

# Incremento de la calidad nutritiva potencial de la harina de follaje de *Stizolobium niveum* (*Mucuna*) mediante fermentación en estado sólido con el hongo *Trichoderma viride* M5-2

**Heilyn Pérez- Soler, Julio César Dustet -Mendoza\*, Elaine Valiño -Cabrera\*\***

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana.

\*Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Calle 114, # 11901, e/ Ciclovía y Rotonda, Marianao, Cujae. \*\*Instituto de Ciencia Animal Carretera Central Km 47 1/2, San José de las Lajas CP 32700. Cuba.heilyn.perez@cnic.edu.cu

Recibido: 15 de julio de 2016.

Aceptado: 21 de noviembre de 2016.

Palabras clave: Fermentación en estado sólido, *Stizolobium niveum*, *Trichoderma viride* M5-2.

Key words: solid state fermentation, *Stizolobium niveum*, *Trichoderma viride* M5-2.

**RESUMEN.** El uso de materias primas alternativas en la elaboración de alimento animal, para sustituir importaciones, reduce la competitividad con la alimentación humana y preserva el medio ambiente, lo que constituye un reto en la actualidad. El potencial de las harinas de follaje de leguminosas para usarlas en la alimentación animal ha sido demostrado. Sin embargo, estas harinas poseen limitaciones desde el punto de vista de la disponibilidad biológica de varios nutrientes las cuales pudieran ser atenuadas mediante la aplicación de procesos fermentativos. En este sentido a través de una fermentación en estado sólido (FES) se pueden lograr modificaciones bioquímicas y estructurales en las harinas que eliminen gran parte de estos componentes antinutricionales con un consecuente incremento del valor nutritivo del producto resultante. En este trabajo se realiza un proceso de fermentación en estado sólido de una harina de la leguminosa *Stizolobium niveum* con un inóculo de un 10% de la masa húmeda extraída de una fermentación previa con la cepa *Trichoderma viride* M5-2. Los resultados mostraron una disminución de la fibra detergente neutro (FDN) a partir de las 24 horas de fermentación y la mayor disminución (6,14 unidades porcentuales), se obtuvo entre las 48 y 96 horas de fermentación con un aumento de 2 unidades porcentuales del valor inicial de proteína verdadera con respecto al tiempo. Estos resultados indicaron un incremento de la calidad nutritiva de la harina de forraje de *S. niveum*.

**ABSTRACT.** The use of alternative raw materials in the production of animal feed, to substitute imports, reduces competitiveness with human food and preserves the environment, which is a challenge today. The potential of leguminous foliage meal for use in animal feeding has been demonstrated. However, these flours have limitations from the point of view of the biological availability of several nutrients which could be attenuated by the application of fermentative processes. In this sense, through solid state fermentation (SSF), biochemical and structural modifications can be achieved in the flours that eliminate a large part of these antinutritional components with a consequent increase in the nutritional value of the resulting product. In this work a solid state fermentation process of a flour of the legume *Stizolobium niveum* is carried out with an inoculum of 10% of the wet mass extracted from a previous fermentation with the strain *Trichoderma viride* M5-2. The results showed a decrease of the neutral detergent fiber (NDF) from the 24 hours of fermentation and the greatest decrease (6,14 percentage units), was obtained between 48 and 96 hours of fermentation with an increase of 2 percentage units of the initial value of true protein with respect to time. These results indicated an increase in the nutritive quality of the forage flour of *S. niveum*.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha existido un creciente interés en el desarrollo de procesos biotecnológicos para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. En este sentido, las fermentaciones en estado sólido (FES) juegan un papel muy importante por sus resultados en la biorremediación<sup>1</sup> y en la producción de enzimas y productos farmacéuticos para el consumo humano. Estos procesos de fermentación son utilizados también para la búsqueda de

nuevas alternativas en la producción de alimento animal, ya que permiten aumentar el contenido de proteína y disminuir la fibra de algunos residuos agrícolas<sup>2</sup>. La obtención de este tipo de alimento puede ocurrir a partir de la FES en condiciones rústicas, en la cual el proceso se desarrolla en piso de cemento y no se logran controlar las principales variables ambientales.

En Cuba existe un gran interés de producir de manera eficiente y con bajos costos alimento animal para especies monogástricas, a partir de la selección de materias primas alternativas con una biodisponibilidad aceptable y que compitan lo menos posible con la alimentación del hombre<sup>3</sup>.

En años recientes se han realizado diferentes investigaciones sobre la evaluación de las harinas de follajes de leguminosas tropicales, se concluyó que desde el punto de vista agronómico y bromatológico tienen una composición muy similar, y se recomienda la necesidad de realizar estudios fisiológicos nutricionales para llegar a una respuesta de las posibilidades de uso de estas dos variantes en la alimentación animal<sup>4</sup>.

Sin embargo, otros estudios han confirmado que la utilización de alimentos fibrosos tropicales como las harinas de follaje de *Stizolobium niveum* (mucuna), *Cannavalia ensiformis* (canavalia) y *Lablab purpureus* (dolicho) presentan varias limitaciones como son, la presencia de factores antinutricionales, con diferentes naturaleza química y localización, así como un elevado contenido de lignina de la pared celular vegetal, lo que disminuye su valor nutritivo potencial y puede tener un mayor o menor efecto en el fisiologismo digestivo, según la especie monogástrica<sup>5</sup>. Estas limitaciones han propiciado la búsqueda de procesos tecnológicos que produzcan modificaciones bioquímicas estructurales de las harinas que eliminen gran parte de los componentes antinutricionales con el consecuente incremento del valor nutritivo del producto resultante.

Por otra parte, se ha informado que la utilización del hongo mutante *Trichoderma viride* 137 MCX1 en un proceso de FES con la mezcla de *Vigna unguiculata* y bagazo de caña, redujo el contenido de fibra y de los taninos condensados (factor antinutricional) a la mitad, éstos últimos debido a la presencia de enzimas polifenoloxidasas<sup>6</sup>.

En estudios posteriores se comprobó el hecho de que la fermentación en estado sólido de las harinas integrales de *L. purpureus* y *S. niveum* con la cepa *Trichoderma viride* M5-2 a escala de laboratorio posibilita la reducción del contenido de la fibra neutra detergente y celulosa a través del proceso, lo cual mejoró la calidad nutritiva de estos sustratos con el objetivo de utilizarlos en la alimentación animal<sup>7</sup>. Para las harinas de follaje de *S. niveum* se desconocen los cambios que se producen durante su transformación en estado sólido con el hongo *Trichoderma viride* M5-2 y si estos cambios incrementan la calidad nutritiva del sustrato. Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de este estudio es incrementar la calidad nutritiva potencial de la harina de follaje de *Stizolobium niveum* (Mucuna) mediante la fermentación en estado sólido con el hongo lignocelulolítico *Trichoderma viride* M5-2.

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría en colaboración con el Instituto de Ciencia Animal, durante el período de febrero de 2014 a junio de 2014.

### PARTE EXPERIMENTAL

El proceso de fermentación se realizó en erlenmeyers de 500 mL con 10 g de *S. niveum*, los cuales se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Primeramente, se utilizaron tres erlenmeyers, a estos se les añadió, en el cuarto de siembra y bajo condiciones de asepsia, la solución homogénea de agua destilada estéril con la solución de esporas y las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  al 6% para obtener un 70% de humedad en el medio de cultivo y  $10^7$  esporas/g de *S. niveum* seca inicial. Luego se homogeneizó la mezcla y los erlenmeyers se colocaron durante 72 horas en la incubadora a 30°C. Luego de transcurrir las 72 horas se extrajeron de los tres erlenmeyers un 10% de la masa húmeda y el resto se utilizó para determinar el pH y la actividad exo  $\beta$ 1-4 glucanasa. Este 10% de masa húmeda sirvió de inóculo para el nuevo proceso de fermentación que involucró a los nueve erlenmeyers restantes; los cuales se les añadieron las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  al 6% para tamponear el medio y agua destilada estéril para alcanzar un 70% de humedad. Toda la manipulación anterior se realizó en el cuarto de siembra. Finalmente se pusieron a incubar durante 72 horas y a 30°C.

Se tomaron muestras a las 24, 48 y 96 horas, con tres réplicas para cada tiempo y se utilizaron para determinar fibra neutra detergente<sup>8</sup>, proteína verdadera<sup>9</sup> y materia seca residual<sup>10</sup>. Para el procesamiento de los resultados se realizó un ANOVA de clasificación simple en el sistema estadístico INFOSTAD, versión 1.0 (2008) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y se establecieron las diferencias entre medias para cada variable en cada tiempo realizando un análisis a posteriori mediante la prueba de Duncan<sup>11</sup>.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Una de las características fundamentales de las harinas de follajes es el contenido de fibra, el cual afecta evidentemente su calidad nutricional, al influir negativamente en la digestibilidad de los nutrientes que componen el alimento<sup>12</sup>. Los resultados del análisis del contenido de materia seca residual (MSr) y de fibra neutra detergente (FND) para el sustrato, durante el proceso fermentativo de la harina de follaje de leguminosas *S. niveum* con un

inóculo, de un 10% de la masa húmeda extraída de una fermentación previa con la cepa *Trichoderma viride* M5-2, se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Contenido de fibra y materia seca en las muestras de la fermentación de *S. niveum* con preinóculo de *Trichoderma viride* M5-2.

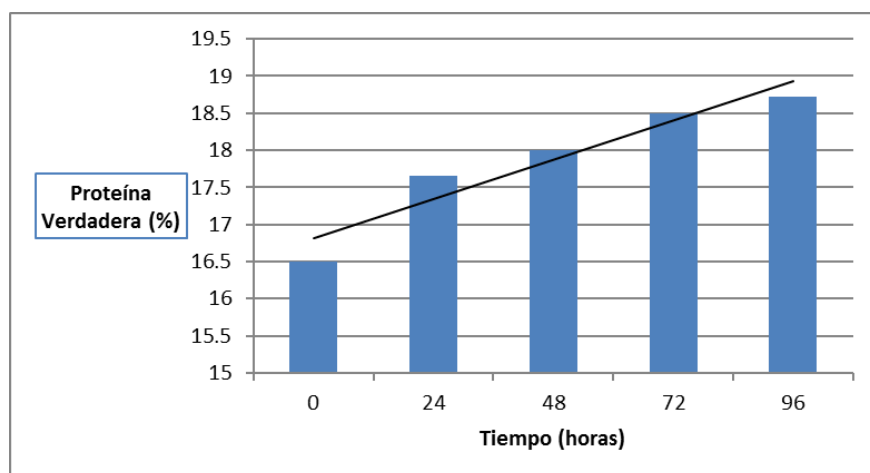
Variables	Tiempo (horas)			
	0	24	48	96
MSr (%)	89,31 <sup>a</sup>	94,41 <sup>c</sup>	94,42 <sup>c</sup>	93,03 <sup>b</sup>
FND (%)	72,75 <sup>b</sup>	73,41 <sup>b</sup>	67,38 <sup>a</sup>	66,61 <sup>a</sup>

\*letras distintas indican diferencias significativas (P< 0,001).

El menor contenido de FND se obtuvo a las 96 h, con respecto a tiempo cero (control), disminuyendo 6,14 unidades porcentuales con respecto al valor inicial (P<0,001), como resultado de la acción hidrolítica de las enzimas producidas durante la FES por la cepa *T. viride*M5-2. Esta reducción se puede explicar por los elevados valores de nitrógeno asociado a este indicador<sup>13</sup> ya que los hongos empleados para la fermentación, además de utilizar los componentes de la pared como la hemicelulosa, también pudieron utilizar parte del nitrógeno asociado a la fibra como nutriente para crecer en estos sustratos, antes de comenzar a degradar la lignina<sup>14</sup>. Por su parte, la materia seca se reduce producto de la volatilización de componentes sólidos, unido, además, a la producción de agua y CO<sub>2</sub> por el metabolismo del hongo.

Uno de los aspectos más relevantes de los resultados mostrados es el elevado contenido de proteína de esta leguminosa. La cepa *Trichoderma viride* M5-2 en la transformación de este sustrato, logra aumentar en 2 unidades porcentuales el valor inicial de proteína verdadera con respecto al tiempo, (Fig. 1), lo que demuestra el potencial del hongo *Trichoderma viride* M5-2 para el crecimiento sobre estos sustratos fibrosos y con alto contenido en taninos, y otros factores antinutricionales. Comportamiento similar se obtuvo en el procesamiento de los granos de esta especie de leguminosa por las enzimas celulasas de este hongo, la cual permitió desarrollar un proceso fermentativo biológicamente factible tanto con granos enteros como molidos<sup>14</sup>.

Los resultados obtenidos demuestran que la extracción de un 10% de la masa húmeda puede comportarse como inóculo para realizar procesos fermentativos en estado sólido a gran escala sin adición de otros nutrientes, lo que abarata el proceso. Existen microorganismos productores de enzimas hidrolíticas en residuos de la producción agrícola por fermentación en estado sólido que la pre-digestión de tales materiales con ligninasas, xylanases, pectinasas y celulasas, favorecen el incremento de proteína y aumentan el valor nutricional para el ganado<sup>15</sup>, por su parte cuando se inoculan microorganismos celulíticos por fermentación en estado sólido de pangola, se obtiene un incremento de proteína en un rango de 5,97-6,28 hasta 7,09-16,96% con valores bajos de avicelasa, PFasa y β glucosidasa, pero que mejora la calidad de esta gramínea bajando el porcentaje de celulosa, lo cual es beneficioso para la alimentación animal<sup>16</sup>.



**Fig. 1.** Contenido de proteína verdadera en la fermentación de la harina *S. niveum* por la cepa *Trichoderma viride* M5-2.

## CONCLUSIONES

Con las condiciones de fermentación de *S. niveum* como sustrato sólido humedecido a un 70%, suplementado con las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (6%) y un pre inóculo sólido de 10% en base húmeda extraída de una fermentación previa con la cepa *Trichoderma viride* M5-2, se producen a las 96 horas de proceso en la estructura química del sustrato una disminución de aproximadamente 6,14 unidades porcentuales de la fibra detergente neutro y un aumento de alrededor de 2 unidades porcentuales de la proteína verdadera. Estos cambios producen un incremento de la calidad nutritiva del sustrato, lo que justifica su uso como alimento animal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Julián R, Ramos LB, Ferrer K. Cinética del crecimiento microbiano en residuos de la industria azucarera por fermentación en estado sólido para la producción de alimento animal. *Revista Producción Animal*. 2007; 41-44.
2. Rodríguez Z, Elías A, Riverí. Estudios de utilización de boniato (*Ipomea batatas Lam*) en la fermentación en estado sólido de la caña de azúcar. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 1998;32:307.
3. Savón L. Alimentos fibrosos tropicales y su efecto en la fisiología digestiva de especies monogástricas especies monogástricas. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 2005;39.
4. Díaz MF. Producción y caracterización de forrajes y granos de leguminosas temporales para la alimentación animal. [Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba;2000.
5. Savón L, Scull I, Dihigo LE, Martínez M, Ibarra A, Castro M, *et al*. Informe final de proyecto. PNCT No.003. Biotecnología Agropecuaria. La Habana, Cuba, 2007. Evaluación biofisiológica de harinas integrales y de harinas de follajes tropicales con posibilidades de uso en la alimentación de las aves, cerdos y conejos.
6. Valiño E, García R, Albelo N. Efecto de la inoculación de la cepa de *Trichoderma viride* 137MCXI en mezclas de *Vigna unguiculata* y bagazo de caña de azúcar para disminuir factores antinutricionales. *Rev. cubana Cienc.agric*. 2002; 38(1):65.
7. Valiño., Savón L, Elías A, Ibarra A, Albelo N. Biotransformación de las harinas de follaje de *Stizolobium niveum* (mucuna) y *Lablab purpureus* (dolicho), por la cepa *Trichoderma viride* M5-2. III Congreso de Producción Animal Tropical, Ciudad Habana, Cuba. p. 183; 2010.
8. Meir H. *Laborpraktikure. Tierernahrungund, futtermitteln für Tierproduzenten* .Verlag. Berlin. 1986
9. AOAC. *Official methods of analysis*. Arlington, Virginia, USA .1995.
10. Duncan, Multiple range and multiple F test. *Biometrics*.1955; 11: 1.
11. Savón L, Leyva O, González T. Caracterización físico química de la fracción fibrosa de cinco variedades de harina de forraje de *Vigna unguiculata* para especies monogástricas. *Rev cubana Cienc. Agric*. 2000; 34:137.
12. Martín-Cabrejas MA, Díaz MF, Aguilera Y, Benítez V, Mollá E, Esteban RM. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry*. 2008; 107: 1045-1052.
13. Valiño E, Savón L, Elías A, Rodríguez M, Albelo N. Mejora del valor nutritivo de leguminosas temporales *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium niveum*, *Lablab purpureus*, mediante el procesamiento de sus granos por celulasas de *Trichoderma viride* M5-2. *Rev cubana Cienc. Agric*. 2013; 49:81-89.
14. Van Soest P, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991. 74: 3583-3597.
15. Graminha E, Gonçalves AZL, Pirota RDPB, Da Silva R, Gomes E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition *Animal Feed Science and Technology*. 2008. 144(23):1-2.
16. HuChan Chin, Liu Li-Yun, Yang Shang-Shyng. Protein enrichment, cellulase production and in vitro digestion improvement of pangolagrass with solid state fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2012; 45(1): 7-14.