

02

Fecha de presentación: marzo, 2022
Fecha de aceptación: junio, 2022
Fecha de publicación: septiembre, 2022

INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

SOBRE LOS FACTORES ANTINUTRICIONALES DE LA HARINA DEL
MUTABILIS SWEET SOMETIDA A FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *A. NI-*
GER Y *T. VIRIDE*

INFLUENCE OF PHYSICAL PARAMETERS ON ANTINUTRITIONAL FACTORS OF *L. MUTABILIS SWEET* FLOUR SUBJECTED TO SOLID FERMENTATION WITH *A. NIGER* AND *T. VIRIDE*

David Catagua¹

Email: catagua@cujae.quimica.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9418-7253>

Julio Cesar Dustet Mendoza¹

Email: jcdm@quimica.cujae.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2044-0383>

Elaine C. Valiño Cabrera²

Email: evalino@ica.co.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4178-3286>

Kathy De la Cruz¹

Email: klam@quimica.cujae.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-3533>

¹Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría” CUJAE, La Habana, Cuba

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Catagua, D., Dustet Mendoza, J. C., Valiño Cabrera, E. C., & De la Cruz, K., (2022). Influencia de los parámetros físicos sobre los factores antinutricionales de la harina de *L. mutabilis Sweet* sometida a fermentación sólida con *A. niger* y *T. viride*. *Revista Universidad y Sociedad*, 14(5), 20-28.

RESUMEN

Los residuos agroforestales pueden ser una fuente de alimento muy aprovechable para el ganado monogástrico, no obstante, los mismos componentes de estos residuos y la presencia de ciertos metabolitos (flavonoides y polifenoles) pueden llegar a convertirse en factores antinutricionales (FAN) que impiden la correcta asimilación de los nutrientes por parte del ganado. Para encontrar los mejores parámetros para obtener la mayor reducción de estos FAN en la harina de follaje de *Lupinus mutabilis Sweet* mediante fermentación en estado sólido con las cepas *Aspergillus niger* J1 y *Trichoderma viride* M5-2, se realizaron dos experimentos a escala de laboratorio. Se utilizaron dos diseños completamente aleatorizados, con arreglos factoriales 22 y tres repeticiones. Los factores fueron pH y humedad para el primer experimento y temperatura y diámetro de partícula para el segundo. Como resultado se obtuvieron cambios en las propiedades físico-químicas de la harina estudiada, con notable disminución de la fibra, flavonoides y polifenoles, siendo mejores los obtenidos con *A. niger* J1 llegando a disminuir los polifenoles hasta un 87% y los flavonoides en un 63%.

Palabras clave: Temperatura, pH, *T. viride*, *A. niger*.

ABSTRACT

Agroforestry residues can be a very usable feed source for monogastric cattle, however, the same components of these residues and the presence of certain metabolites (flavonoids and polyphenols) can become anti-nutritional factors (ANF) that prevent the correct assimilation of nutrients by cattle. To find the best parameters to obtain the greatest reduction of these ANF in *Lupinus mutabilis Sweet* foliage meal by solid-state fermentation with *Aspergillus niger* J1 and *Trichoderma viride* M5-2 strains, two laboratory-scale experiments were conducted. Two completely randomized designs were used, with 22 factorial arrangements and three replicates. The factors were pH and humidity for the first experiment and temperature and particle diameter for the second experiment. As a result, changes were obtained in the physicochemical properties of the flour studied, with a notable decrease in fiber, flavonoids and polyphenols, being better those obtained with *A. niger* J1, decreasing polyphenols up to 87% and flavonoids by 63%.

Keywords: Temperature, pH, *T. viride*, *A. niger*.

INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícolas, ganaderas y agroindustriales producen constantemente grandes cantidades de residuos que contaminan y afectan al medio ambiente cuando no son desechadas adecuadamente, tales desechos pueden dañar irremediablemente los ecosistemas. Debido a su alto potencial energético y sus características nutricionales muchos de estos desechos agroindustriales se utilizan como un suplemento del ganado, principalmente en rumiantes, desempeñando un valor clave en la mejora nutricional del pienso animal (Quintanilla-Medina, et al., 2018). El uso de fuentes fibrosas en la alimentación de especies monogástricas constituye, en la actualidad, una estrategia apropiada para lograr sistemas de producción socialmente deseables y económicamente viables. Sin embargo, uno de los inconvenientes del uso de estos desechos agroindustriales es la presencia de compuestos que por su estructura química actúan como antinutrientes (Fibra, polifenoles, flavonoides) cuando están presentes en grandes cantidades (Savón et al., 2005).

La fermentación en estado sólido es un método confiable que permite reducir los factores antinutricionales presentes en estos compuestos (Valiño, et al., 2015), no obstante existen factores externos que afectan de manera significativa el proceso de fermentación y que deben ser conocidos para poder mejorarlo y obtener una mayor reducción de los factores (Li, et al., 2016).

La humedad es una de las variables más importantes a ser controladas durante un proceso de fermentación en estado sólido, dependiendo del sustrato a fermentar, el microorganismo usado y el objetivo planteado, esta debe estar entre el 30 y el 80% (Oriol et al., 1988). Una humedad muy baja o un exceso generará afectaciones que van desde la contaminación bacteriana del cultivo hasta una baja estabilidad en los metabolitos que se desea obtener. El pH es otro de los factores que afectan la fermentación sólida, su control suele ser complicado en este tipo de proceso y varía a lo largo del mismo por múltiples razones, ya sea por la formación de ácidos orgánicos o por el metabolismo de la fuente de nitrógeno que se utiliza, algunos investigadores han podido formular medios de cultivo cuyo pH se mantiene durante todo el proceso (Raimbault, 1998; Carrasco et al., 2003).

El pH es otra de las variables que afectan la fermentación sólida, su control suele ser complicado en este tipo de proceso y varía a lo largo del mismo por múltiples razones, ya sea por la formación de ácidos orgánicos o por el metabolismo de la fuente de nitrógeno que se utiliza, algunos investigadores han podido formular medios de

cultivo cuyo pH se mantiene durante todo el proceso (Raimbault, 1998).

La temperatura se considera la variable más crítica en los procesos de fermentación sólida y esto es debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema, lo cual favorece la acumulación del calor (Gurubel et al., 2017). El incremento en la temperatura puede afectar a la actividad microbiana, deshidratar el medio sólido o desviar el metabolismo generando compuestos indeseables (Adnan, et al., 2017). El control de la temperatura es uno de los principales retos de la fermentación sólida.

El tamaño de partícula se encuentra muy ligado a la transferencia de masa en la fermentación sólida (Liu et al., 2012), afecta tanto a nivel intrapartícula como interpartícula.

El objetivo de este trabajo es determinar las mejores condiciones de humedad, temperatura, pH y tamaño de partícula para que las cepas de *A. niger* J1 y *T. viride* M5-2 logren la mayor reducción de los factores antinutricionales en la harina de *L. mutabilis* Sweet sometida a un proceso de fermentación en estado sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Se utilizaron dos cepas de hongos con características lignocelulolíticas, *Aspergillus niger* J1 (KY486928) aislado a partir de bagazo de caña en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, CUJAE, identificada en el Instituto de Ciencia Animal (ICA) y *Trichoderma viride* M5-2 (KY977981) perteneciente al banco de cepas del Instituto de Ciencia Animal. Se conoce que estas cepas poseen actividad hidrolítica y secretan enzimas celulasas en sustratos altamente fibrosos, ambas han sido evaluadas mediante fermentación en estado sólido (Valiño et al., 2004).

Sustrato para la fermentación. El sustrato vegetal consistió en plantas de *Lupinus mutabilis* Sweet post cosecha, de la hacienda “Lupita” del cantón Riobamba de la provincia de Chimborazo. En el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se procedió a secarlo en una estufa HAFO SERIES 1600 a temperatura de 65°C por 48 horas y posteriormente se procedió a su molienda con un molino manual marca CORONA. A este sustrato se le realizó un análisis de humedad por el método gravimétrico con un resultado final de 5% y un tamaño de partícula que variaba entre 4 y 0,25 mm debido a las características del molino. Para el segundo diseño experimental se separó el sustrato acorde al tamaño de partícula, donde el código 01 se corresponde con las partículas

que se encuentran entre 0,71 y 0,25 mm y el código 02 al sustrato sin clasificación de tamaño. La composición bromatológica del sustrato se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Composición de la harina de follaje de *L. mutabilis Sweet*

Composición bromatológica de la harina de <i>L. mutabilis Sweet</i> (100 g de producto seco)	
Componente	
FND (%)	71,05
FAD (%)	53,84
Lignina (%)	13,28
Celulosa (%)	40,56
Hemicelulosa (%)	17,21
Flavonoides (mg de catequinas/100 g de MS)	55,53
Polifenoles (mg de ac. gálico/100 g de MS)	9,78

Fuente: Elaboración propia.

Proceso de fermentación.

Se utilizaron frascos de 250 mL con 10 g del sustrato seco, en un primer experimento se realizó un diseño 22 con dos variables (humedad y pH) y dos niveles para cada factor 60 y 70 % para humedad y 4 y 6 para pH, posteriormente se le enriqueció con urea 2.5%, fosfato de potasio (KH₂PO₄) 5% y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 10% (Roussos et al., 1991), estos porcentajes se calcularon sobre la base de los 10 g de sustrato seco. El sustrato húmedo fue esterilizado en autoclave por 20 min a 121°C. Para el inóculo se utilizaron soluciones de esporas, *A. niger* J1 se inoculó con 106 esporas/g de sustrato seco (Torres-León et al., 2019) y *T. viride* M5-2 se inoculó con 107 esporas/g de sustrato seco (Valiño et al., 2004). Los frascos inoculados y sus contenidos homogenizados fueron colocados en incubadora a 30°C durante 144 h. Al finalizar el tiempo se tomó el sustrato y se le realizaron los análisis respectivos para determinar cuáles fueron los mejores parámetros en virtud de la mayor reducción de los factores antinutricionales (FAD, FND, polifenoles y flavonoides) y con estos parámetros estudió un nuevo diseño 22, donde las variables fueron temperatura y diámetro de partícula y los niveles 30 y 35°C para la temperatura con *A. niger* J1 y 28 y 32°C con *T. viride* M5-2 y los diámetros de partícula fueron entre 0.71 y 0.25 mm y entre 4 y

0.25 mm. Luego fue esterilizado el medio de fermentación e inoculado del mismo modo que en el primer diseño y se fermentó durante 144 h. Al finalizar el tiempo se volvieron a realizar los análisis químicos para determinar la de los factores antinutricionales.

Análisis bromatológico. Los indicadores bromatológicos que se estudiaron fueron Fibra Neutro Detergente (FND) y Fibra Ácido Detergente (FAD), lignina (LIG) por el método ANSI/ASTM D1106-56 y celulosa (CEL) por el método ANSI/ASTM D1103-60 1977. También se analizó el contenido de polifenoles (mg de ac. gálico/100 g de sustrato seco) de acuerdo al método de folin ciocalteu (Cabrera-Carrión et al., 2017) y el contenido de flavonoides (mg de catequinas / 100 g de sustrato seco).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones y dos inóculos (*A. niger* J1 y *T. viride* M5-2). Cada frasco constituyó una unidad experimental. Para la realización de los análisis se utilizó el programa STATGRAPHICS XV CENTURION

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 2 muestra los efectos de las diferentes condiciones planificadas en el primer diseño experimental y su relación entre los diferentes factores antinutricionales manteniendo la temperatura del experimento constante (30°C) y sin hacer discriminación del tamaño de partícula. Tanto el pH como la humedad influyen en el modo en que las cepas transforman los factores antinutricionales, a pH 4 *A. niger* J1 reduce significativamente los polifenoles, los flavonoides y los FAD en comparación con el pH 6 y esta reducción es mayor cuando la humedad del sustrato se incrementa de 60 a 70%, lo mismo se observa en el caso de *T. viride* M5-2 en donde a pH 4 y humedad de 70% se obtiene los valores más bajos de los factores antinutricionales. Luego del análisis estadístico se determina que para las cepas *A. niger* J1 y *T. viride* M5-2 las condiciones de pH 4 y humedad 70% son con las que se reducen más los factores antinutricionales en comparación con las otras condiciones. Estas fueron las condiciones que se usaron en el segundo experimento, se sabe que el pH bajo favorece la producción de diferentes enzimas lo cual podría ser un factor determinante para la reducción de los factores antinutricionales estudiados (Sohail et al., 2009). Por otro lado una humedad de 70% garantiza condiciones favorables para el crecimiento de los microorganismos en el sustrato durante una fermentación sólida (Liang et al., 2020).

Tabla 2: Efecto del proceso de fermentación sobre los factores antinutricionales con el primer diseño pH 4 y 6, Humedad 60% y 70%, temperatura 30°C y sin discriminación del tamaño de partícula.

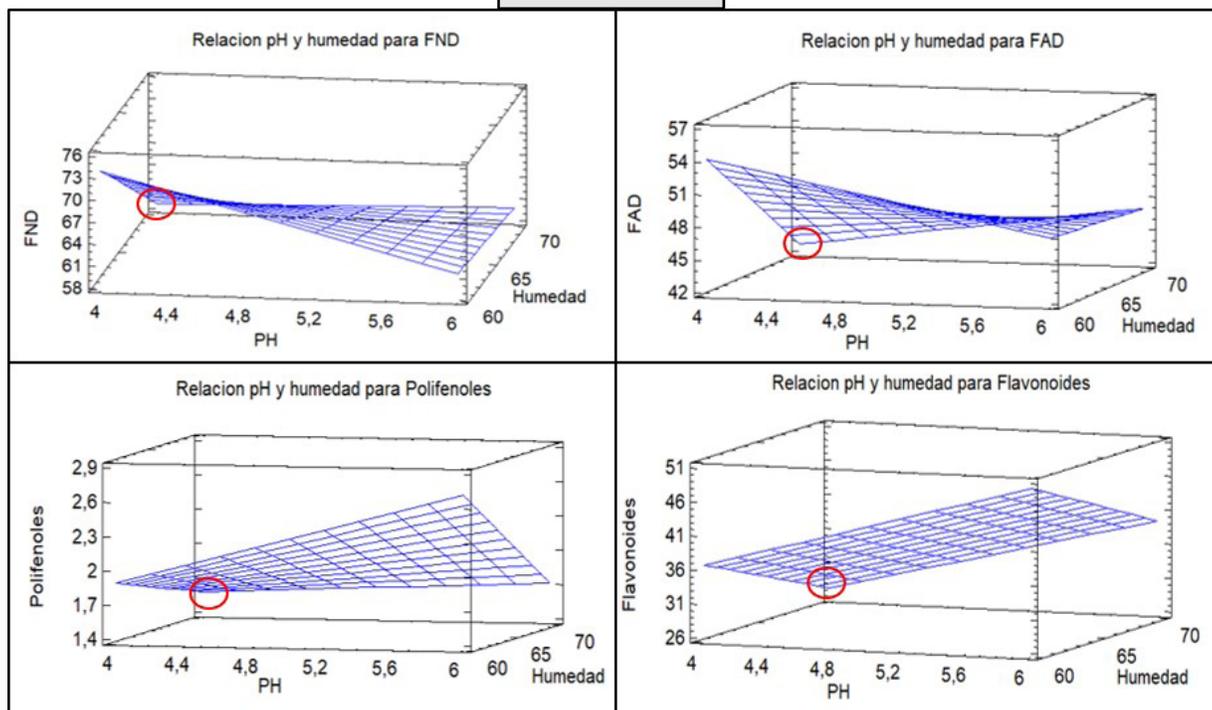
A. niger J1				
Condición	FND (g/100 g MS)	FAD (g/100 g MS)	Polifenoles (mg/100 g MS)	Flavonoides (mg/100 g MS)
pH 4 - H 60%	73,72b ±0,08	54,19c ±0,09	1,89b ±0,10	36,62b ±0,89
pH 4 - H 70%	59,01a ±0,06	42,77a ±0,08	1,58a ±0,16	27,48a ±0,63
pH 6 - H 60%	61,33a ±0,07	47,93b ±0,06	2,72c ±0,09	50,10d ±0,24
pH 6 - H 70%	60,10a ±0,08	47,03b ±0,08	1,72ab ±0,20	39,56c ±1,41
T. viride M5-2				
Condición	FND (g/100 g MS)	FAD (g/100 g MS)	Polifenoles (mg/100 g MS)	Flavonoides (mg/100 g MS)
pH 4 - H 60%	65,57d ±0,11	47,72b ±0,15	8,43b ±0,09	46,18b ±0,88
pH 4 - H 70%	58,94a ±0,11	44,18a ±0,14	8,06a ±0,08	39,85a ±0,78
pH 6 - H 60%	60,18b ±0,13	47,98b ±0,16	9,23c ±0,17	74,95d ±0,48
pH 6 - H 70%	61,94c ±0,12	48,55b ±0,15	9,03c ±0,10	57,89c ±0,63

a,b,c,d Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$, según Duncan (1955)

Para hacer la selección de los mejores parámetros que permitieran a los microorganismos utilizados la mayor reducción de los factores antinutricionales se analizaron los resultados obtenidos con el programa STATGRAPHICS XV CENTURION y se obtuvo la superficie respuesta para cada uno de los factores antinutricionales analizados (figura 1), observando que para el primer diseño con pH de 4 y 6 y humedad de 60 y 70 % se obtenían diferencias significativas entre todos los tratamientos pero las mejores reducciones de estos factores se lograban a un pH de 4 y una humedad de 70% para ambas cepas. Por lo tanto, para proceder a realizar el segundo diseño de experimento se establecen los parámetros de pH y humedad de 4 y 70% respectivamente para todas las unidades experimentales.

En la tabla 3 se observa que la temperatura y el diámetro de partícula también son variables que influyen en la reducción de los factores antinutricionales. Las temperaturas de 30°C y 28°C para *A. niger* J1 y *T. viride* M5-2 respectivamente fueron las que registraron los valores más bajos para los factores antinutricionales, mientras que al discriminar el tamaño de partícula se observa que cuando este es más pequeño se ve favorecida la reducción de los factores. Para la cepa *A. niger* J1 las condiciones que más contribuyen con la reducción de los factores antinutricionales se encuentran a 30°C y con el tamaño de partícula 01 (0,71 – 0,25 mm), mientras que para *T. viride* M5-2 estas se encontraban a 28°C y con el tamaño de partícula 01 (0,71 – 0,25 mm). Estas condiciones de temperaturas se corresponden con las óptimas de temperaturas de crecimiento de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* en condiciones experimentales (Kalsoom et al., 2019). Por otro lado, un tamaño de partícula pequeño favorece la colonización del sustrato por parte de las cepas (Fitzpatrick et al., 2010), por esta razón en el experimento ambas cepas se ven favorecidas por el tamaño de partícula más pequeño

A. niger J1



T. viride M5-2

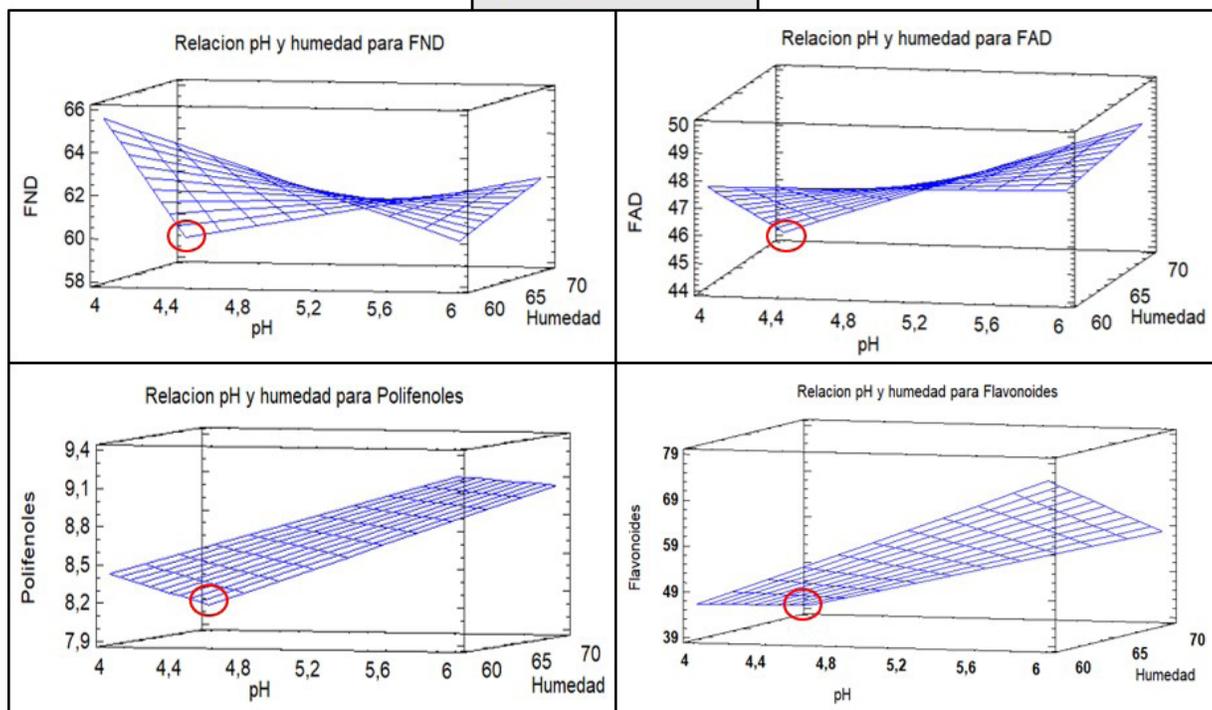


Fig. 1: Superficie respuesta del primer diseño para los factores antinutricionales temperatura 30oC sin discriminar el tamaño de partícula. Elaboración Propia

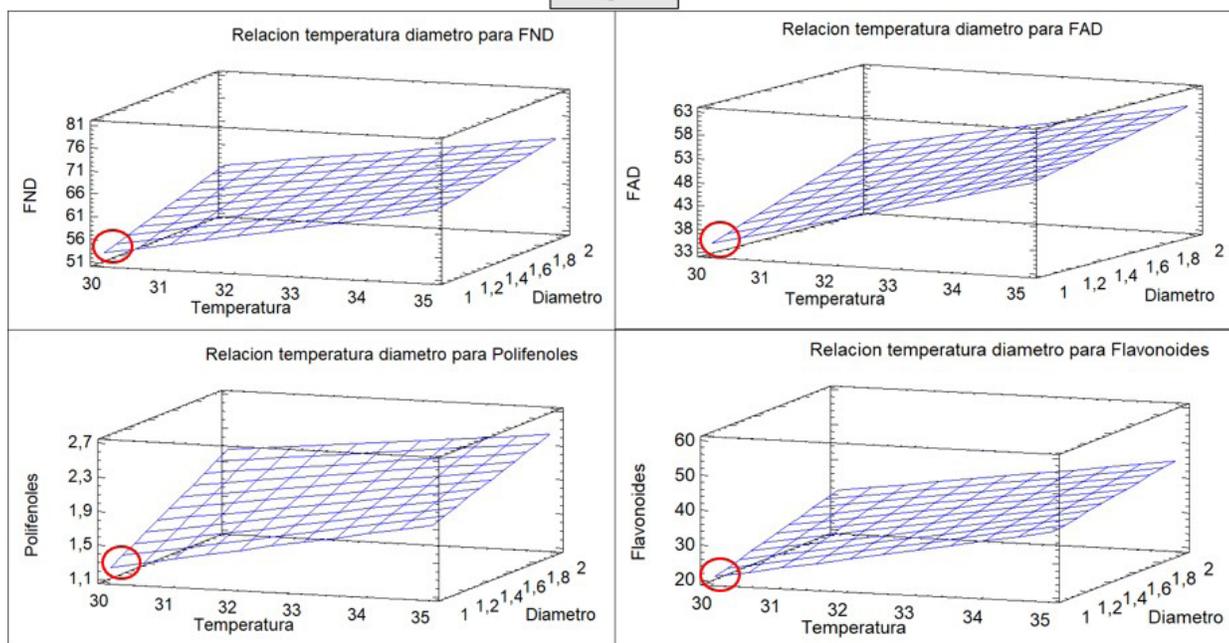
Tabla 3: Efecto del proceso de fermentación sobre los factores antinutricionales con el segundo diseño pH 4, humedad 70%, temperatura 30°C y 35°C para *A. niger* y 28°C y 32°C para *T. viride*.

A. niger J1				
Condición	FND (g/100 g MS)	FAD (g/100 g MS)	Polifenoles (mg/100 gr MS)	Flavonoides (mg/100 gr MS)
T 30°C - D 01	52,87a ±0,05	34,90a ±0,07	1,23a ±0,17	20,71a ±0,51
T 30°C - D 02	61,08b ±0,08	46,90b ±0,08	2,07b ±0,46	31,78b ±4,76
T 35°C - D 01	65,80b ±0,08	52,03b ±0,07	1,93b ±0,04	38,47bc ±0,62
T 35°C - D 02	70,90c ±0,12	60,87c ±0,02	2,44b ±0,30	45,11c ±7,79
T. viride M5-2				
Condición	FND (g/100 g MS)	FAD (g/100 g MS)	Polifenoles (mg/100 gr MS)	Flavonoides (mg/100 gr MS)
T 28°C - D 01	58,27a ±0,08	37,17a ±0,11	6,24a ±0,17	37,05a ±0,81
T 28°C - D 02	74,83b ±0,07	56,80c ±0,05	8,61c ±0,14	56,23c ±1,05
T 32°C - D 01	72,37b ±0,08	44,60b ±0,11	7,34b ±0,27	41,11b ±1,02
T 32°C - D 02	77,37b ±0,16	69,77d ±0,02	9,07d ±0,14	75,00d ±1,64

a,b,c,d Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$, según Duncan

La figura 2 muestra las superficies de respuesta del segundo diseño de experimento, se observa una relación directa entre los parámetros temperatura y tamaño de partícula (diámetro), ambos influyen significativamente y de manera positiva en los factores antinutricionales, a medida que aumentan la temperatura y el tamaño de partícula aumentan también los factores antinutricionales, el objetivo del experimento es la reducción de estos factores antinutricionales, por ende los mejores valores estarán localizados para *A. niger* J1 en 30°C y tamaño de partícula entre 0.71 y 0.25 mm y para *T. viride* M5-2 serían 28°C y tamaño de partícula entre 0.71 y 0.25 mm.

A. niger J1



T. viride M5-2

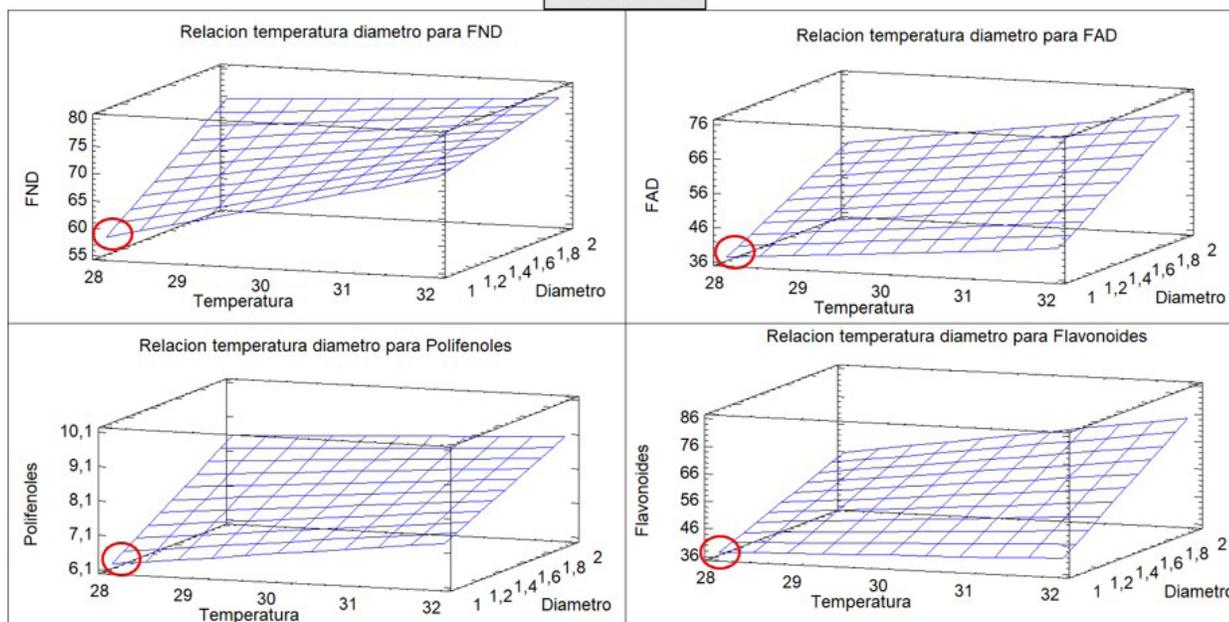


Fig. 2: Superficie respuesta del segundo diseño experimental a pH 4 y humedad 70%

La tabla 4 muestra la comparación entre los valores iniciales de la harina de follaje de *L. mutabilis* Sweet con los obtenidos de los experimentos realizados con los mejores parámetros obtenidos, que para *A. niger* J1 fueron pH 4, humedad 70%, temperatura 30°C y tamaño de partícula entre 0.71 y 0.25 mm y para *T. viride* M5-2 fue pH 4, humedad 70%, temperatura 28°C y tamaño de partícula entre 0.71 y 0.25 mm.

Tabla 4: Comparación entre los valores iniciales y los finales de los factores antinutricionales

FACTOR	INICIO	<i>A. niger</i> J1*	<i>T. viride</i> M5-2*	Valores aceptados
FND (g/100 g MS)	71,05b	52,9 ^a ±0,05	58,3 ^a ±0,08	65,01
FAD (g/100 g MS)	53,84b	34,9 ^a ±0,07	37,2 ^a ±0,11	45,01
Polifenoles (mg/100 gr)	9,78c	1,23 ^a ±0,17	6,24b ±0,17	8,02
Flavonoides (mg/100 gr)	55,53c	20,72 ^a ±0,51	37,05b ±0,81	N.D

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$, según Duncan (1955)

* Mejores condiciones del experimento para ambas cepas

¹ (Linn & Martin, 1991)

² (Siddhuraju et al., 2000)

CONCLUSIONES

Se definió que para la cepa *A. niger* J1 el tratamiento seleccionado reduce los polifenoles de 9,78 mg/100 gr hasta 1,23 mg/100 gr, lo que equivale a una reducción del 87% de los polifenoles presentes en la muestra antes de la fermentación, y en el caso de los flavonoides los reduce de 55,53 mg/100 gr hasta 20,72 mg/100 gr lo que equivale a una reducción del 62,6%, en comparación con la cepa *T. viride* M5-2 que con el mejor tratamiento reduce solo el 36% de los polifenoles y el 33,3 % de los flavonoides.

Por otro lado, los valores de reducción de FND y FAD no muestran diferencias entre ambas cepas al finalizar el experimento

La cepa *A. niger* con los parámetros establecidos como mejores logra la mayor reducción de los factores antinutricionales, mejorando el valor nutritivo de la harina de follaje de *L. mutabilis* Sweet, se recomienda realizar un escalado del proceso para verificar los datos obtenidos.

Se concluye que si es posible reducir los factores antinutricionales de la harina integral de *Lupinus mutabilis* Sweet, es factible realizar un proceso de fermentación en estado sólido rústico, controlando parámetros de manera sencilla, lo cual puede ser realizado en las mismas fincas en donde se cosecha el grano, logrando así utilizar un producto que era desechado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adnan, M., Ashraf, S. A., Khan, S., & Alshammari, E. (2017). Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 617–621.

Cabrera-Carrión, J. L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P. A., & Rojas de Astudillo, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53–60.

Carrasco, T., Valiño, E., Ibarra, A., García Hernández, Y., & Pérez Pérez, T. (2003). Negative effect of humidity on solid state fermentation of sugar cane bagasse. In *Cuban Journal of Agricultural Science* (Vol. 37).

Fitzpatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M. F., & Whitney, R. A. (2010). Bioresource Technology A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101(23), 8915–8922.

Gurubel, K., Sanchez, A., & Coronado-Mendoza, A. (2017). A Comparative Study of Temperature Optimal Control in a Solid State Fermentation Process for Edible Mushroom Growing. *Chemical and Biochemical Engineering Uartely*, 31(1), 101–114.

Kalsoom, R., Ahmed, S., Nadeem, M., Chohan, S., & Abid, M. (2019). Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 921–928.

Li, P., Lin, W., Liu, X., Wang, X., & Luo, L. (2016). Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of chinese daqu starter. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–12.

- Liang, C. H., Wu, C. Y., Ho, W. J., & Liang, Z. C. (2020). Influences of carbon and nitrogen source addition, water content, and initial pH of grain medium on hispidin production of *Phellinus linteus* by solid-state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *130*(6), 616–621.
- Linn, J. G., & Martin, N. P. (1991). Forage Quality Analyses and Interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *7*(2), 509–523.
- Liu, Y., Hua, Z., YiFan, Z., FeiYun, Y., JinLong, Y., & LiZhi, F. (2012). Influence of wheat bran particle size for spore production from *Bacillus coagulans* by solid state fermentation. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *11*(24), 4615–4616.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., & Viniegra-gonzales, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied and Microbiology Biotechnology*, *27*, 498–503.
- Quintanilla-Medina, J., Joaquín-Cancino, S., Martínez-González, J., Limas-Martínez, A., López-Aguirre, D., Estrada-Drouaillet, B., & Hernández-Meléndez, J. (2018). Usos de *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae) en la alimentación de rumiantes. *AGROProductividad*, *11*(2).
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, *1*(3), 26–27.
- Roussos, S., Olmos, A., Raimbault, M., Saucedo-Castañeda, G., & Lonsane, B. K. (1991). Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*, *5*(6), 415–420.
- Savón, L., Gutiérrez, O., Ojeda, F., & Scull, I. (2005). Harinas de follajes tropicales: una alternativa potencial para la alimentación de especies. *Pastos y Forrajes*, *28*(1).
- Siddhuraju, P., Becker, K., & Makkar, H. P. S. (2000). *Studies on the Nutritional Composition and Antinutritional Factors of Three Different Germplasm Seed Materials of an Under-Utilized Tropical Legume, Mucuna pruriens Var. Utilis*. 6048–6060.
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, *25*(6), 437–441.
- Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *LWT*, *112*, 108236.
- Valiño, E., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T., & Albelo, N. (2004). Improvement of sugarcane bagasse composition by the strain *Trichoderma viride* M5-2 in a solid-state fermentation bioreactor. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *38*(2), 143–150.
- Valiño, E., Savón, L., Elías, A., & Rodríguez, M. (2015). Mejora del valor nutritivo de las leguminosas temporales *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium niveum*, *Lablab purpureus* mediante el procesamiento de sus granos con *Trichoderma viride* M5-2. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, *49*(1), 81–89.