que presenta una mayor actividad amilolítica.

Las causas por las cuales la cepa de R. oligosporus tuvo una considerable actividad amilolítica y proteolítica, se pudieron deber a la adaptación que tienen las diferentes cepas a diferentes medios; a que en el sorgo la cantidad de lípidos es muy baja y varían muy poco antes y después de la fermentación; o bien, a la disponibilidad de los almidones para ser utilizados por el hongo en la gelatinización que sufren durante el esterilizado.

GRAFICA. 4

CAMBIOS EN LOS AMINOACIDOS DEL SORGO FERMENTADO CON RESPECTO A LOS DEL SORGO SIN FERMENTAR.



Después de las 72 hs. se notó una mayor cantidad de esporas en la superficie del sustrato, además de haber un decremento en cuanto a la cantidad de proteínas (Gráf. No. 1). Esto se debió tal vez a que hubo una descomposición de proteínas, llegando algunas veces hasta la hidrólisis de aminoácidos; a que existió un agotamiento de sustancias nutritivas esenciales o a una acumulación de productos inhibidores que provocan que el hongo regrese a su fase de resistencia.

En cuanto a temperatura, es conveniente utilizar un valor de 32°C pues permite un desarrollo rápido. De lo contrario, si se disminuye, el crecimiento se torna lento y se incrementa el tiempo de incubación. Si aumenta, aminora la humedad y se induce a la esporulación prematura.

La humedad con valores entre 70 y 80% contribuye a la obtención de un buen producto; el manejo de altos valores permite que a lo largo de toda la fermentación se mantenga estable consiguiéndose un buen desarrollo de micelio, sin que presente esporulación por falta de ésta. El tiempo es un factor determinante para el control de la humedad por cuanto a que es un proceso de mayor duración que el de la soya, lo que facilita pérdida de agua; de ahí que ésta deba conservarse de acuerdo a los valores mencionados en un principio.

La fragmentación y el desempaque del grano inmediatamente después de la esterilización del sustrato, permite al hongo aprovechar una mayor área de exposición para su desarrollo superficial, ésta es una característica morfológica del hongo cuando se desarrolla en su medio natural por poseer estolones y rizoides (Miller y Loeffler, 1976), esto favorece su capacidad para fijarse mejor a la superficie de exposición del sustrato. Así mismo, el fragmentado y desempaque permite a las proteínas depositadas en el interior del grano a quedar en disposición de ser aprovechadas, pues si la semilla no fuera fragmentada en pequeñas porciones, Rhizopus no podría penetrar al grano y aprovechar esos nu-

... trimentos debido a los caracteres morfológicos mencionados anteriormente.

El desempaque provoca también mayores espacios aéreos entre los -- fragmentos del grano, por tal motivo el micelio es capaz de rastrear -- estos espacios en los que hay mayor superficie de exposición, cantidad de aire y humedad.

Con el trabajo a nivel de reactor biológico hubo de variar algunas condiciones por las cantidades de sustrato que se manejaron, entre ellas la agitación, la aireación y el tipo de compuestos que contuvieran nitrogeno inorgánico.

En cuanto a la agitación se utilizaron tres tipos: continua, intermitente a iguales intervalos e intermitente con sólo 30' de agitación por 6 hs. de reposo.

En los dos primeros lotes el exceso de agitación no permitió al hongo una adecuada fijación al sustrato. En el tercer lote los 30' de agitación sirvieron para remover el exceso de calor dentro del medio y proveer de nuevas áreas de exposición para la fijación del micelio (Tabla No. 16).

El nitrógeno inorgánico que fue adicionado al medio se agregó en proporciones similares a las utilizadas a nivel de caja Petri, manteniendo un balance en la proporción de conversión de nitrógeno inorgánico a nitrógeno proteínico incorporado por Rhizopus durante la fermentación (relación $\frac{C}{N} = 30$). Obteniéndose un porcentaje de proteína un poco más alto -- del obtenido a nivel de caja Petri (Ver tablas 10 y 14).

La descomposición que hubo después de las 60 hs en el Lote No. 1 -- aparte de deberse a la falta de aireación por carencia de agitación, --

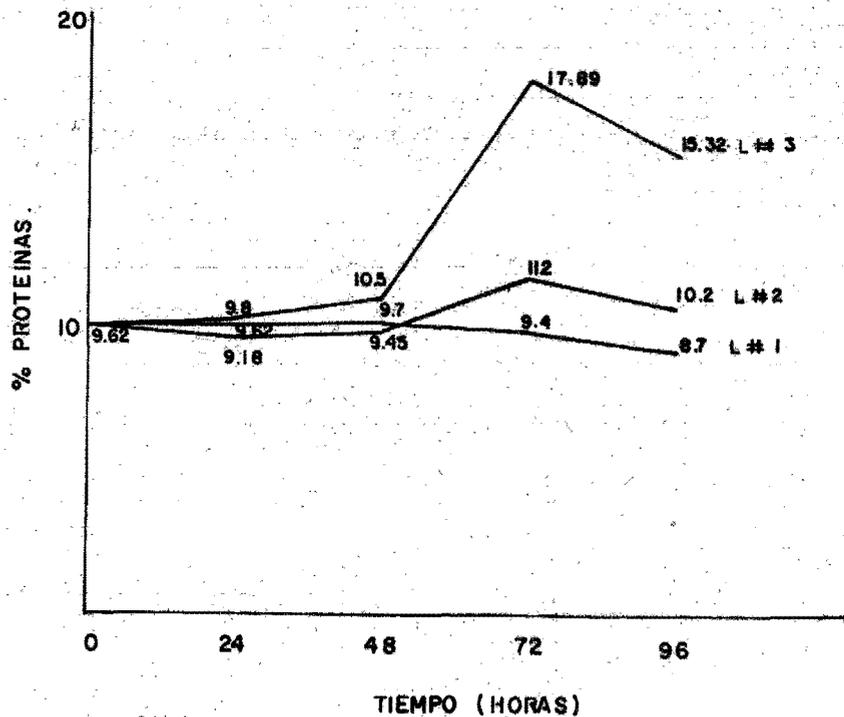
comprobó que después de las 72 hs de duración del proceso, se inicia un decremento en cuanto a la cantidad de proteína que pudo haberse producido hasta las 72 hs. Este decremento se debió tal vez a la falta de humedad provocada por el calor del metabolismo del hongo y por autólisis celular como se observó también a nivel de caja Petri. (Senez, et al, 1979) (Gráfica No. 5).

A partir de lo antes mencionado se puede decir que, el procesamiento del sorgo en el reactor biológico, permitió establecer que esta fermentación puede manejarse a gran escala con excelentes resultados.

El sorgo fermentado puede tener utilidad como pienso, para cerdos, ovejas, pollos de engorda y gallinas ponedoras en diferentes etapas de desarrollo por las cantidades de proteínas y proporciones de aminoácidos que contiene el producto. Para cerdos las necesidades de aminoácidos son un poco altas, sin embargo, el producto presenta valores cercanos a los requerimientos en la dieta diaria y en algunos casos son superiores, excepto la lisina que es el aminoácido principal con base en los términos de concentración de proteína, ésta podría ser adicionada al alimento. En ovejas se superan las necesidades proteínicas y cumple con los requerimientos de lisina, metionina, histidina, cisteína y arginina, que no pueden ser sintetizados por estos ovinos. En el caso de los pollos de engorda puede servir como alimento base cuando éstos son hembras en crecimiento; sin embargo, para machos tanto la iniciación como de crecimiento y hembras de iniciación, sólo se agregarían pequeños porcentajes (3 a 5%) para cubrir sus necesidades proteínicas, ahora bien con gallinas ponedoras de 20 a 30 semanas, también sería necesario adicionar como máximo un 1% de proteína; en cualquier otra edad, el fermentado puede ser suministrado sólo. En cuanto a los aminoácidos para estas aves, el producto supera ampliamente los requerimientos de éstos. (Ver tabla No.21)

GRAFICA. 5

CAMBIOS EN EL PORCIENTO DE PROTEINAS DE SORGO DURANTE LA FERMENTACION CON RESPECTO A LA AGITACION A NIVEL DE FERMENTADOR.



L#1 LOTE # 1
L#2 LOTE # 2
L#3 LOTE # 3

La alimentación de los equinos podría satisfacerse con el sorgo - procesado, pues cubre sus necesidades proteínicas además de que el sorgo natural se ha utilizado ya en algunos casos como parte de su dieta.

Por último para perros y gatos podría también aprovecharse en dietas comerciales elaboradas como complemento en su precisión de proteínas.

Uno de los principales beneficios que se obtendrían al utilizar esta fermentación sólida, son las considerables cantidades de lisina, que están relacionadas positivamente con la calidad de las proteínas, las que, como vimos anteriormente son primordiales para muchos monogástricos. Inclusive con estudios posteriores podría averiguarse su posible utilización en humanos, principalmente por su balance de aminoácidos en donde sólo triptófano e isoleucina no cumplen con el patrón de la FAO/WHO, (1965) (Tabla No. 2). Por otro lado contribuiría a la aceptabilidad del fermentado contener características similares al tempeh en cuanto a olor, presencia y vistosidad, además de la inocuidad comprobada del hongo (Hesseltine, 1965).

En un principio se mencionó la necesidad de producir alimento a bajo costo, en este sentido el sorgo es un cereal de alta producción y precio accesible (SAM-SARH, 1982), en cuanto al equipo necesario para la obtención del fermentado no se requiere de grandes inversiones, ni de instrumentos complejos (García F. y González E. comunicación personal). Sin embargo, este trabajo se enfocó sólo al aspecto de mejora nutricional, por esta razón, se sugiere la realización de un estudio a fondo en cuanto a la rentabilidad del proceso.

Actualmente se están estudiando aspectos nutriólogicos del producto "in vivo" con pollos, para comprobar el grado de digestibilidad y aceptación del mismo (González E. comunicación personal).

VII. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos térmico-alcálinos para la destanización del sorgo aumentan las posibilidades de aprovechamiento de sus proteínas.
2. A medida que se aumenta la concentración de NaOH durante los tratamientos térmico-alcálinos disminuye el contenido de proteínas en el grano tratado.
3. Para permitir el desarrollo micelial del hongo y evitar la esporulación se debe mantener una temperatura de 32°C e impedir el exceso de evaporación de agua (iniciando a una humedad del 77%).
4. La pérdida de humedad en el medio de la fermentación induce a una esporulación prematura del hongo.
5. Dadas las características morfofisiológicas del hongo, la molienda (malla No. 10) y el desempaque de la semilla de sorgo antes de la fermentación permite a éste tener una mayor área de exposición y facilita la adquisición de nutrimentos por el hongo.
6. Rhizopus oligosporus necesita de 72 hs. para fermentar el sorgo (a este tiempo se da la mayor producción de proteínas).
7. Por las bajas cantidades de lípidos del sorgo, el hongo no alcanza a satisfacer sus necesidades de carbono durante la fermentación. - Con la disminución de la cantidad de almidones después del proceso hay un incremento en su actividad amilolítica.
8. Al haber un incremento de proteína, el hongo manifiesta mayor actividad proteolítica.

9. R. oligosporus utiliza los aminoácidos del sorgo para la síntesis de nuevas proteínas.
10. El hongo aprovecha principalmente para la síntesis de proteínas, ácido glutámico, leucina, alanina, valina y prolina.
11. El sulfato de amonio es para Rhizopus una fuente de nitrógeno inorgánico.
12. El proceso de fermentación del sorgo mediante Rhizopus oligosporus mejora la cantidad y la calidad de las proteínas.
14. La fermentación del sorgo a nivel reactor biológico, hace factible la explotación de este proceso a nivel industrial.
15. A nivel de reactor biológico el hongo necesita de agitación intermitente para fermentar al sorgo, cubriendo así sus necesidades de aireación.
16. Por sus características nutritivas el sorgo fermentado con R. oligosporus puede ser utilizado como base dietética para algunos animales.

APENDICE I

Método de Biuret (Herbert et al., 1971)

Es una técnica utilizada para la determinación de proteínas celulares que se basa en la formación de un compuesto quelato-proteína formado por iones cúpricos con Biuret, que da una coloración azul-violeta, en soluciones alcalinas. Únicamente determina el nitrógeno de proteínas y no interfiere en la reacción de otros tipos de nitrógeno presentes en las células.

Las proteínas son liberadas previamente rompiendo las células con una solución de NaOH además, la muestra se centrifuga una vez agregado el CuSO_4 para eliminar los excesos de cobre y los residuos que no contienen proteínas.

Se pesan 2 ml de suspensión de células lavadas conteniendo de 1 a 5 mg en peso seco en tubos de centrifuga, se les agrega 1 ml de NaOH-3N y se hierve a "baño maría" durante 5 min., se enfrían los tubos y se les agrega 1 ml de CuSO_4 al 2.5% p/v cubriendo los tubos con papel parafilm y se agitan. Se dejan en reposo 5 min. y se centrifugan a -- 10,000 rpm. durante 10 min. Se lee la densidad óptica a 555 nm. Simultáneamente se prepara un blanco que contenga 2 ml de agua destilada en lugar de la suspensión de células para ajustar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia; se lee en celdas de 1 cm^3 .

Se prepara una curva que contenga una solución estándar de proteína conocida como ovoalbúmina o seroalbúmina tratándolas de la misma manera que las muestras. Se preparan 4 tubos con concentraciones de --

... 2, 4, 6 y 8 mg/ml de la proteína patrón. Se procesan los datos para obtener la curva graficando la densidad óptica contra los miligramos de proteína de las muestras.

Método de Kjeldahl (Walton, 1958; S.S.A., 1976)

Es un método que se basa en la descomposición del nitrógeno orgánico, por ebullición con H_2SO_4 , catalizado por sulfato de cobre y/o dióxido de selenio que aumenta la temperatura de la mezcla y acelera la digestión con sulfato de sodio o de potasio que oxida el hidrógeno y el carbono de la materia orgánica hasta CO_2 y agua, mientras que el H_2SO_4 se transforma en SO_2 que reduce el material nitrogenado a amoníaco.

Después se libera el amoníaco por la adición de NaOH y se destila recibiendo en una solución de ácido bórico, titulándose el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido clorhídrico o sulfúrico, cuya normalidad dependerá de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra.

El método se lleva a cabo colocando un gramo de muestra en un matraz Kjeldahl y agregando 8.5 g de mezcla digestora (compuesta por 200 g de sulfato de potasio, 20 g de sulfato de cobre y 5 g de dióxido de selenio), se agregan 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y perlas de vidrio. Se coloca el matraz en el digestor calentándolo poco a poco hasta que todo el material esté carbonizado, después se deja hirviendo hasta que la solución esté totalmente clara permaneciendo al fuego por treinta minutos más.

Se enfría el matraz y se le añaden 300 ml de agua destilada, para disolver la muestra se agregan unos gránulos de Zinc y un poco de para fina y posteriormente 90 ml de NaOH al 50% lentamente para que no se es-

... cape nada de amoniaco.

Se conecta el aparato de destilación, se recibe el destilado en un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenga 50 ml de ácido bórico al 2% introduciendo el tubo de destilación en el ácido bórico. Destilar hasta alcanzar un volumen de 250 ml. Se titulan las muestras con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico 0.1 N.

Se prepara por separado un blanco con todos los reactivos y sin muestra, calculando el porcentaje de nitrógeno de la siguiente manera:

$$\% N = \frac{(\text{ml del ácido usado en la tit} - \text{ml del blanco}) \text{ normalidad HCL} \times 0.014 \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Para sacar el porcentaje de proteína se multiplica el % de nitrógeno por un factor que normalmente es de 6.25, ya que aproximadamente el nitrógeno en las proteínas es de un 16%.

DETERMINACION DE GRASAS (Método de Soxhlet) S.S.A. 1976

Este método se utiliza para la determinación de ácidos grasos, excepto los de productos lácteos y consiste de un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter etílico que presentan las muestras.

Para realizar este método se pesan dos gramos de muestra y se colocan en un cartucho de porcelana o de papel grueso. Se transfiere el car

... tucho al extractor de Soxhlet para someterlo a reflujo durante 4 ó 5 horas, para así obtener una extracción completa. Una vez hecha la extracción completa se evapora suavemente el éter y se secan los vasos hasta peso constante y se obtiene el porcentaje de grasas de la siguiente manera :

$$\% \text{ Grasas} = \frac{\text{peso del vaso con grasas} - \text{peso del vaso sin grasas} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

DETERMINACION DE AMINOACIDOS (Stein et al., 1958)

Este es un método desarrollado por Stein et al que sirve para cuantificar los aminoácidos de las proteínas y péptidos presentes en una muestra determinada, con el analizador automático de aminoácidos Beckman, modelo 116 y que presenta una precisión de $100 \pm 3\%$.

Se basa en estudios anteriores realizados también por Stein et al. (1958), en los cuales se separan los aminoácidos en columnas de poli-resinas sulfonadas sintéticas de intercambio iónico, usando como eluyentes soluciones reguladoras de citrato de sodio a diferentes pH para los diferentes aminoácidos con uno de los grupos cetónicos de la ninhidrina junto con el eluyente a una temperatura óptima para cada aminoácido. La intensidad del color es medida por un fotómetro a 570 nm. y la intensidad es graficada en papel logarítmico con un graficador automático integrado al analizador.

Para poder obtener el contenido de aminoácidos de una muestra es necesario que éstos se encuentren en forma libre, por lo que se deben de hidrolizar las proteínas.

Previamente la muestra es sometida a los siguientes procesos:

Se extrae la grasa de la muestra según el método de Soxhlet (S.S. A., 1976), una vez desengrasada se determina el contenido de proteína por el método de Kjeldahl (Walton, 1958; S.S.A., 1976).

Se colocan en un matraz de fondo plano de 250 ml, 25 mg de proteína de la muestra sin grasa. Dependiendo de cuantos gramos de proteína hubiera tenido la muestra en 100 g. Se agregan aproximadamente 0.0015 g. extras por si hubieran existido pérdidas en la manipulación de la muestra.

Se agregan 60 ml de HCl 6 N, metiéndose a reflujo en baño de aceite durante aproximadamente 54 hs con el aceite a una temperatura de -- 160°C . Debido a que durante la hidrólisis se destruye totalmente el triptófano y parcialmente la metionina y la cistina. Se mete otra muestra oxidándola con ácido per fórmico preparado con 4.5 ml de ácido fórmico al 8% y 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 33% mezclada perfectamente. Se pasa igual cantidad de muestra agregando 1.5 ml de ácido per fórmico mojando perfectamente la muestra dejándola reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se evapora el ácido per fórmico con el evaporador rotatorio al vacío, lavándose 2 ó 3 veces con agua destilada hasta eliminar el olor a ácido dejando la muestra totalmente evaporada. Con esta oxidación se convierte a la cisteína en ácido cisteico y a la metionina en su sulfona, que permanecen estables -- durante el hidrolizado, tratándola después de la misma forma que la -- muestra sin oxidación (Schram, et al., 1954) .

Una vez hidrolizadas las muestras, se filtran y evaporan a sequedad para eliminar cualquier rastro de ácido clorhídrico. El residuo se lava

... 3 veces con 10 ml de agua destilada evaporando cada vez a sequedad con el evaporador rotatorio al vacío hasta eliminar el olor a ácido. Se recupera la muestra con una solución reguladora de citrato de sodio pH 2.2 aforando a 25 ml.

La muestra así preparada se mete al aminoanalizador para poder -- obtener la cantidad de los aminoácidos presentes en la muestra, sin -- embargo como el triptófano se destruye con la hidrólisis, se determina aparte por medio de una técnica colorimétrica.

DETERMINACION DE TRIPTOFANO (Spies y Chambers, 1949)

Este método se basa en un compuesto que se forma con el triptófano al agregarle p-dimetil aminobenzaldehído y ácido sulfúrico, que es una condensación incolora, formando después un compuesto colorido por oxidación al agregarle nitrito de sodio, leyéndose estas coloraciones en un espectrofotómetro.

Como ya se mencionó anteriormente, para realizar la determinación cuantitativa de los aminoácidos se requiere que estén libres, y para esto se necesita hidrolizar las proteínas. Dado que el triptófano se -- destruye totalmente con la hidrólisis, se realiza la siguiente técnica:

Se pesan 10 mg de muestra por triplicado dejando uno como blanco.

Se pesan aparte dos muestras de 10 mg de caseína para verificar la exactitud de la técnica conociendo ya el porcentaje de triptófano presente en la caseína; asimismo se prepara un blanco de reactivos sin -- muestra.

Se agrega a todas las muestras 2.5 ml de p-dimetil aminobenzaldehído diluido en ácido clorhídrico 1 N al 5% y 12 ml de ácido sulfúrico 21.4 N, excepto al blanco de muestra que no se le agrega el p-dimetil aminobenzaldehído y se la agrega 14.5 ml de ácido sulfúrico; estos reactivos se agregan por las paredes de los matraces, procurando que las muestras estén en contacto con los reactivos. Se dejan reposar de 17 a 20 hs en la oscuridad. Después se filtran las muestras con fibra de vidrio y al filtrado se le agrega 0.1 ml de nitrato de sodio al 0.05%, se agita y se deja reposar durante 30 min. en la oscuridad leyéndose después en el espectrofotómetro a 590 nm.

Aparte se prepara una curva patrón con triptófano pesando 10 mg de triptófano aforando a 100 ml con NaOH 1 N, tomando seis diferentes concentraciones de 0.5 ml a 3 ml agregando 2.5 ml de p-dimetil aminobenzaldehído y completando con ácido sulfúrico 21.4 N a un volumen final de 14.5 ml y tratándose de la misma manera que las muestras. Se construye la curva graficando la absorbancia de las diferentes concentraciones de las muestras dependiendo de la absorbancia de las mismas.

DETERMINACION DE ALMIDONES (Método de Faibairn) (Hassid y Neufeld, 1971)

Esta técnica se basa en la hidrólisis total con antrona, que hidroliza el polisacárido hasta glucosa formando así un compuesto colorido con la antrona. Variando las concentraciones de almidón se puede obtener desde un tono verde limón transparente, hasta un azul oscuro.

Para lograr la hidrólisis, se extraen los carbonhidratos totales contenidos en las muestras, a continuación se separan del almidón los azúcares solubles como la glucosa, fructosa y sacarosa con etanol. --

Después se disuelve el almidón de la fracción sólida con ácido perclórico. Posteriormente el almidón solubilizado se aísla con la formación de un quelato colorido al agregarle yodo-yoduro de potasio. Este complejo se desintegra en almidón y yodo. Ya que se encuentra en esta forma se agrega la antrona para hacer la determinación colorimétrica.

Se pesan 100 mg de muestra y se pasan a tubos de centrifuga de 50 ml humedeciendo la muestra con 3 gotas de etanol al 80%. Se agregan 5 ml de agua destilada agitando vigorosamente durante dos minutos. Se sumergen los tubos en baño de agua caliente de 65°C durante 2 min. Se sacan y se les agrega 25 ml de etanol al 80% agitándolos nuevamente durante 5 min. Se vuelven a poner en el baño por dos minutos y se agitan. Se enfrían a temperatura ambiente y se centrifugan 10 min a 3500 rpm. Los sobrenadantes se desechan, y a los sedimentos empacados en los tubos, se les aplica el mismo tratamiento de extracción 3 veces más.

De cada matraz se toma una alícuota de 1 ml de la solución que contenga aproximadamente de 20 a 200 mg de almidón, diluyéndola con 9 ml de agua destilada. Esta solución se vuelve a diluir, tomando nuevamente 1 ml y llevándolo a 2 ml con agua destilada. Los tubos se sumergen en hielo hasta que estén a una temperatura de 4°C, se le agregan 10 ml de reactivo de antrona a 4°C y se agitan suavemente sin sacarlos del baño de hielo. Una vez que la mezcla adquiere un color amarillo-verdoso, se sacan los tubos y se meten a un baño de agua fría. Cuando su temperatura es igual a la del ambiente se leen a 620 nm en el espectrofotómetro previamente ajustado a cero con el reactivo de antrona que se trata de la misma manera que las muestras.

Se prepara también una curva patrón con 10 diluciones de D-glucosa con concentraciones que varían desde 0 hasta 200 mg/ml siguiendo el mismo tratamiento que las muestras, graficando las absorbancias - contra las concentraciones buscando en la curva las concentraciones - de almidón de las muestras según su absorbancia.

BIBLIOGRAFIA

- Agricultural research council./1981.
The nutrient requirements of pigs
Commonwealth Agricultural Bureaux
- Alvarez M.N. y Escalona A.N./ 1982
Reporte de Servicio Social
U A M , México.
- Alvarez R., Pacheco V., Pérez Gavilán J., Pouso I y
Viniestra G.,/ 1979
Maize substitution by biofermel (molasses and prefermented
faeces) in diets for bovine cattle.
Cuban J. Agric. Sci.
- Artschwager E., McGuire y Ruth C./ 1949
Cytology of reproduction in Sorghum vulgare
J. Agr. Res.(78): 659-673
- Barham H.N., Wagoner J.A., Campbell C.L., y
Harclerode E.H./ 1946
Chemical composition of some sorghum grains and the
properties of their starches
Kansas Agr. Expt. Sta. Tech Bull (61): 1-47
- Blessin C.W., Anderson R.A., Deatherage W.L. e
Inglett G.E.,/ 1971
Effect of alkali dehulling on composition and wet-milling
characteristics of sorghum grain.
Cereal Chem (4): 528-532
- Blessin C.W., Dimler R.J. y Webster O.J./ 1962
Carotenoids of corn and sorghum. II Carotenoid
loss in yellow-endosperm sorghum grain during
weathering.
Cereal Chem (39): 389-392
- Ceballos M., Santiago P. y Tomasini A./ 1981
Producción de tempeh
Reporte de Servicio Social
UAM, México.

- Cejudo H. / 1978
Estudio de metodologías físicas para la determinación de taninos y la actividad de la enzima catecol-oxidasa en granos de sorgo (Sorghum bicolor (L.) Moench) utilizados para la alimentación.
Tesis de M.en C.
Colegio de postgraduados, ENA.
Chapingo, Méx.

- Chavan J.K., Kadam S.S., Ghonsikar C.P. y Salunke D.K./ 1979
Removal of tanins and improvement of in vitro protein digestibility of sorghum seed by soaking in alkali.
J. Food Sci (44): 1319-1321.

- Clayton W.D./ 1961
Proposal to conserve the generic name Sorghum Moench (Gramineae) versus Sorghum Adams (Gramineae)
Taxon (10): 242-243

- Dalton J.L. y Mitchell H.L./ 1959
Grain wax components, Fractionation of sorghum grain wax.
J. Agr. Food Chem (7): 570-573

- Deatherage W.L., MacMasters M.M. y Rist C.E./ 1955
A partial survey of amylose content in starch from domestic and foreign varieties of corn, wheat and sorghum and from some other starchbearing plants.
Tran. Amer. Assoc. Cereal Chem (13): 31-42

- FAO/WHO./ 1965
Protein Requeriments
Food Agr. Organ
U.N. FAO Nutr. Meetings Rept. Ser. 37,36

- Gómez J., Revah S., Raimbault M., González E. y Palma M. /1982
"Producción de forrajes por fermentación sólida" en fermentaciones en sustratos sólidos."
Network of Resource centers in the Caribbean region for applied microbiology and bioengineering.
Mircen, UNESCO.

- González H.E./ 1978
Production of fungal protein from corn starch
M. in Sci. Thesis
Queen's University at Kingston, Canada.

- Hagerman A.E. y Butler L.G./ 1981
The specificity of proanthocyanidin-protein interactions
J. Bioch. Chem 256 (9): 4494-4497
- Hassid W.Z. y Neufeld E.F./ 1971
Whole starches and modified starches
(9) Quantitative determination of starch in plant tissues
Methods in Carbohydrate Chemistry 33 IV.
- Herbert D., Philipps P.J. y Stange R.E./ 1971
(J.R. Morris & D.W. Ribbons, eds)
Methods in Microbiology 5b, 244
Academic Press, New York.
- Hesseltine C.W./ 1965
A millenium of fungi, food and fermentation
Mycologia (57): 149
- Hesseltine C.W., Smith M. y Wang H.L./ 1967
New fermented cereal products
Develop Ind. Microbiol. (8): 179
- Jurgens M.H./ 1974
Applied animal feeding and nutrition
Kendall/Hunt publ. Co.
Iowa, U.S.A.
- Kazanas N. y Fields M./ 1981
Nutritional Improvement of sorghum by fermentation
J Food Sci. (46): 819-821
- Krause M.V. y Hunscher M.A./ 1972
Nutrición y dietética en clínica
Ed. Interamericana
México.
- Luce W.G., Peo E.R. Jr. y Hudman D.B./ 1967
Availability of niacin in corn and milo forswine
J Animal Sci (26): 76-84
- Martínez A./ 1982
Experiencias sobre biometanización en el Instituto
de Investigaciones eléctricas.
"Simposio Internacional Avances en digestión anaerobia"
México

- Matz S.A./ 1959
The Chemistry and technology of cereals as food and feed.
The Avi publishing company, Inc.
Westport, Conn., U.S.A.
- Merck & Co. Inc./ 1981
Manual de veterinaria
U.S.A.
- Mitchell H.S., Rynbergen H.J., Anderson L. y Dibble M.V./ 1970
Nutrición y dieta
Ed. Interamericana
México.
- Miller E. y Loeffler W./ 1976
Micología
Omega
Barcelona, España.
- Munro H.N./ 1969
Mammalian protein metabolism
H.N. Munro, Editor, Vo. 3 pp.250
Academic Press,
New York, U.S.A.
- Murray R.S./ 1970
Teoría y Problemas de estadística
Serie de compendios Schaum
McGraw-Hill,
México.
- Nelson J.H. y Richardson G.H./ 1967
Molds in flavor production (Chapter 4), in Microbial Technology
Henry Peplér Ed. 1
Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.
- Osborne T.B./ 1924
The vegetable proteins
Longmans Green and Co.
London, England
- Paulson I.W./ 1962
Embryogeny and seedling development to flora transition of
Sorghum vulgare
Thesis
Iowa State Univ.

- Pelczar M.J. Jr., Reid R.D. y Chan E.C.S./ 1982
Microbiología
Mc. Graw Hill Co., Inc.
México.
- Pinta M. y Busson F./ 1963
Chemical study on sorghum and African millet
(Mineral elements and minor elements)
Ann. Nutr. Aliment. (17): 103-126
- Price M.L., Butter L.G., Rogler J.C. y
Featherston W.R./ 1979
Overcoming the nutritionally harmful effects of tannin in
sorghum grain by treatment with inexpensive chemicals
J. Agr. Food Chem 27 (2): 441
- Rackis J.J./ 1961
Aminoacids in Soybean hulls and oil meal fractions.
J. Agr. Food Chem (9): 409-412
- Robinson Corinne H. / 1978
Fundamentos de nutrición normal
C.E. C.S.A.
México.
- SAM-SARH./ 1982
Estimación de Resultados de la producción agrícola nacional.
SAM-SARH
México.
- Sánchez S.O./ 1976
La flora del valle de México.
Ed. Herrero
México.
- Sanders E.H./ 1955
Developmental morphology of the Kernel of grain sorghum
Cereal Chem (32): 12-25
- Schram E., Moore S. y Bigwood E.J./ 1954
Chromatographic determination of cystine as cysteic Acid.
Biochem (57): 33
- Scott M.L., Nesheim M.C. y Young R.J./ 1972
Nutrition of the chicken
M.L. Scott & Associates published
Ithaca, New York.

- Senez J.C., Deschams F., Meyer F. y Raimbault M./ 1979
Direct protein enrichment of starchy products by fungal
solid fermentation
O.R.S.T.O.M., Procr.,
GIAMV Bangkok 425.
- Senez J.C., Raimbault M. y Deschamps F./ 1979
Protein enrichment of starchy substrates for animal
feeds by solid-state fermentation
O.R.S.T.O.M.
Procr. GIAMV, Bangkok 425. Anexo. 1
- Shurtleff W. y Aoyagi A./ 1980
Tempeh production
New-Age Foods
U.S.A.
- Simonds D.H. y Orth R.A./ 1980
Structure and composition of cereal proteins as
related to their potential industrial utilization
Department of Plant Science
University of Manitoba
Winnipeg, Manitoba, Canada.
- Sorenson W.G. y Hesseltine C.W./ 1966
Carbon and Nitrogen utilization by Rhizopus oligosporus
Mycologia (58): 681
- Spies J.R. y Chambers D.C./ 1949
Chemical determination of tryptophan in proteins
Analytical chemistry 21 (10): 1249
- S.S.A./ 1976
Técnicas para el análisis fisicoquímico de alimentos.
S.S.A.
México, D.F.
- Stein W.H., Spackmann H. y Moore S./1958
Chromatographic recording apparatus, use in the chromatography
of aminoacids
Analytical chemistry 30 (7): 1190
- Steinkraus K.H., Hwa. Y.B., Buren J.P.
Van Proventi M.I. y Hand D.B./ 1960
Studies on tempeh and Indonesian fermented soybean food.
Food Res. (25): 777



BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

- Taira H. / 1964
Aminoacids contents in food crops VII. Effects of
difference of ripening stage on aminoacids in sorghum
Tokyo Food. Res. Inst. Rept. (18): 82

- Tanner F.W. Jr., Pfeiffer S.E. y Curtis J.J. / 1947
B-complex vitamins in grain sorghums
Cereal Chem (24): 268-274

- Virupaksha T.K. y Sastry L.V.S. / 1968
Studies on the protein content and aminoacid
composition of grain sorghum
J. Agr. Food Chem (16): 199-203

- Wall J.S. y Ross W.M. / 1970
Sorghum production and utilization
The Avi publishing Co., Inc.
Westport, Connecticut, U.S.A.

- Walton H.F. / 1958
Elementary Qualitative analysis
Practice-Hall, Inc.
Evalewoods/Cliffs, N.Y.

- Wang Y.D. y Fields M.L. / 1978
Germination of Corn and Sorghum in the home to improve
nutritive value
J Food Sci (43): 1113

- Wang H.L., Swain E.W. y Hesseltine C.W. / 1975
Mass production of Rhizopus oligosporus spores and
their application in tempeh fermentation
J Food Sci (40): 168-170

- Watson S.A. / 1967
Manufacture of corn and milo starches
(Chapter I) in starch chemistry and technology II
Industrial Aspects
Academic Press, Inc.
New York, U.S.A.

- Watson S.A., Sanders E.H., Wakely R.P. y Williams C.B. / 1955
Periphetal cells of the endosperms of grain-sorghum and corn
and their influence on starch purification
Cereal Chem (32): 165-182

- World Health Organization/ 1973
Energy and protein requirements
World Health Organization Technical Report Serie # 522
Rome, Italy.

- Young M.A./ 1982
Biometanización de las pulpas de café.
Alimentación alternada o mezclada con estiércol de bovino.
Simposio Internacional "Avances en digestión anaerobia"
México