



Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana

RAPPORT DE SYNTHÈSE

Informe Sintetico

Contrat CEE - DG XII

(1985-1988)

Programme STD1 n°: 418-Fr

106-Mex

**Valorisation des Produits
Agricoles Tropicaux par
Fermentation en Milieu Solide**

***Valorización de los Productos Agrícolas Tropicales
por Fermentación en Medio Sólidos***

Maurice RAIMBAULT

Gustavo VINIEGRA GONZALEZ

41200074862

2 ep FPI

Nor Num

20 JUL. 1985

84
FERLEN
RAI



F 30.767

INFORME SINTETICO FINAL

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

1.1 *Nombre del proyecto:* VALORIZACION DE LOS PRODUCTOS AGRICOLAS TROPICALES POR FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

1.2 *Clave del Proyecto:* TSD-A-106-MEX-(B) y TSD-A-418-Fr

1.3 *Coordinador del proyecto:* Maurice RAIMBAULT
Gustavo VINIEGRA GONZALEZ

1.4 *Instituciones ejecutoras:*

a) Universidad Autonoma Metropolitana - Iztapalapa

Departamento de Biotechnologia

A.P. 55-535

09340 MEXICO D.F. (Mexico)

Tel. 686.03.22 (331; 338)

TELEX: 1764296 UAMME

b) Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

213, rue La Fayette

75480 PARIS Cedex 10

Tel.: 48-03-77-77

TELEX: ORST MPL 485 507 F

RAPPORT DE SYNTHESE FINAL

1. CARACTERISTIQUES GENERALES DU PROJET

1.1 Titre du Projet : VALORISATION DES PRODUITS AGRICOLES TROPICAUX PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE.

1.2 Références du Projet: TSD-A-106-MEX
TSD-A-418-Fr

1.3 Coordinateur Général du Projet: Maurice RAIMBAULT
Gustavo VINIEGRA GONZALEZ

1.4 Institutions Contractantes:

a) Université Autonome Métropolitaine - Iztapalapa
Département de Biotechnologie
A.P. 55-535
09340 MEXICO D.F. (Mexique)
Tel. 686.03.22 (331; 338)
TELEX: 1764296 UAMME

b) Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM)
213, rue La Fayette
75480 PARIS Cedex 10
Tel.: 48-03-77-77
TELEX: ORST MPL 485 507

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL PROYECTO

2.1 Realizar un estudio completo y comparativo de la aplicación de las fermentaciones en medio solido a diferentes tipos de sustratos tropicales susceptibles de utilizarse en la alimentación de ganado.

2.2 Producir los resultados y la información necesaria para realizar una evaluación tecnológica nutricional y económica de la aplicación de las fermentaciones en medio sólido para la producción de nuevos forrajes tropicales.

2.3 Realizar las investigaciones básicas concernientes a la fisiología, cinética y la ingeniería del crecimiento de hongos filamentosos y de bacterias lácticas cultivadas sobre sustratos sólidos.

2.4 Aplicar los resultados de la revaluación de sustratos sólidos de diferentes categorías (amiláceos, celulósicos, desechos agroindustriales) para la producción de alimentos ganaderos.

2.5 Construir una colección de cepas de hongos filamentosos y de bacterias lácticas que tengan potencial aplicación a las FMS del sector agroalimentario en México, América Central y el Caribe.

2.6 Promover las FMS para favorecer el desarrollo de la ganadería y disminuir importaciones en los países de la región.

2.7 Iniciar una serie de demostraciones piloto sobre la utilización de estas tecnologías.

2.8 Formar en México un grupo de científicos especializados en la FMS del tipo agroalimentario, los cuales servirían de interlocutores con grupos científicos europeos y ayudarían a formar investigadores y técnicos de México y América Latina, en relación a estas nuevas tecnologías.

2.9 Crear una red de científicos, Ingenieros e Industriales interesados en aplicar las FMS en la región y que favorezca el intercambio técnico con Europa.

2.10 Organizar seminarios anuales que permitan reunir la información producida en la región sobre el tema de referencia, para eventualmente publicar los resultados.

2. OBJECTIFS SPECIFIQUES DU PROJET

2.1 Réaliser une étude complète et comparative de l'application des fermentations en milieu solide à plusieurs types de substrats tropicaux susceptibles être utilisés dans l'alimentation du bétail.

2.2 Produire les résultats et l'information nécessaire pour réaliser une évaluation technologique, nutritionnelle et économique de l'application des fermentations en milieu solide pour la production de nouveaux fourrages tropicaux.

2.3 Réaliser les recherches basiques concernant la physiologie, la cinétique et l'ingénierie de la croissance des champignons filamenteux et des bactéries lactiques cultivées sur des substrats solides.

2.4 Appliquer les résultats de l'amélioration des substrats solides de différentes catégories (amylacés, cellulosiques, déchets agro-industriels) pour la production d'aliments du bétail.

2.5 Constituer une collection de souches de champignons filamenteux et de bactéries lactiques ayant un potentiel d'application dans le domaine de la FMS de substrats agro-alimentaires au Mexique, en Amérique Centrale et dans les Caraïbes.

2.6 Promouvoir la FMS pour favoriser le développement de l'élevage et diminuer les importations dans les pays de ces régions.

2.7 Initier une série de démonstrations pilotes sur l'utilisation de ces technologies.

2.8 Former au Mexique un groupe de scientifiques spécialisés dans la FMS de type agro-alimentaire, lesquels pourront servir d'interlocuteurs à des groupes de scientifiques européens et participeront à la formation de chercheurs et de techniciens au Mexique et en Amérique Latine, en relation avec le développement de ces nouvelles technologies.

2.9 Créer un réseau de scientifiques, d'ingénieurs et d'industriels intéressés par l'application des FMS dans la région et qui favorise les échanges techniques avec l'Europe.

2.10 Organiser des séminaires annuels qui permettent de réunir l'information produite dans la région sur le thème en référence, de comparer l'expérience acquise avec les autres groupes travaillant sur le thème dans les autres régions, et la publication des informations réunies.

3. ACTIVIDADES A REALIZAR

3.1 Investigación

Los estudios programados están relacionados con la revaluación de tres tipos de sustratos tropicales, cada uno con un objetivo alimentario específico:

- a. Enriquecimiento proteínico de un sustrato amiláceo por elevación de la concentración de proteínas microbianas. Se utiliza como materia prima a la yuca (*Manihot esculenta*).
- b. Mejoramiento de la digestibilidad y del valor forrajero de un producto lignocelulósico por medio de la FMS con un moho celulolítico y del ensilaje subsecuente del producto. Se utiliza como materia prima la paja de sorgo o el bagazo de caña.
- c. Detoxificación de un residuo agroindustrial. Se utiliza como materia prima la pulpa del café.

3.2 Formación de recursos humanos

- a. Capacitación de por lo menos cinco estudiantes de maestría (DEA) o doctorado en el tema de las FMS.
- b. Capacitación de becarios de América Central en los laboratorios de la UAM I.
- c. Organización de seminarios para investigadores y estudiantes avanzados interesados en las FMS.

3.3 Divulgación

- a. Organización de un simposio internacional sobre las FMS.
- b. Edición de memorias, artículos y otros documentos de divulgación.

3. ACTIVITES A REALISER

3.1 Recherches

Les études programmées sont en relation avec la valorisation de trois types de substrats agricoles tropicaux, chacun ayant un objectif alimentaire spécifique:

- a). Enrichissement en protéines d'un substrat amylacé grâce à l'élévation de la teneur en protéines microbiennes. Le manioc a été utilisé comme matière première (*Manihot esculenta*).
- b). Amélioration de la digestibilité et de la valeur fourragère d'un produit lignocellulosique par fermentation en milieu solide avec un champignon cellulolytique suivie d'un ensilage du produit fermenté. La paille de sorgho et la bagasse de canne à sucre ont été utilisées dans ce cas.
- c). Détoxification d'un résidu agro-industriel par FMS, en utilisant comme exemple la pulpe de café.

3.2 Activités de Formation

- a) Spécialisation d'au moins cinq étudiants du niveau de maîtrise, DEA ou de Doctorat sur le thème de la Fermentation en Milieu Solide.
- b) Spécialisation de plusieurs boursiers d'Amérique Centrale dans les laboratoires de la UAM Mexico.
- c) Organisation de plusieurs séminaires pour les chercheurs et les étudiants spécialisés dans ce domaine.

3.3 Diffusion et Publications

- a) Organisation d'un Séminaire International sur le thème de la FMS à l'ORSTOM de Montpellier les 25-27 juillet 1988.
- b) Edition d'un livre sur les mémoires de ce séminaire. Publication d'articles scientifiques (voir liste annexe) ainsi que d'autres documents de vulgarisation.

4. RESUMEN DE RESULTADOS DE INVESTIGACION POR ETAPAS

1a. Etapa (Noviembre 1984 a Agosto 1986)

1. Es posible enriquecer en proteínas la harina de yuca desde un 2.5% hasta un 18%, con un 20 a 30% de carbohidratos digeribles, mediante la utilización de la técnica de cultivos de mohos en medio sólido, con un mínimo de consumo energético.
2. Se puede aplicar el procedimiento de cultivo en medio sólido a otros tipos de sustratos agrícolas tropicales, con el fin de mejorar su calidad nutritiva y su digestibilidad y aumentar así los recursos forrajeros tropicales.
3. También es igualmente posible conservar los productos fermentados, ya sea en forma seca o húmeda, mediante una fermentación sólida secundaria de tipo anaerobio productora de ácido láctico.
4. En relación a la cooperación internacional, entre el ORSTOM y la UAM para realizar estos estudios en México, se ha avanzado en la formación de un grupo mexicano especializado en el campo de la Biotecnología orientada a las fermentaciones sólidas de uso agro alimentario.
5. Se ha identificado la necesidad de encontrar tecnologías alternativas para disminuir la dependencia alimentaria de los países latino americanos.
6. Se ha identificado la existencia de una red de instituciones mexicanas, centro americanas y europeas que permitirán la transferencia de la tecnología hacia el sector productivo.
7. Se cuenta con una red de instituciones nacionales para desarrollar en colaboración, los estudios nutricionales y económicos, concernientes a las diferentes posibilidades de aplicación de las fermentaciones en medio sólido para la producción de nuevos tipos de forrajes tropicales.

2a. Etapa (julio a diciembre de 1986)

1. Para el enriquecimiento proteínico de harina de yuca (*Manihot esculenta*) utilizando hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, por la técnica de fermentación en medio sólido (FMS), se realizaron estudios a nivel de planta piloto (10-25 kg base seca), incluyendo la instalación y puesta en marcha de fermentadores prototipo, el modelado matemático, las estrategias de control y los manuales de operación, así como la evaluación nutricional de muestras del producto final.

4. RESUME DES RESULTATS DES RECHERCHES PAR ETAPES

1° étape: Novembre 1984- Août 1986

1. Il est possible d'enrichir en protéines la farine de manioc depuis 2,5% jusqu'à 18%, alors qu'il reste encore 20 à 30 % de sucres digestibles, en utilisant la technique de culture de champignons filamenteux en milieu solide, tout en minimisant la consommation d'énergie.
2. On peut appliquer le procédé de culture en milieu solide à d'autres types de substrats agricoles tropicaux, dans le but d'améliorer la qualité nutritive et la digestibilité, et d'augmenter ainsi la disponibilité de fourrages tropicaux.
3. Il est également possible de conserver les produits fermentés, qu'ils soient sous forme sèche ou humide, au moyen d'une fermentation solide secondaire de type anaérobie produisant de l'acide lactique.
4. En ce qui concerne la coopération internationale, entre l'ORSTOM et la UAM pour la réalisation de ces études au Mexique, on a commencé la constitution d'un groupe mexicain spécialisé dans le domaine de la Biotechnologie orientée à la fermentation en milieu solide dans le domaine agro-alimentaire.
5. On a identifié la nécessité de développer des technologies alternatives pour diminuer la dépendance alimentaire des pays latino américains.
6. On a identifié l'existence d'un réseau d'institutions mexicaines, centro-américaines et européennes qui permettront le transfert de la technologie vers le secteur productif.
7. On compte sur un réseau d'institutions nationales pour développer en collaboration les études nutritionnelles et économiques, concernant les différentes possibilités d'application des fermentations en milieu solide pour la production de nouveaux types de fourrages tropicaux.

2° étape: Juillet- Décembre 1986

1. Pour enrichissement en protéines de la farine de manioc (*Manihot esculenta*) utilisant les champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, par la technique de fermentation en milieu solide (FMS), les études furent développées au niveau pilote (10-25 Kg de matière sèche), en incluant l'installation et la mise en marche de prototypes de fermenteurs, la modélisation mathématique et les stratégies de contrôle et les manuels d'opération et des évaluations nutritionnelles des échantillons du produit final.
2. En ce qui concerne l'amélioration de la digestibilité des fibres par FMS, on a étudié l'utilisation de supports fibreux tels que la bagasse

2. Con respecto al mejoramiento de la digestibilidad de fibras por FMS; se estudió la utilización de soportes fibrosos tales como el bagazo y la caña de azúcar, incluyendo la producción de enzimas hidrolíticas: celulasas y pectinasas. También se realizó un estudio sobre el ensilaje de los residuos fibrosos después de extraer las enzimas del bagazo de caña que indicó buenos rendimientos de ácido láctico y bajos rendimientos de alcohol y ácidos grasos volátiles, a diferencia del ensilaje de la caña de azúcar que espontáneamente produce mucho alcohol y poco ácido láctico.

3. Sobre detoxificación de la pulpa del café por FMS, se trabajó en el aislamiento de cepas capaces de degradar cafeína, su caracterización fisiológica y bioquímica.

3a. Etapa (enero 1987 a febrero de 1988)

1. Se concluyeron los estudios de enriquecimiento proteínico de la yuca (*Manihot esculenta*) utilizando *Aspergillus niger*, por la técnica de FMS. A nivel de planta piloto (10-20 kg base seca), se desarrollaron los principales elementos para el escalamiento y modelado matemático de los fenómenos de transferencia de calor durante la FMS, las técnicas para la producción piloto de esporas de hongos filamentosos y la elaboración de los manuales de operación del proceso global. Se continuaron los trabajos de cooperación internacional con el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) para el enriquecimiento de puntas de caña de azúcar con *Aspergillus terreus* y la producción masiva de las esporas de este microorganismo.

2. Se concluyeron los estudios de ensilaje de la yuca. Se demostró el efecto benéfico de la inoculación con *Lactobacillus casei* añadido en una suspensión líquida en cantidades inferiores al 5% que reorientaba la fermentación hacia ácido láctico con bajos rendimientos de alcohol y ácidos grasos volátiles. El ensilaje de yuca enriquecida por *A.niger* dió lugar a la disminución de ácidos nucleicos del material. Se llevaron a cabo estudios sobre el escalamiento del proceso y se demostró que la fermentación láctica per se no producía sobrecalentamiento apreciable del material.

3. Se concluyeron los trabajos de la revaluación y mejoramiento de la digestibilidad de fibras por FMS y se continuaron los estudios para la utilización de soportes fibrosos tales como el bagazo y la caña de azúcar, para la producción de enzimas con actividad pectinolítica, y para la producción de metabolitos secundarios como la penicilina.

et la canne à sucre, y compris pour la synthèse d'enzymes hydrolytiques (cellulases et pectinases). On a réalisé également une étude sur l'ensilage des résidus fibreux après avoir extrait les enzymes de la bagasse fermentée. On a ainsi obtenu de bons rendements en acide lactique et de faibles rendements en alcool et acides gras volatils, à la différence des ensilages de la canne à sucre qui produit spontanément beaucoup d'alcool et peu d'acide lactique.

3. Sur la détoxification de la pulpe de café par FMS, on a travaillé à l'isolement de souches capables de dégrader la caféine, leur caractérisation physiologique et biochimique.

3° étape: Janvier 1987- Février 1988

1. On a terminé les études d'enrichissement en protéines du manioc en utilisant *Aspergillus niger* par la technique de FMS. Au niveau pilote (10-20 Kg de matière sèche) on a établi les principaux éléments pour l'extrapolation à une échelle supérieure, et la modélisation mathématique des phénomènes de transfert de chaleur au cours de la FMS. On a également expérimenté les techniques de production de spores de moisissures au niveau pilote, et la réalisation d'un manuel d'opération du procédé global.

On a poursuivi les travaux de coopération internationale avec la participation de l'Institut Cubain des Recherches sur les Dérivés de la Canne à Sucre (ICIDCA) pour l'enrichissement en protéines des résidus de canne avec *Aspergillus terreus* et la production massive de spores de ce microorganisme.

2. On a terminé les études sur l'ensilage du manioc. On a démontré l'effet bénéfique de l'inoculation avec *Lactobacillus casei* ajouté dans une suspension liquide en quantités inférieures à 5% permettant d'orienter la fermentation vers la production d'acide lactique avec des faibles rendements en alcool et en acides gras volatils. L'ensilage de manioc enrichi en protéines par *A. niger* conduit à la diminution du contenu en acides nucléiques totaux. On a réalisé les études sur l'extrapolation du procédé et on a démontré que la fermentation lactique en elle-même ne produisait pas d'échauffement important du matériel.

3. On a conclu les travaux de valorisation et d'amélioration de la digestibilité des fibres par FMS, et on a poursuivi les études pour l'utilisation des supports fibreux tels que la bagasse et la canne à sucre, pour la production d'enzymes ayant une activité pectinolytique, et pour la production de métabolites secondaires comme la pénicilline.

4. En ce qui concerne la détoxification de la pulpe de café par FMS, on a poursuivi les travaux d'isolement des souches capables de dégrader la caféine et leur caractérisation physiologique et biochimique.

4. Con respecto a la detoxificación de la pulpa de café por FMS. Se continuaron los trabajos de aislamiento de cepas capaces de degradar cafeína y su caracterización fisiológica y bioquímica.

4a. Etapa (marzo a agosto de 1988)

Se continuaron los estudios sobre la detoxificación microbiana de la pulpa del café. En esta línea se ha cubierto un 50 % del plan de trabajo. Para esta etapa, los objetivos originales planteados fueron los siguientes:

1. Estudios exploratorios de la producción de café en México.
2. Estudios de aislamiento de cepas capaces de degradar cafeína. Su caracterización bioquímica y fisiológica.
3. Estudios de crecimiento de los microorganismos aislados, a nivel de laboratorio, en pequeñas columnas con las técnicas de fermentación sólida. Determinación de las condiciones de operación idóneas.
4. Estudios preliminares para la evaluación *in vitro* del efecto "probiótico" de la pulpa fermentada con *Penicillium* sp.
5. Estudios de escalamiento a nivel planta piloto. Balances de materia y energía. Factibilidad económica del proceso de detoxificación de pulpa de café.

Los principales resultados obtenidos a la fecha son:

- Aislamiento de 300 cepas de mohos contaminantes de la pulpa de café en beneficios de café en grano con características morfológicas de mohos saprofitos de rápido crecimiento sobre glucosa y cafeína.
- Caracterización de las 10 mejores cepas, resistentes a altas dosis de cafeína. Su capacidad de degradación de cafeína (cerca del 100 %) supera con mucho a los resultados esperados.
- Demostración inequívoca de la actividad degradadora de las mejores cepas seleccionadas, incluyendo un *Penicillium* sp. usando cultivos en matraces agitados (medio líquido) y en columnas aereadas (medio sólido), utilizando la cromatografía de líquidos de alta presión como técnica analítica de la cafeína.
- Demostración experimental del efecto "probiótico" de la pulpa fermentada, adicionada en proporción de 1 a 3% a distintos materiales para alimentación de rumiantes (forrajes, proteínas y grasas)
- Promoción del uso potencial de esta tecnología en México y en el Caribe, mediante entrevistas y seminarios con industriales, técnicos y funcionarios relacionados con la agroindustria cafetalera. Se han obtenido demostraciones de interés de una empresa farmacéutica y de un cafeticultor mexicanos y de grupos de cafeticultores que colaboran con la Corporación Andina de Fomento, principalmente de Colombia.

4° étape: Mars 1988 - Août 1988

On a poursuivi les études sur la détoxification microbienne de la pulpe de café par FMS. Dans ce domaine on a pu couvrir 50% du plan de travail. Pour cette étape, les objectifs initiaux prévus furent les suivants:

1. Etudes exploratoires de la production de café dans le contexte mexicain.
2. Etudes de l'isolement des souches capables de dégrader la caféine, leur caractérisation physiologique et biochimique.
3. Etudes sur la croissance des moisissures isolées au niveau laboratoire, en milieu liquide et dans des colonnes par la technique de FMS. Détermination des conditions d'opérations adéquates.
4. Etudes préliminaires pour l'évaluation *in vitro* de l'effet probiotique de la pulpe de café fermentée avec une souche de *Penicillium*.
5. Etudes de l'extrapolation au niveau pilote. Bilans de matière et d'énergie. Faisabilité économique du procédé de détoxification de la pulpe de café.

Les principaux résultats obtenus actuellement sont les suivants:

- Isolement de 300 souches de moisissures à partir de pulpes de café naturellement contaminées dans les usines de traitement du café en grains, ayant des caractéristiques morphologiques de moisissures saprophytes ayant une croissance rapide sur glucose et caféine.
- Caractérisation des 10 meilleures souches, résistantes à des fortes concentrations de caféine. Leur capacité à dégrader la caféine (près de 100%) dépassant largement ce que nous avions espéré.
- Démonstration sans équivoque des activités de dégradation des meilleures souches sélectionnées, incluant une souche de *Penicillium* sp., par la méthode de culture en flacons agités (milieu liquide) et en colonnes aérées (fermentation solide) et en utilisant la chromatographie liquide haute pression (HPLC) comme technique analytique de la caféine.
- Démonstration expérimentale de l'effet "probiotique" de la pulpe fermentée ajoutée en proportion de 1 à 3 % à différents substrats pour l'alimentation des ruminants (fourrages, protéines et graisses).
- Promotion de l'utilisation potentielle de cette technologie au Mexique et dans la zone Caraïbes, au moyen d'entrevues et de séminaires avec des industriels, des techniciens et des fonctionnaires impliqués dans l'agro-industrie de café. On a obtenu des démonstrations d'intérêt d'une entreprise pharmaceutique, d'un industriel du café mexicain et de groupements de cultivateurs de café qui ont réalisé des coopérations avec la Corporation Andine de Développement, principalement en Colombie.

RESULTADOS PRINCIPALES

A continuación se detallan los resultados técnicos mas relevantes en cada una de las líneas de trabajo mencionadas antes :

5. ENRIQUECIMIENTO PROTEINICO DE LA YUCA.

5.1 Principales logros.

En los tres informes técnicos anteriores, se presentaron los resultados más relevantes de esta línea de trabajo, en donde se mencionan los logros en el escalamiento a planta piloto de los procedimientos del laboratorio, los cuales incluyen:

- Producción de esporas
- Pretratamiento térmico de los sustratos para la FMS
- Los modelos matemáticos desarrollados que responden a las cinéticas experimentales.
- Su solución numérica y la evaluación de parámetros.
- La validación de los modelos para el escalamiento y el control de los fermentadores.
- La instalación y puesta en marcha de tres fermentadores.
- La evaluación la producción de proteínas utilizando *A. niger* con rendimientos muy similares a los obtenidos en el laboratorio.
- El ensilaje de la yuca fresca, como materia prima, y de la yuca fermentada, como producto terminado, mostró ser una técnica adecuada para conservar esas materias sin necesidad de secado.
- Identificación de la necesidad de mejorar las estrategias de control del proceso, mediante el uso de sistemas computarizados para la obtención de información "en línea".

5.2 Explicación de los Resultados

5.2.1 Estudios de laboratorio

Se instalaron pequeños reactores de columna de 10 g de material por fermentar, repitiendo las técnicas y métodos de FMS desarrolladas antes por Raimbault, (1980). Los rendimientos, en el incremento neto del contenido de proteínas, fueron de 14 a 16 puntos porcentuales. Se demostró que la yuca ensilada y cocida al vapor parecía tener mejores rendimientos que la yuca fresca cocida sin ensilarse. Estos resultados se extrapolaron a nivel de planta piloto.

PRINCIPAUX RESULTATS

On détaille dans ce qui suit les résultats techniques les plus importants dans chacun des domaines de travail mentionnés précédemment.

5. ENRICHISSEMENT PROTEIQUE DU MANIOC

5.1 Principaux résultats:

Dans les trois rapports techniques précédents, on a présenté les résultats les plus marquants de cette ligne de travail, dans lesquelles on mentionnait les études d'extrapolation au niveau pilote des procédés de laboratoire:

- Production de spores
- Prétraitement thermique des substrats pour la FMS
- Modélisation mathématique avec ajustement aux cinétiques expérimentales
- Solution numérique des modèles et calcul des paramètres
- Validation des modèles pour l'extrapolation et le contrôle des fermenteurs.
- Installation et mise en marche de trois type de fermenteurs pour FMS
- Evaluation des productions de protéines en utilisant *Aspergillus niger*, avec des rendements très similaires à ceux obtenus au niveau du laboratoire.
- Ensilage du manioc frais, comme matière première, et du manioc fermenté, comme produit fini. Ceci a montré qu'il s'agit d'une méthode adéquate pour conserver ces matériels sans la nécessité de séchage immédiat.
- Identification de la nécessité d'améliorer les stratégies de contrôle du procédé, au moyen de l'utilisation de systèmes informatisés pour l'obtention d'information "en ligne".

5.2 Explication des résultats.

5.2.1 Etudes de Laboratoire

On a installé des petits réacteurs en colonne de 10 g de matériel à fermenter, reproduisant la technique et la méthode de FMS développée précédemment par RAIMBAULT (1980). Les rendements d'accroissement du contenu protéique net furent de 14 à 16 points en pourcentage. On a démontré que le manioc ensilé et cuit à la vapeur semblait produire des rendements supérieurs que le manioc frais et cuit sans être ensilé. Ces résultats on été extrapolés au niveau pilote.

5.2.2 Estudios en planta piloto.

Se instalaron y pusieron en marcha tres fermentadores piloto para la FMS de diferentes sustratos:

- Uno del tipo estático, previamente diseñado y patentado por Prebois y Roussos y reproducido en México con excelentes resultados.
- El segundo fué una adaptación de una amasadora de panificación con fondo perforado y agitación.
- El tercer equipo fue adquirido en Francia del Institut de la Recherche Chimique Appliquée (IRCHA). Es del tipo dinámico y consiste en una olla del tipo amasadora de harina con un doble fondo y perforaciones para aereación. Tiene dos motores, uno para el brazo de agitación y otro para la rotación independiente de la olla, en ambos casos la velocidad es variable, dispone de un equipo de control automático y una serie de periféricos. En el informe correspondiente se presentó una descripción detallada del equipo, así como un manual de operación y mantenimiento elaborado por los Ingenieros Rúa López Ulibarri y Gilles Bacquet (Universidad Técnica de Compiègne), este último durante su estancia en la UAM I en calidad de cooperante del Gobierno francés. La utilización de este equipo permitió adaptar un sistema de captura de datos "en línea" que consistió en la elaboración de un programa en BASIC para las tarjetas e interfases correspondientes con una microcomputadora Apple IIe, de uso exclusivo en este fermentador y transforma las señales analógicas en digitales, las almacena y presenta la información en forma gráfica en tiempo real.

5.2.3 Producción de esporas.

Para realizar los estudios a nivel piloto se requirieron grandes cantidades de esporas (aprox. 400,000 millones de esporas por fermentador) para fermentar a la masa de sustrato por los diferentes hongos filamentosos. Por lo que fué necesario desarrollar técnicas especiales para la producción masiva de los inóculos.

Las técnicas que se estudiaron incluyeron:

- Un reactor de discos rotatorios y
- Un reactor del tipo de columna empacada con un soporte celulósico.

En el primer caso, se obtuvieron hasta 35,000 millones de esporas por gramo de sustrato, mientras que en el segundo caso 11,000 millones de esporas por gramo. Este último método resultó sencillo y fácilmente escalable a cualquier nivel de producción, empleando reactores muy similares a los descritos antes para el enriquecimiento proteínico. Se logró demostrar que es factible producir en un reactor piloto con solamente 10 kg de bagazo de caña, el suficiente número de esporas como para inocular cerca de 5,000 kg de sustrato fresco en solo 7 y 9 días de operación para *A. niger* y *T. harzianum*

5.2.2 Etudes au niveau pilote

On a installé et mis en fonctionnement trois fermenteurs pilote pour FMS sur différents types de substrats:

- Un de type statique, précédemment développé et breveté par Prébois *et col.* et reproduit au Mexique avec d'excellents résultats.
- Le second fut une adaptation d'un pétrin de boulangerie avec un fond perforé et agitation.
- Le troisième équipement fut acquis de France par l'IRCHA. Il est de type dynamique et consiste en une cuve de mélangeur de farine avec un double fond et des perforations pour l'aération. Il est équipé de deux moteurs: un pour le bras d'agitation, l'autre pour la rotation indépendante de la cuve; dans tous les cas, la vitesse est variable, et on dispose d'un équipement de contrôle automatique et d'une série de capteurs périphériques.

Dans le rapport correspondant, on a présenté une description détaillée de l'équipement, ainsi que du manuel d'opération et de maintenance qui a été élaboré par les ingénieurs Rual Lopez de la UAM et Gilles Bacquet de l'UTC Compiègne (lors de son séjour en qualité de coopérant français). L'utilisation de cet équipement a permis d'adapter un système de prise de données "en ligne" qui consiste dans l'élaboration d'un programme écrit dans le langage BASIC pour les cartes d'interface correspondantes avec un micro-ordinateur APPLE II, développé exclusivement pour ce fermenteur et qui transforme le signal analogique en signal digital, conserve les données et présente les informations sous forme graphique en temps réel.

5.2.3 Production de spores

Pour réaliser les études au niveau pilote, on avait besoin de grandes quantités de spores (environ 400.000 Millions de spores par fermenteurs) pour inoculer la masse de substrat par différentes moisissures. Pour cela, il fut nécessaire de développer des techniques spéciales pour la production massive d'inoculum de spores.

Les techniques qui furent étudiées concernent:

- un réacteur à disques rotatifs
- un réacteur de type colonnes remplies d'un support cellulosique.

Dans le premier cas, on a obtenu jusqu'à 35.000 millions de spores par gramme de substrat, tandis que dans le second cas 11.000 spores par gramme. Cette dernière méthode s'est révélée simple et facilement extrapolable à divers niveaux de production, en utilisant des réacteurs très similaires à ceux décrits précédemment pour l'enrichissement protéique. On est parvenu à démontrer qu'il est possible de produire dans un réacteur pilote à partir de seulement 10 Kg de bagasse de canne à sucre, la quantité de spores suffisante pour inoculer près de 5.000 Kg de substrat frais en moins de 7 et de 9 jours d'incubation pour *A. niger* et *T. harzianum* respectivement. Cette technologie est actuellement

respectivamente. Esta tecnología está incorporándose a las pruebas experimentales con las puntas de caña de azúcar en la planta piloto de fermentaciones Cuba-10 del ICIDCA-Cuba.

5.2.4 Modelado matemático.

En estos trabajos se validaron los modelos de transferencia de calor, propuestos por Gilles Bacquet y Gerardo Saucedo, detallados y discutidos en los informes correspondientes. Se ha desarrollado la metodología completa para resolver el problema numéricamente y simular el comportamiento de un bioreactor del tipo columna de lecho empacado (de 6 cm de diámetro y 45 cm de altura con 0.5 kg de materia seca), en el que se realiza el enriquecimiento proteínico de la yuca. Estos modelos se están empleando para predecir el comportamiento de un equipo mayor: 25 - 30 kg de materia seca, en un bioreactor de planta piloto. Con estos estudios, realizados en las instalaciones de la UAM I por Isabelle Canes de la Universidad Técnica de Compiègne, se comprobó la bondad de los modelos utilizados, ya que los valores de los números adimensionales (Biot, Péclet y Damkholer modificados) determinados experimentalmente, fueron similares en orden de magnitud a los de la predicción del modelo, demostrando que la transferencia de calor en los fermentadores estáticos está controlada por el fenómeno de conducción y que es necesario diseñar reactores en donde la mayor cantidad de calor sea removido por convección y no tratar de transferir (adicionar o remover) calor por conducción. La validez de estas observaciones para el escalamiento de los reactores está restringida a un espaciamiento entre placas inferior a 0.075 cm y a una altura de lecho no mayor de 0.6 m.

5.2.5 Producción de muestras para ensilaje y evaluación nutricional.

Con los equipos para FMS descritos, se produjeron lotes de yuca con diferentes tratamientos: sin ensilar (con una gelatinización parcial) y previamente ensilados por períodos hasta de nueve meses, que se inocularon con *Aspergillus niger* para el enriquecimiento por FMS. Los resultados experimentales demostraron que no existe una diferencia significativa en el incremento neto de proteínas después de 35 horas de procesamiento entre los pretratamientos. Sin embargo, la yuca ensilada requiere de un tratamiento térmico menos drástico que en el caso en que no se ensiló, con una economía substancial en el procesamiento global. Estas muestras se sometieron a una serie de evaluaciones nutricionales en las instalaciones del Instituto Nacional de Nutrición, con ratones. Los resultados indicaron una baja

expérimentée sur des pointes de canne à sucre dans un pilote pré-industriel de fermentation Cuba-10 de l'ICIDCA à Cuba.

5.2.4 *Modèle mathématique*

Dans ces travaux on a validé les modèles de transfert de chaleur proposé par Gilles Bacquet et Gerardo Saucedo, qui furent présentés et discutés lorsque des rapports correspondants. On a développé la méthodologie complète pour résoudre le problème de façon numérique et pour simuler le comportement d'un bioréacteur de type colonne de lit fixe (de 6 cm de diamètre et de 45 cm de hauteur, contenant 0,5 Kg de matière sèche), dans lequel on a réalisé l'enrichissement protéique du manioc. Ces modèles furent employés utilisés pour prédire le comportement d'un réacteur de taille supérieure: 25-30 Kg de matière sèche dans un bioréacteur pilote. A partir des études réalisées dans les installations de la UAM par Isabelle Canes (de l'UTC de Compiègne), on a pu contrôler la validité des modèles utilisés vu que les valeurs numériques adimensionnelles (Biot, Péclet et Damkholer modifiés) déterminées expérimentalement, furent du même ordre de grandeur que celles fournies par la prédiction du modèle; ce qui démontre que le transfert de chaleur dans les fermenteurs statiques est limité par le phénomène de conduction et qu'il est nécessaire de dessiner des réacteurs pour lesquels l'essentiel des calories produites est éliminé par convection et d ne pas essayer de transférer (ajouter ou enlever) la chaleur par conduction. La validité de ces observations concernant l'extrapolation des réacteurs statiques est limité à un espacement entre plaques inférieur à 0,075 m et à une hauteur de lit fixe ne dépassant pas 0,6 m.

5.2.5 *Production d'échantillons pour l'ensilage et l'évaluation nutritionnelle.*

A partir des équipements décrits pour la FMS, on a produit des lots de manioc avec différents traitements: sans ensilage (avec une gélatinisation partielle) ou préalablement ensilé durant des périodes allant jusqu'à neuf mois, et que l'on a inoculé avec *Aspergillus niger* pour l'enrichissement protéique par la technique de FMS. Les résultats expérimentaux démontrent qu'il n'existe pas de différence significative en ce qui concerne l'augmentation du contenu protéique net après 35 heures de fermentation entre les deux procédés. Cependant, le manioc ensilé requière un traitement thermique moins drastique que dans le cas du manioc non ensilé; ce qui représente une économie globale dans le procédé. Ces différents échantillons furent soumis à une série d'évaluations nutritionnelles dans les installations de l'Institut Nationale de Nutrition, en utilisant des souris. Les résultats indiquèrent une faible digestibilité du produit testé, et un profil d'acides aminés très attractif en tant que complément de rations

équilibrées pour animaux monogastriques.

5.2.6 Evaluation économique du procédé d'enrichissement

On a terminé les travaux par l'élaboration d'un manuel d'opération du procédé global d'enrichissement protéique, lequel décrit chaque opération unitaire séparée, et le procédé dans son ensemble.

A partir de l'information contenue dans ce manuel, on a réalisé une estimation de l'investissement nécessaire pour une installation pilote de 100-150 Kg de matière sèche, pour la transformation par FMS des matières premières tropicales d'origine agricole. Cette usine pilote multifonctionnelle a été conçue et dessinée par les ingénieurs Mariano Gutierrez, Octavio Gonzalez et Isais Ramos. Lors de cette étude, on a observé que le montant total nécessaire pour la réalisation d'une telle usine pilote serait de 280.000 Dollars US. Les études de sensibilité économique indiquèrent que le procédé ne serait pas rentable pour le Mexique, ceci essentiellement à cause du prix des matières premières et du capital, qui ne seraient pas compensés par les prix de vente d'un produit de faible valeur ajoutée. Pour cela, on a conclu à la nécessité de chercher une nouvelle définition du produit, par exemple un additif nutritionnel de type "probiotique" qui aurait un effet sur la digestion des fourrages par les ruminants dans les pays tropicaux.

digestibilidad del producto ensayado y un perfil de aminoácidos muy atractivo como complemento en las dietas balanceadas de animales monogástricos.

5.2.6 Evaluación económica del proceso de enriquecimiento.

Se concluyeron los trabajos para la elaboración de un manual de operación del proceso global de enriquecimiento proteínico, que incluye a cada operación unitaria por separado y al proceso en su conjunto. Con la información de ese manual se ha realizado una estimación de la inversión requerida para la instalación de una planta piloto (100 - 150 kg de materia seca) para el procesamiento y transformación por FMS de materias primas tropicales de origen agrícola. Esta planta multipropósitos, ha sido diseñada y proyectada por los Ingenieros Mariano Gutiérrez, Octavio González e Isaías Ramos. En este estudio, se observó que el monto total requerido para la instalación de esta planta era de \$280,000.00 dólares. Los estudios de sensibilidad económica indicaron que el proceso no sería rentable para México, principalmente debido a que los costos de materias primas y capital, no se compensarían con la venta de un producto de bajo precio. Por lo tanto, se concluyó la necesidad de buscar una nueva definición del producto, por ejemplo: un aditivo nutricional tipo "probiótico" que tuviese un efecto sobre la digestión ruminal de los forrajes.

6. MEJORAMIENTO DE LA DIGESTIBILIDAD DE FIBRAS POR FMS.

6.1 Principales logros.

En relación a la utilización de fibras naturales como soportes inertes para mejorar la productividad del proceso de FMS, se ha demostrado que:

- Con la adición de un 15 a un 30 % de bagazo de caña en el medio de cultivo sólido, es posible mejorar hasta en un 35 % la tasa específica de crecimiento de *A. niger* sobre la yuca.

Posiblemente, esto se debe a que las fibras celulósicas actúan como un almacén constante de agua y mantienen una actividad de agua elevada en el interior del medio de cultivo, de tal manera que la ausencia de agua deja de ser el factor limitante del crecimiento de los microorganismos. El uso de fibras en el proceso presenta otras ventajas tales como una mayor porosidad en el medio, y mas fácil manejo del mismo y algunas desventajas: la densidad aparente de las fibras es siempre muy baja y en las mezclas finales el medio de cultivo para la FMS, siempre requiere volúmenes de operación mayores; la concentración de fibras en el producto final estaría en función de la tolerancia de los animales por alimentar, esta es siempre muy limitada. En todos los casos, se observó que el sustrato siempre se consumía parcialmente y que la cantidad de azúcares asimilables al finalizar la FMS, siempre era elevada. Por estas razones se estudió el problema de la incorporación de fibras celulósicas, a tres niveles:

- a) el estudio básico del uso de las fibras como soportes inertes impregnados con sustratos solubles en agua.
- b) el estudio del mejoramiento de la digestibilidad de las fibras ensiladas y procesadas por FMS.
- c) el aprovechamiento de los resultados obtenidos con la adición de fibras para la elaboración de nuevos productos: antibióticos (penicilina) y dos enzimas hidrolíticas extracelulares, en donde las fibras actúan como soportes e inductores: celulasas y pectinasas.

6.2 Explicación de los Resultados

6.2.1 Sistema experimental-modelo con fibras.

Para el estudio del comportamiento de hongos filamentosos en la FMS, el sistema modelo consistió en impregnar bagazo de caña de azúcar, lavado y sin lavar, con azúcares fácilmente asimilables como glucosa y sacarosa, además de las sales correspondientes. Estos medios

6. AMELIORATION DE LA DIGESTIBILITE DES FIBRES PAR FMS

6.1 Principaux résultats

En relation avec l'utilisation des fibres naturelles comme supports inertes pour améliorer la productivité du processus de FMS, on a démontré que:

- Avec l'addition de 15 à 30 % de bagasse de canne à sucre dans le milieu de culture, il est possible d'améliorer jusqu'à 35 % le taux de croissance spécifique d'*Aspergillus niger* cultivé sur manioc.

Ceci peut être dû à ce que les fibres cellulosiques agissent comme un réservoir constant d'eau et maintiennent une activité de l'eau élevée à l'intérieur du milieu de culture. Ainsi le manque d'eau cesse d'être le facteur limitant de la croissance du microorganisme. L'usage de fibres dans le procédé présente d'autres avantages tels que l'obtention d'une meilleure porosité et d'une manipulation plus facile. Il présente par ailleurs des inconvénients comme l'abaissement de la densité apparente, donc abaissement de la productivité en protéines par unité de volume de cuverie, ce qui conduit à augmenter la taille des appareillages. D'autre part, la concentration en fibres du produit final doit être calculée en fonction de la tolérance de l'animal à alimenter, laquelle est toujours assez limitée. Dans tous les cas, on a observé que le substrat était consommé partiellement, et que la quantité de sucres assimilables à la fin de la FMS était toujours élevée.

Pour ces différentes raisons, on a étudié l'incorporation des fibres à trois niveaux:

- a) l'étude basique de l'utilisation des fibres comme support inerte imprégné de substrats solubles dans l'eau
- b) l'étude de l'amélioration de la digestibilité des fibres ensilées et traitées par FMS
- c) l'amélioration des résultats obtenus par l'addition des fibres pour l'élaboration de nouveaux produits : antibiotiques (pénicilline), et de deux enzymes hydrolytiques extracellulaires, pour lesquels les fibres agissent comme support et inducteurs (cellulase, pectinase).

6.2 Explication des résultats

6.2.1 Système expérimental-modèle avec les fibres

Pour l'étude du comportement des champignons filamenteux dans la FMS, le système modèle consiste à imprégner la bagasse de canne à sucre, (lavée ou non lavée) avec des sucres facilement assimilables comme le glucose et le saccharose, en plus des sels correspondants. Ces

sintéticos fueron ensayados al nivel de laboratorio con *A. niger*, en columnas de vidrio por Eric Oriol (Cooperante del gobierno francés, que obtuvo del doctorado de la Universidad de Toulouse con los resultados obtenidos en nuestros laboratorios). En estos trabajos, se demostró que además de la actividad de agua inicial, los factores físicos que determinan la FMS son:

- la concentración de glucosa

Un incremento en la concentración de glucosa, produjo buenos resultados, hasta con 420 g de glucosa por litro de agua impregnada en el soporte sólido, demostrando que los microorganismos empleados en los sistemas de FMS presentan una gran osmotolerancia y eficiencia ya que consumen hasta el 80% del sustrato inicial.

- el tamaño del inóculo.

Con un aumento en el tamaño del inóculo, se encontraron resultados positivos, acortando el tiempo de fermentación y mejorando la tasa de crecimiento, al contrario de lo que sucede en las fermentaciones líquidas. Otros factores físicos ensayados, tales como la humedad inicial y el tamaño de partícula no mostraron tener efecto en los resultados cinéticos del crecimiento de *A. niger* en estos sistemas modelo. Con esta misma orientación, realizaron una serie de estudios con *Aspergillus terreus*, puntas de caña y sacarosa por Pedro Cleto González y Ma Antonieta Brizuela del Instituto Cubano de Investigación de la Caña de Azúcar (ICIDCA) en las instalaciones de la UAM I, con la dirección de Gerardo Saucedo. Los trabajos con los investigadores cubanos se complementaron en la planta piloto de la UAM I, en un reactor estático con una capacidad de producción de 20 kg base seca. Este proceso de utilización y aprovechamiento de fibras por FMS se encuentra en operación en Cuba.

6.2.2 Estudios de microcalorimetría.

Los resultados encontrados en los estudios de microcalorimetría, realizados por E. Oriol en las instalaciones de CENIC de Cuba en una estancia de tres semanas, se detectó la existencia de un "salto" energético durante la etapa de transición de la germinación de las esporas al crecimiento apical. Este fenómeno también se presentó en los sistemas modelo con fibras impregnadas con glucosa con una intensidad creciente a medida que la concentración del sustrato y, por otra parte fué decreciente con el tamaño el inóculo se aumentaron.

Estos resultados sugieren que la ventaja de la FMS en relación con la osmotolerancia, sobre la FML (fermentación en medio líquido), es posiblemente la heterogeneidad del sustrato que favorece el acondicionamiento del medio sólido en la superficie de la interfase con el medio aéreo. Aparentemente este proceso de acondicionamiento

milieux synthétiques furent essayés au niveau laboratoire avec *A.niger*, dans des colonnes de verre par Eric Oriol (Coopérant français, boursier ORSTOM, qui a obtenu son doctorat de l'Université de Toulouse sur la base des résultats obtenus à la UAM). Ces travaux démontrèrent qu'en plus de l'activité de l'eau initiale, les facteurs physiques suivant sont déterminant pour la FMS:

- la concentration en glucose. Une augmentation de la concentration en glucose produit de bons résultats, jusqu'à des concentration de 420 g de glucose par litre de milieu d'imprégnation dans le support solide. Ceci démontre que la moisissure employée dans le système de FMS présente une grande osmotolérance et une efficacité telle qu'elle consomme jusqu'à 80 % du substrat initial.

- la taille de l'inoculum. Par une augmentation de la taille de l'inoculum, on a observé sur ce type de milieu glucosé, des résultats positifs, provoquant une diminution sensible du temps de fermentation et en améliorant le taux spécifique de croissance, le contraire de ce qui est généralement observé en fermentation en milieu liquide. D'autres facteurs physiques testés, tels que l'humidité initiale, et la taille des particules, ne montrèrent pas d'effets aussi marqués sur les résultats des cinétiques de croissance d'*A.niger*, dans ce système modèle.

Dans cette même optique, on a réalisé une série d'études avec *Aspergillus terreus*, les pointes de canne à sucre et le saccharose (Pedro Cleto Gonzalez et Ma Antonietta Brizuela de l'ICIDCA Cuba), dans les installations de la UAM, sous la direction de Gerardo Saucedo. Les travaux de ces chercheurs cubains furent poursuivis au pilote expérimental de 20 Kg base sèche. Ce même procédé d'utilisation et d'amélioration de la fibre par FMS est actuellement testé à Cuba.

6.2.2 Etudes de microcalorimétrie

Les résultats obtenus dans les études de micro-calorimétrie, réalisés par Eric Oriol dans les installations du CENIC à la Havane lors d'un stage de trois semaines, montrèrent l'existence d'un pic énergétique au cours de la transition entre la période de germination des spores et la croissance apicale du mycélium. Ce phénomène se présente également dans les systèmes modèles à base de fibres imprégnées avec du glucose, avec une intensité croissante en fonction de la concentration en substrat; on observe à l'inverse une diminution de ce phénomène lorsque la taille de l'inoculum de spores augmente.

Ces résultats suggèrent que l'avantage de la FMS en relation avec l'osmotolérance, en comparaison avec la FML (fermentation en milieu liquide), est peut être due à l'hétérogénéité de la répartition du substrat à la surface de contact du milieu avec l'air. Apparemment ce processus de conditionnement est associé à la libération de chaleur au

se asocia con la liberación de calor al principio del crecimiento apical y se muestra como un fenómeno cooperativo ya que se reduce el efecto osmótico con el aumento de la concentración de las esporas.

Cualquiera que sea la interpretación de estos fenómenos, el resultado práctico más importante es la posibilidad de usar elevadas concentraciones de sustratos solubles impregnados en medio sólido.

Estas observaciones dieron lugar al desarrollo del concepto de Fermentación con Sustrato Absorbido (ASF = Absorbed Substrate Fermentation) y probablemente den lugar a los desarrollos más novedosos y significativos de este proyecto. Para este fin se han iniciado los trámites de protección de la propiedad industrial del uso de la ASF para la producción de enzimas, esporas y metabolitos de interés comercial.

6.2.3 Estudios de ensilaje y digestibilidad de fibras.

Los trabajos de ensilaje de bagazo tratado por FMS con *Trichoderma harzianum* se llevaron a cabo por el grupo de ORSTOM en Martinique y fueron parte del trabajo de colaboración con la UAM que dió lugar a la tesis doctoral de S. Roussos. En general mostraron que el aumento de proteína sobre el residuo fibroso mejoraba la calidad del producto fermentado.

Desafortunadamente, los trabajos sobre la digestibilidad de las fibras fermentadas no se llevaron a cabo debido a la muerte del investigador francés F. Geoffroy del INRA de Francia, quien era el responsable de estos estudios.

6.2.4 Producción de enzimas por FMS.

Respecto a la producción de enzimas como una alternativa interesante para los procesos de FMS, se realizó un estudio de caracterización bioquímica, fisiológica y nutricional, de un hongo con capacidad celulolítica. Con estos trabajos se demostró que *Trichoderma harzianum* resultó ser una cepa protótrofa que crece a temperaturas entre 15 y 35 C, fuertemente halofílica y capaz de utilizar diversas fuentes de carbono. Este microorganismo germina rápido en presencia de azúcares fácilmente asimilables como glucosa y fructosa, aunque en presencia del inductor (celulosa) sintetiza celulasas desde el inicio del proceso, preferentemente en medios de cultivo con pH menores a 5. La cepa en estudio, presentó buenas características de crecimiento y producción de celulasas en un medio sólido utilizando bagazo de caña como única fuente de carbono y energía.

Otro de los productos de interés con este tipo de sistemas, son las enzimas pectinolíticas (pectinasas), con una amplia aplicación en la industria alimentaria en la extracción, clarificación y estabilización

début de la croissance apicale et se révèle être un phénomène coopératif car l'effet osmotique diminue lorsque la concentration de spores augmente.

Quelque soit l'interprétation de ces phénomènes, le résultat pratique le plus important réside dans la possibilité d'utiliser des concentrations élevées de substrats solubles imprégnés sur des supports solides.

Ces observations furent à la base du développement du concept de Fermentation de Substrats Absorbés (FSA) et probablement furent à la base des développements les plus novateurs et significatifs de ce projet. Pour cela on a initié des démarches de protection de propriété industrielles de l'utilisation de la FSA pour la production d'enzymes, de spores et de métabolites d'intérêt commercial.

6.2.3 Etudes de l'ensilage et de la digestibilité des fibres

Les travaux d'ensilage de bagasse traitée par FMS avec *Trichoderma harzianum* furent développée initialement par le groupe ORSTOM en Martinique et par la suite furent intégrés au groupe ORSTOM/UAM; ils donnèrent lieu à la soutenance de la thèse de Sevastianos Roussos à l'Université de Provence à Marseille en France. De manière générale, les résultats indiquent que l'augmentation des protéines dans le résidu fibreux améliore la qualité du produit fermenté.

Malheureusement, les travaux sur la digestibilité des fibres fermentées ne purent pas être terminées à cause du décès du chercheur français François Geoffroy de l'INRA, qui devait poursuivre ces études au Mexique.

6.2.4 Production d'enzymes par FMS

En ce qui concerne la production d'enzymes comme une alternative intéressante pour les procédés de FMS, on a réalisé une étude de caractérisation biochimique, physiologique et nutritionnelle d'un champignon cellulolytique. A partir de ces travaux, on a démontré que *Trichoderma harzianum* s'est révélé être une souche prototrophe qui pousse à des températures entre 15 et 35 °C; fortement halophile et capable d'utiliser diverses sources de carbone. Cette moisissure germe rapidement en présence de sucres facilement assimilables comme le glucose et le fructose, quoique en présence de l'inducteur (cellulose), elle synthétise des cellulases depuis le début du processus, dans des milieux possédant de préférence des pH inférieurs à 5,0. La souche étudiée présente de bonnes caractéristiques de croissance et de production de cellulases dans un milieu solide utilisant la bagasse de canne à sucre comme seule source de carbone et d'énergie.

de jugos de frutas tales como manzana, mango y uva entre otros. Se realizó un estudio de mercado, técnico y una evaluación financiera para la producción de estas enzimas por FMS en México. Se demostró que el tamaño de las importaciones mexicanas de este producto alcanzó los 350,000.00 US dls en 1985 y que la oportunidad comercial radica en la sustitución total de un mercado creciente de cerca de 80 kg por día de un producto con una actividad de 1300 UI/g.

Las ventajas que ofrece la técnica de producción de estas enzimas por FMS y en especial mediante la técnica de ASF se detallaron y discutieron en el inciso 6.2.2. por lo que se han desarrollado una serie de estudios aprovechando la experiencia adquirida en la utilización de soportes fibrosos, en este caso los trabajos se realizaron con bagazo de caña, pectina cítrica como sustrato inductor, sacarosa como fuente de carbono y energía, sales y una cepa de *A. niger* medianamente productora de las enzimas pectinolíticas; se utilizaron las técnicas de FMS y cultivo sumergido. Estos estudios han sido desarrollados por Dominique Dufour (Cooperante del gobierno francés quien obtuvo el DEA de la Universidad Técnica de Compiègne, Francia con los resultados obtenidos en la UAM). En FMS se encontró que la productividad es cinco veces mayor que en el caso del cultivo sumergido con una calidad similar, con la ventaja de obtenerse concentradas evitando una serie de etapas de extracción. Los estudios de extracción y purificación de estas enzimas los realizó Françoise Fort (Estudiante de la UTC, Francia que realizó un estancia en la UAM durante seis meses) bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela. La estabilidad de estas enzimas todavía no está dentro de los rendimientos mínimos esperados por lo que queda pendiente realizar estudios para mejorar su estabilidad así como encontrar nuevas cepas hiperproductoras de pectinasas por técnicas de mutación genética convencional y nuevos sustratos de origen agroindustrial disponibles a un bajo costo.

6.2.5 Producción de antibióticos por FMS

Por otro lado, se han realizado una serie de trabajos exploratorios en el laboratorio para producir metabolitos secundarios, como penicilina, con diferentes microorganismos usando columnas empacadas con 10 g de sustrato (base seca). Se desarrolló un método para producir penicilina por FS sobre bagazo de caña con *Penicillium chrysogenum*. En estos estudios de FS se utilizaron los mismos medios de cultivo que se emplean en la fermentación convencional o líquida. Se encontró que la producción de este antibiótico fue mayor con un medio concentrado y que la humedad inicial del medio sólido debía ser de 60 a 65 %. En estudios comparativos con la fermentación líquida, la producción de

Les enzymes pectinolytiques sont un autre exemple du type de produits qui peuvent être produits par FMS; ils ont une large application dans le domaine de l'alimentation, pour l'extraction, la clarification et la stabilisation des jus de fruits comme la pomme, la mangue, et le raisin. On a réalisé une étude de marché, technique et une évaluation financière pour la production de ces enzymes par FMS au Mexique. On a démontré que le volume des importations mexicaines de ce produit atteignait 350.000 Dollars US en 1985 et que l'opportunité commerciale résidait dans la substitution totale d'un marché en croissance de près de 80 Kg par jour d'un produit ayant une activité de 1300 UI/g.

Les avantages offerts par la technique de production de ces enzymes par FMS et spécialement par la méthode de FSA sont détaillés et discutés dans le paragraphe 6.2.2. On s'est basé sur l'expérience acquise pour la définition d'un modèle d'étude comportant la bagasse de canne comme support fibreux, la pectine du citron comme inducteur, le saccharose comme source de carbone et d'énergie, les sels et une souche d'*A. niger* moyennement productrice d'enzymes pectinolytiques que nous avons développé en FMS et aussi en fermentation liquide classique. Ces études ont été poursuivies par Dominique DUFOUR (Coopérant français et allocataire ORSTOM qui a obtenu son diplôme de DEA de l'UTC de Compiègne sur la base des résultats obtenus à la UAM). En FMS on a observé que la productivité est 5 fois supérieure à celle obtenue en fermentation submergée, avec des caractéristiques similaires, mais l'avantage d'obtenir les enzymes sous forme concentrée et en évitant une série d'étapes d'extraction. Les études d'extraction et de purification de ces enzymes furent réalisées par Françoise FORT (étudiante de l'UTC qui a réalisé un séjour à la UAM durant 6 mois) sous la direction d'Ernesto FAVELA. La stabilité de ces enzymes n'atteint pas encore les rendements minimum espérés et doit être améliorée; de même, il reste à sélectionner de nouvelles souches hyper productrices de pectinases par des techniques de mutation génétique conventionnelles et de nouveaux substrats d'origine agroindustrielle disponibles à faible coût.

6.2.5 Production d'antibiotiques par FMS

Par ailleurs, nous avons réalisé une série de travaux exploratoires au laboratoire pour produire des métabolites secondaires, comme la pénicilline, avec différentes moisissures en utilisant des colonnes contenant 10 g de substrat sec. On a développé une méthode pour produire la pénicilline par FMS sur bagasse de canne à sucre avec *Penicillium chrysogenum*. Dans ces études de FMS, on a utilisé les mêmes milieux de culture que ceux employés en fermentation liquide

penicilina por FS resultó hasta 10 veces mayor en un tiempo de fermentación mas corto y en condiciones no estériles (Barrios *et al.*, 1988). Los resultados obtenidos sugieren que la utilización de soportes fibrosos como el bagazo de caña, para producir compuestos de alto valor agregado como los antibióticos usando la ASF, puede ser una alternativa práctica e interesante con la que es posible darle un mayor valor agregado a este recurso agrícola.

conventionnelle. On a trouvé que la production de cet antibiotique est supérieure avec un milieu concentré, et que l'humidité initiale du milieu solide doit être comprise entre 60 et 65%. Dans ces études comparatives avec la fermentation liquide, la production de pénicilline par FMS s'est révélée être 10 fois supérieure pour une durée de fermentation plus courte et dans des conditions non stériles (Barrios *et al.*, 1988). Les résultats obtenus suggèrent que l'utilisation de supports fibreux tels que la bagasse de canne à sucre, pour produire des composés de haute valeur ajoutée comme des antibiotiques par la technique de FSA, peut se révéler une technique intéressante par laquelle il est possible de valoriser ce type de production agricole.

7. DETOXIFICACION DE LA PULPA DEL CAFE.

7.1 Principales Logros

Esta forma novedosa de aplicación de las FMS para el mejor aprovechamiento de residuos tropicales podría llegar a incrementar el potencial de algunos desechos de origen agroindustrial que a la fecha tienen un uso limitado por la presencia de factores antinutricionales o inclusive tóxicos como es el caso de la cafeína presente en la pulpa del café. Este desecho se produce en cantidades muy importantes en México, América Central y del Sur y su aplicación como forraje ha estado limitada por su toxicidad.

La hipótesis de trabajo esta relacionada con la posibilidad de realizar una FMS con una cepa especializada de algún hongo filamentoso, seleccionada no tanto por su capacidad de sintetizar proteínas de novo, como por la facilidad de degradar específicamente una sustancia tóxica presente en una materia prima y con esto ampliar la utilización de la misma materia prima en alimentos balanceados para ganado. Se ha seleccionado la pulpa de café como un modelo experimental de interés en la región, para poder validar estas hipótesis que podrían extenderse a muchos materiales agroindustriales que contienen sustancias tóxicas.

Los principales logros obtenidos fueron:

- Estudio y elaboración de material audiovisual sobre la producción tradicional del café y el destino de la pulpa de café.
 - Aislamiento y selección de 300 cepas de mohos saprofiticos que crecen en la pulpa del café y tienen cierta actividad biodegradadora de la cafeína.
 - Selección de 10 cepas de mohos resistentes a elevadas concentraciones de cafeína.
 - Puesta en práctica de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) para determinar específicamente a la cafeína en mezclas de fermentación.
 - Selección de 3 cepas resistentes a cafeína y con alta capacidad biodegradadora de cafeína en medio líquido (matraces agitados).
 - Comprobación de la actividad de las cepas seleccionadas con capacidad de remover prácticamente el 100% de la cafeína de la pulpa de café usando la técnica de FMS en columnas (10 g de sólidos).
- Posteriormente se inició un etapa de estudios relativos a la

7. DETOXIFICATION DE LA PULPE DE CAFE.

7.1 Principaux résultats

Cette nouvelle application de la FMS vise l'amélioration de résidus tropicaux pour augmenter le potentiel de certains déchets d'origine agro-industrielle qui dont l'utilisation est actuellement limitée par la présence de facteurs antinutritionnels ou même toxiques comme dans le cas de la caféine présente dans la pulpe de café. Ce déchet est produit en quantité très importante au Mexique, en Amérique Centrale et du Sud, mais ses applications comme fourrage est limitée par sa toxicité.

L'hypothèse de travail est reliée à la possibilité de réaliser une FMS avec une souche spécifique d'une moisissure, sélectionnée non pour sa capacité à synthétiser des protéines "de novo", mais pour sa capacité à dégrader spécifiquement une substance toxique présente dans la matière première. De cette façon, on pourrait augmenter l'utilisation de cette matière première dans les rations animales pour le bétail. On a choisi la pulpe de café comme modèle expérimental à cause de son intérêt régional, de façon à pouvoir valider cette hypothèse qui pourrait par la suite être appliquée à beaucoup d'autres résidus agroindustriels qui contiennent des substances toxiques.

Les principaux résultats obtenus concernent:

- Etude et l'élaboration de matériel audio-visuel sur la production traditionnelle du café et le devenir de la pulpe de café.
- Isolement et sélection de 300 souches de champignons saprophytes qui poussent sur la pulpe de café et possèdent une certaine activité de biodégradation de la caféine.
- Sélection de 10 souches de moisissures résistantes à des concentrations élevées de caféine.
- Mise en pratique de la technique de chromatographie liquide à haute pression (HPLC) pour déterminer spécifiquement la caféine dans des mélanges en fermentation.
- Sélection de 3 souches résistantes à la caféine ayant un forte capacité à biodégrader la caféine en milieu liquide (erlen agités).
- Vérification de l'activité des souches sélectionnées pour leur capacité à éliminer pratiquement 100% de la caféine de la pulpe de café en utilisant la technique de FMS dans des colonnes au laboratoire (10 g de matière sèche).

Postérieurement on a initié une étape d'étude relative à l'identification de ces souches au moyen de l'application de critères morphologiques et biochimiques, dont les résultats sont discutés ultérieurement.

identificación de estas cepas mediante la aplicación de criterios morfológicos y bioquímicos, de donde se desprenden los resultados que se discuten a continuación.

7.2 Resultados

7.2.1 Visitas de campo

Durante estas visitas, se logró contactar con diferentes funcionarios del Instituto Mexicano del Café (INMECAFE) y del sector productivo local, con lo que se facilitó la edición de dos películas en Super 8, que contienen todas las etapas de cultivo y beneficio del café en diferentes regiones.

Se realizó un estudio completo sobre la detoxificación de la pulpa del café, que fué editado y publicado conjuntamente entre la ORSTOM y la UAM con el apoyo económico de la CEE, como una serie de videos en francés y en español. El guión completo de esta publicación comprende los aspectos generales de la producción e industrialización del café en el mundo, América Latina y México. Los objetivos de los trabajos de campo fueron:

- a) Conocer las condiciones de producción y beneficio del café en México
- b) Conocer los diferentes niveles de industrialización y aprovechamiento *in situ* de los subproductos generados, incluyendo a la pulpa del café.
- c) Conocer las variedades genéticas mejoradas del café y su potencial en la agroindustria tradicional.
- d) Identificar oportunidades de uso de la biotecnología en la agroindustria cafetalera.
- e) Colectar muestras de tierra y pulpa de café para aislar microorganismos que permitan la detoxificación de dicha pulpa.

7.2.2 Colección de muestras en el campo.

Se colectaron un total de 36 muestras de granos de café, hojas y pulpa en las zonas de cultivo y beneficio de café de México durante una serie de visitas realizadas por el Dr. Sevastianos Roussos de la ORSTOM a los siguientes lugares: Xico, Veracruz; Jalapa, Veracruz y Tapachula, Chiapas. Con estas muestras se inició un trabajo exhaustivo de selección y aislamiento de microorganismos capaces de degradar cafeína como única fuente de nitrógeno. Se aislaron 300 cepas de hongos filamentosos. Estos microorganismos se aislaron en medios

7.2 Résultats

7.2.1 enquêtes de terrain

Au cours de ces enquêtes, on a pu contacter différents fonctionnaires de l'Institut Mexicain du Café (INMECAFE) et du secteur productif local, avec le concours desquels on a pu réaliser l'édition de 2 film 8mm, qui décrivent toutes les étapes de la culture et du traitement du café dans différentes régions.

On a réalisé une étude complète sur la détoxification de la pulpe de café, qui fut éditée et publiée conjointement par l'ORSTOM et la UAM avec le concours de la CEE, comme une série de films vidéo en Français et en Espagnol. Le contenu complet de ce document inclue les aspects généraux de la production et de l'industrialisation du café dans le monde, en Amérique Latine et au Mexique. Les objectifs des travaux de terrain furent:

- a) Connaître les conditions de production et de traitement du café au Mexique
- b) Connaître les différents niveaux d'industrialisation et de valorisation "*in situ*" des sous produits générés, y compris la pulpe de café.
- c) Connaître les variétés génétiques améliorées du café et leur potentiel dans l'agroindustrie traditionnelle.
- d) Identifier les opportunités d'utilisation de la biotechnologie dans l'agroindustrie du café.
- e) Collecter les échantillons de terre et de pulpe de café pour isoler les micro-organismes qui permettent la détoxification de cette pulpe.

7.2.2 Collecte des échantillons sur le terrain

On a réuni au total 36 échantillons de grains de café, de feuilles ou de pulpe dans les zones cultivées et les usines de traitement du Mexique, au cours d'une série de visites réalisées par le Dr. Sevastianos ROUSSOS de l'ORSTOM dans les endroits suivants: Xico, Veracruz, Jalapa, Veracruz et Tapachula Chiapas. A partir de ces échantillons on a commencé un travail de sélection et d'isolement de moisissures capables de dégrader la caféine comme seule source d'azote. On a ainsi isolé 300 souches de champignons filamenteux. Ces micro-organismes furent isolés sur des milieux solides semi synthétiques contenant de la streptomycine et contenant selon le cas, de l'extrait de café, avec ou sans saccharose et de la pulpe de café.

7.2.3 Isolement et sélection des souches capables de dégrader la caféine.

On a décrit systématiquement un bon nombre de caractéristiques qui

sólidos semisintéticos conteniendo estreptomycin, la base de estos medios en los diferentes casos fue: extracto de café, extracto de café y sacarosa y extracto de pulpa de café.

7.2.3 Aislamiento y selección de cepas capaces de degradar cafeína.

Se describieron sistemáticamente un buen número de características que han permitido agrupar a estas cepas en géneros taxonómicos bien definidos. Paralelamente se seleccionaron las cepas más aptas en función a su tasa de crecimiento, índice de esporulación y capacidad de degradación de cafeína con lo que se obtuvieron 10 cepas (un 3% del total de aisladas) para los estudios posteriores de detoxificación. A partir de los estudios fisiológicos y bioquímicos de estas últimas cepas se ha logrado seleccionar una cepa que presenta las mejores características, esto es degrada cerca del 100 % de la cafeína presente en los medios de cultivo. Este microorganismo, un *Penicillium sp.*, utiliza a la cafeína como única fuente de nitrógeno. La cuantificación de la cafeína se realizó en un equipo HPLC.

Estos trabajos aún no han concluido y se continuará con la caracterización bioquímica y fisiología del crecimiento y esporulación de estos microorganismos en pulpa de café. Se pretende incorporar en los estudios de selección, nuevas variables tales como una elevada actividad pectinolítica o celulolítica, incrementando el potencial biotecnológico de la pulpa de café.

7.2.4 Detoxificación de la pulpa de café

Se realizaron estudios de optimización de las condiciones de crecimiento y cinética de degradación de cafeína a nivel de laboratorio, así como pruebas preliminares de detoxificación a nivel de planta piloto. Finalmente se elaborarán pequeñas muestras del material detoxificado para su evaluación nutricional en el Colegio de Posgraduados de Chapingo, México.

Las pruebas de digestibilidad *in vitro* mezclando líquido ruminal con distintos materiales adicionados de pulpa de café fermentada con una cepa de *Penicillium sp.* mostraron un efecto "pro biótico", es decir, que la adición de 1 a 3% del producto fermentado a distintos materiales (rastrojo de maíz, alfalfa con aceite insaturado o harina de sangre) mostró tener un aumento de 5 a 8% de la digestibilidad de esos materiales.

De confirmarse dicho efecto por pruebas *in situ* e *in vivo* con animales fistulizados, se tendría una utilización novedosa de la pulpa de café fermentada con un valor económico 2 a 3 veces superior al costo de un concentrado y probablemente de interés comercial para ser industrializada.

ont permis de grouper ces 300 souches en genres taxonomiques bien définis. Parallèlement on a sélectionné les souches les plus aptes en fonction de leur taux de croissance, de l'indice de sporulation et de leur capacité à dégrader la caféine, ce qui a fourni 10 souches (soit 3% du total), pour les études ultérieures de détoxification. À partir des études physiologiques et biochimiques de ces dernières souches, on est parvenu à sélectionner une souche présentant les meilleures caractéristiques; celle-ci dégrade près de 100% de la caféine présente dans les milieux de culture. Cette moisissure, un *Penicillium* sp, utilise la caféine comme unique source d'azote. Le dosage de la caféine fut réalisé par HPLC.

Ces travaux ne sont pas encore terminés et sont poursuivis pour la caractérisation biochimique et physiologique de la croissance et de la sporulation de ces micro-organismes sur pulpe de café. On espère incorporer dans les études de sélection certaines nouvelles variables telles que l'activité pectinolytique ou cellulolytique, l'augmentation du potentiel biotechnologique de la pulpe de café.

7.2.4 Détoxification de la pulpe de café

On a réalisé des études d'optimisation des conditions de croissance et la cinétique de dégradation de la caféine au niveau du laboratoire; on a aussi réalisé les dosages préliminaires de détoxification au niveau pilote. Finalement on a produits des petites quantités d'échantillon de pulpe fermentée détoxifiée pour leur évaluation nutritionnelle par le Collège des Postgradués de Chapingo, Mexico.

Les analyses de digestibilité "*in vitro*", réalisées sur des mélanges de liquide ruminal avec différents matériels additionnés de pulpe de café fermentée avec une souche de *Penicillium* sp.. Ces analyses montrèrent un effet "pro biotique", c'est à dire que l'addition de 1 à 3% du produit fermenté à différents matériels (pailles de maïs, luzerne avec des huiles insaturées ou des farines d'abattoir.

Si cet effet "pro biotique" se confirmait "*in vivo*" sur des animaux fistulés, on pourrait disposer d'une nouvelle utilisation de la pulpe de café fermentée ayant une valeur économique de 2 à 3 fois supérieure au coût d'un concentré et qui présenterait probablement alors un intérêt commercial

7.2.5 Détoxification d'autres résidus.

Suivant l'exemple du modèle développé pour la pulpe de café, on a réalisé des études sur d'autres résidus comme des farines d'abattoirs (farines de poisson, de plumes, de sang...) de façon à évaluer l'utilisation des moisissures cultivées en FMS pour modifier leurs propriétés néfastes (élimination des amines toxiques provenant de la

7.2.5 Detoxificación de otros residuos

Siguiendo el modelo de la pulpa de café se realizaron estudios sobre otros residuos incluyendo: harinas de carne, de pescado, de plumas y sangre, para evaluar el uso de mohos que por FMS modificase sus propiedades indeseables, por ejemplo: remoción de aminas pestilentes y tóxicas derivadas de la putrefacción. Esto se logró usando cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*. Los resultados fueron prometedores para ser evaluados en un estudio ulterior, semejante al realizado para la pulpa de café.

7.2.6 Perspectivas económicas de la detoxificación de residuos orgánicos por la FMS.

Los estudios preliminares ya descritos sugieren que es posible seleccionar microorganismos específicos que remuevan los compuestos indeseables de una materia prima agropecuaria y que la transformen en un producto atractivo para la industria de alimentos pecuarios.

En el caso de la pulpa de café se estima en 100 mil toneladas la producción de pulpa de café (20% de la producción total de cerezas o grano fresco). Su aprovechamiento principal como abono orgánico es de muy bajo rendimiento económico pero su composición bromatológica sugieren un buen uso como alimento para cerdos, aves o bovinos. Sin embargo la presencia de fenoles y xantinas (cafeína) impiden su aprovechamiento nutricional.

El desarrollo de un proceso sencillo de tipo agroindustrial que utilice la pulpa recién producida y la fermente para transformarla en un material libre de agentes tóxicos y rica en proteína parece ser de cierto interés industrial. De mayor importancia sería el uso de la pulpa enriquecida como aditivo "probiótico".

También lo sería la producción simultánea de pectinasas que puedan ser utilizadas en la aceleración del proceso normal de separación de las pectinas del grano ya que la fermentación normal de la variedad "robusta" de café tarda cerca de 36 h para degradar la cutícula rica en pectina que es indispensable eliminar para producir un buen café pergamino (grano seco, cubierto con cascarilla seca de fácil remoción). Estas pectinasas se pueden producir usando la pulpa de café como sustrato para la FMS. El residuo libre de cafeína se usaría para la nutrición animal y el extracto rico en pectinasas, para acelerar el proceso tradicional de producción de café.

Estas alternativas están siendo estudiadas en colaboración con un cafeticultor del estado de Veracruz y con el apoyo de una firma farmacéutica.

putréfaction) On a pu ainsi, en utilisant des souches d'*A.niger* ou *Trichoderma harzianum*, obtenir des résultats prometteurs qui seront repris et détaillés dans des études ultérieures, similaires à celles développées pour la pulpe de café.

7.2.6 Perspectives économiques de la détoxification des résidus organiques par FMS.

Les études préliminaires décrites précédemment suggèrent qu'il est possible de sélectionner des micro-organismes spécifiques qui éliminent les composés indésirables présents dans des matières premières agricoles ou des déchets animaux pour les transformer en produits fermentés ayant un intérêt pour l'industrie de l'alimentation animale.

Dans le cas de la pulpe de café, on estime à 100 mille tonnes la production de ce résidu qui représente 20% de la production totale de grains de café brut. Son utilisation principale comme amendement organique présente un rendement économique très faible, alors que sa composition bromatologique suggère un usage correcte comme aliment pour le porc, les poulets ou les bovins; si elle ne contenait pas de phénols, xantines (caféine) qui empêche sa valorisation nutritionnelle.

Le développement d'un procédé simple de type agroindustriel qui utilise la pulpe de café fraîchement produite, la fermente et la transforme en un matériel dépourvu d'agents toxiques, mais riche en protéine, serait d'un intérêt certain pour l'industrie concernée. L'utilisation de la pulpe de café fermentée et enrichie, comme additif "probiotique" serait d'un intérêt encore plus marqué.

La production simultanée de pectinases permettrait d'accélérer la fermentation naturelle de la variété "robusta" qui dure près de 36 heures pour dégrader la cuticule riche en pectine et qu'il est indispensable d'éliminer pour produire un bon café vert (grain sec recouvert d'un pellicule sèche pouvant être éliminée facilement. Ces pectinases pourraient être produites sur de la pulpe de café par FMS; le résidu libre de caféine pourrait être utilisé pour l'alimentation animale, et l'extrait riche en pectinases serait utilisé directement pour accélérer le processus traditionnel de production de café.

Ces différentes alternatives sont actuellement à l'étude, en collaboration avec un producteur de café de l'état de Veracruz et avec l'appui d'une firme pharmaceutique.

8. DISCUSION Y CONCLUSIONES

ENRIQUECIMIENTO DE LA YUCA.

Los resultados del laboratorio se repitieron satisfactoriamente a nivel de planta piloto logrando integrar un proceso de transformación biotecnológica.

Se han instalado un total de tres prototipos experimentales, a nivel de planta piloto, para la FMS de diferentes materiales de origen agrícola. Con el último prototipo instalado (IRCHA), se desarrolló una estrategia completa de control automático mediante la captura de datos "en línea" y tiempo real, que en un corto plazo permitirá incluir el uso de modelos matemáticos similares a los que se han descrito en este informe.

Es necesario mencionar que los equipos de control, periféricos y sensores son en su mayoría de importación, sin embargo, pretendiendo un mayor grado de integración nacional, actualmente se encuentra en ejecución con el Departamento de Ingeniería Eléctrica de la UAM I un proyecto para el desarrollo de estos equipos fabricados en México.

La baja digestibilidad encontrada (cerca de un 34 %) del producto enriquecido en proteínas por FMS, limita su aplicación en las dietas balanceadas de animales monogástricos, hasta concentraciones inferiores a un 2 % de la ración normal en pollos, por ejemplo. Estos resultados conducen a proponer modificaciones en el proceso de FMS y mejorar esta digestibilidad con tratamientos físicos, químicos o enzimáticos. Finalmente, parece indispensable plantear una nueva estrategia para el uso del producto final y el desarrollo de nuevos productos. En este sentido el uso de residuos derivados de la FMS como "probióticos" parece ser atractivo puesto que se utilizan en dosis inferiores al 3% de las dietas y ayudan a digerir los forrajes y complementos utilizados en la ganadería tradicional. Aparentemente el efecto se obtiene mediante las actividades enzimáticas residuales de los mohos que actúan sinérgicamente con las actividades de los microorganismos ruminales y aumentan la digestibilidad de materiales relativamente baratos pero de poca asimilación (rastros, pajas, subproductos animales, grasas, etc.)

El escalamiento del proceso de FMS en reactores estáticos es factible, siempre y cuando los criterios de escalamiento que se mantengan constantes contemplen a la transferencia de calor como el principal parámetro, esto es debido a que el proceso de enriquecimiento por FMS esta controlado por la transferencia de calor via conducción, así como por el agua disponible para los microorganismos. Ambas limitaciones

8. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

ENRICHISSEMENT DU MANIOC

Les résultats de laboratoire ont été reproduits de façon satisfaisante au niveau de l'échelle pilote permettant de définir un procédé de transformation biotechnologique.

On a installé au total trois prototypes expérimentaux au niveau pilote, pour la FMS de différents matériels d'origine agricole. Avec le dernier prototype installé (type IRCHA), on a développé une stratégie complète de contrôle automatique au moyen de prises de données "en ligne" et en temps réel, ce qui à court terme permettra d'introduire l'utilisation de modèles mathématiques similaires à ceux qui ont été décrits dans ce rapport.

Il faut noter que les équipements de contrôle, périphériques et capteurs sont en majorité importés, cependant, pour atteindre un stade plus avancé d'intégration nationale, on réalise actuellement avec le Département de Génie Electrique de la UAM un projet de développement de ces équipements pour leur fabrication au Mexique.

La faible digestibilité observée (près de 34%) du produit enrichi en protéines par FMS, limite son application dans les rations équilibrées pour animaux monogastriques, jusqu'à des concentrations inférieures à 2 % de la ration normale dans le cas du poulet par exemple. Ces résultats conduisent à proposer des modifications dans le procédé de FMS et d'améliorer cette digestibilité par des traitements physiques, chimiques ou enzymatiques. Finalement, il apparaît indispensable de définir une nouvelle stratégie pour l'utilisation du produit final et de développer de nouveaux produits. Dans cette optique, l'utilisation des résidus dérivés de la FMS en tant que "probiotiques" paraît être attractif, car ils peuvent être utilisés à des doses inférieures à 3% de la ration et peuvent améliorer la digestion de fourrages et de compléments utilisés dans les élevages traditionnels.

Apparemment l'effet est obtenu grâce aux activités enzymatiques produites par les champignons, qui agissent de façon synergique avec les activités des micro-organismes contenus dans le rumen, de façon à augmenter la digestibilité des matériels relativement bon marché mais peu assimilables comme les rafles de maïs, pailles diverses, sous-produits animaux, graisses etc...

L'extrapolation du procédé de FMS en réacteurs statiques est factible, à condition que les critères d'extrapolation qui sont maintenus constants tiennent compte du transfert de chaleur comme principal paramètre, du fait que le procédé d'enrichissement par FMS est contrôlé par le

se han logrado superar con la incorporación de fibras naturales con una alta capacidad de retención de agua. Este escalamiento debe contemplar a las estrategias de remoción de calor del tipo convectivas, principalmente con la incorporación de aire seco y frío en los fermentadores. Finalmente, se demostró que la producción masiva de esporas de hongos filamentosos es factible en una escala de operación semicomercial.

UTILIZACION DE LAS FIBRAS

Se estudiaron dos modelos fundamentales:

- El uso de fibras (bagazo de caña) como sustrato para inducir la producción de celulasas.

Con estos estudios se demostró la factibilidad técnica de obtener altos rendimientos de celulasas que se pudieron extraer en el jugo prensado con altos niveles de actividad.

- El uso de fibras (bagacillo de caña) como soporte sólido inerte para absorber sustratos solubles y aprovecharlos por FMS.

Con estos estudios se demostró la ventaja de la FMS para aprovechar la producción experimental de enzimas (pectinasas) y antibióticos (penicilina) emplean altas concentraciones de sustratos solubles y con mayor productividad aparente que las fermentaciones sumergidas.

Con los experimentos de producción de pectinasas con bagazo de caña como soporte, sacarosa como fuente de carbono y pectina cítrica como inductor de las enzimas, los principales problemas durante la extracción de las enzimas del medio sólido. Las operaciones unitarias previas y posteriores a la FMS aún están por definirse y sería necesario experimentar más en este campo.

La continuación de estos trabajos están contemplados en un nuevo proyecto que se ha propuesto a la CEE con la colaboración de la ORSTOM en Montpellier, Francia, la Universidad Técnica de Compiègne y el Instituto de Alimentos de Valencia, España.

Para la producción de penicilina en el laboratorio sugieren que el proceso tiene un importante potencial industrial, aun cuando la cepa empleada en estos experimentos era de colección, la hipótesis que se espera demostrar es que los resultados serían extrapolables con una cepa de hiperproductora.

Para continuar este estudio sobre la penicilina, se han hecho experiencias preliminares en colaboración con una empresa nacional y se ha formulado una solicitud de subvención ante la Secretaría de Educación Pública.

transfert de chaleur par conduction), ainsi que de l'eau disponible pour le développement du microorganisme. Ces deux limitations ont été améliorées grâce à l'introduction de fibres naturelles qui possèdent une forte capacité de rétention d'eau. Cette extrapolation doit considérer les stratégies d'élimination des calories par convection, principalement par l'introduction d'air sec et froid dans les fermenteurs. Finalement on a démontré la faisabilité de la production massive de spores de champignons filamenteux pour une opération à l'échelle commerciale.

UTILISATION DES FIBRES

On a étudié deux modèles fondamentaux:

- L'utilisation des fibres (bagasse de canne à sucre) comme substrat pour induire la synthèse de cellulases.

Dans ces études, on a démontré la faisabilité technique d'obtention des rendements élevés de cellulases que l'on peut extraire par simple pressage qui fournit un jus à fort niveau d'activité.

- L'utilisation des fibres ("bagacillo" = pulpe de canne broyée), comme support solide inerte permettant d'adsorber des substrats solubles et de les transformer par FMS.

Dans ces études on a démontré l'avantage de la FMS pour la production expérimentale d'enzymes (pectinases) et d'antibiotiques (pénicilline) en utilisant de fortes concentrations de substrats solubles, permettant d'atteindre des productivités apparentes supérieures à celles observées en FML.

Sur la base des expérimentations de production de pectinase, avec la bagasse de canne à sucre comme support, le saccharose comme substrat carboné et la pectine citrique comme inducteur de synthèse des enzymes, on a pu définir les principaux paramètres de production et d'extraction des enzymes. Les opérations unitaires préalables et postérieures à la FMS restent encore à définir et il serait nécessaire de réaliser des recherches dans ce domaine.

La poursuite de ces travaux sont pris en considération dans un nouveau projet qui a été proposé à la CEE dans le cadre du programme STD 2, avec la collaboration de l'ORSTOM de Montpellier, l'UTC de Compiègne et l'Instituto de Tecnología de Alimentos de Valencia en Espagne. Ce projet a déjà été approuvé, mais le financement n'est pas encore acquis.

Les essais de production de pénicilline au laboratoire suggèrent que le processus a un potentiel important pour l'industrie, quoi que la souche employé dans ces travaux soit une simple souche de collection

Estos trabajos no están aún concluidos, se requiere de cepas con mejores características que las disponibles. Actualmente, se pretende escalar los resultados a un nivel de operación de planta piloto y estudiar con todo detalle la factibilidad económica de cada producto. La aplicación inmediata de estos resultados para el desarrollo de nuevos productos con un mayor valor agregado permitiría abrir una nueva perspectiva económica y de oportunidad para los procesos de FMS desarrollados con este proyecto.

Finalmente, una de las líneas de investigación a nivel básico, relacionada con las técnicas de FS, en general y con la ingeniería de los procesos en particular, es aquella relacionada con el conocimiento los fenómenos de transporte de masa y calor con reacciones bioquímicas. Estos trabajos se han iniciado en cooperación con la ORSTOM de Francia y la estancia a tiempo completo del Dr. Richard Auria en nuestras instalaciones.

DETOXIFICACION DEL CAFE

De los estudios referentes a la situación del café en el mundo, en América Latina y México, se puede concluir que:

- De las visitas de campo:

Se tiene una idea clara acerca de las condiciones en que se cultiva el café, tales como: la selección y plantación de granos, preparación de los terrenos, la protección de los plantíos, la problemática de la rolla (hongo fitopatógeno que ataca las hojas del café) y de las oportunidades de mejoras al proceso tradicional de fermentación del café.

Por otro lado, resulta evidente que la agricultura y la industria agroalimentaria en el estado de Veracruz presenta un suficiente grado de avance que puede facilitar la industrialización del café, así como la utilización de residuos derivados del cultivo y beneficio del mismo. A diferencia de los niveles de industrialización que presenta el estado de Chiapas, en donde están especializados en el cultivo del café.

- De los estudios de laboratorio:

Las muestras colectadas en el estado de Veracruz, permitieron obtener un buen número de cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en la pulpa de café.

De los estudios de aislamiento de cepas y caracterización de las mismas se ha logrado aislar un microorganismo (*Penicillium sp.*) que satisface las expectativas planteadas en un principio porque tiene la capacidad de biodegradar la totalidad de la cafeína de la pulpa y su

internationale. On espère arriver à démontrer que ces résultats seraient extrapolables à des souches améliorées hyper productrices.

Pour continuer ces études sur la pénicilline, on a fait des expériences préliminaires en collaboration avec une entreprise nationale et on a présenté une demande de financement au Ministère de l'Education Publique au Mexique.

Ces travaux ne sont pas encore terminés, on a besoin pour cela de souches possédant de meilleures caractéristiques que celle que nous avons actuellement. Nous pensons également extrapoler les résultats au niveau pilote et étudier en détail la faisabilité économique de chaque produit. L'application immédiate de ces résultats pour le développement de nouveaux produits de forte valeur ajoutée permettrait d'ouvrir une nouvelle perspective économique bien dans l'optique des procédés de FMS développés dans ce projet.

Finalement, une des lignes de recherche au niveau fondamental, en relation avec les techniques de FMS en général, et avec le génie des procédés de fermentation en particulier, concerne la connaissance des phénomènes de transport de masse et de chaleur des réactions biochimiques. Ces travaux sont actuellement initiés en coopération entre la UAM et l'ORSTOM par l'affectation à temps complet de Richard AURIA, chercheur ORSTOM à la UAM de Mexico.

DETOXIFICATION DU CAFE

Dés études portant sur la situation du café dans le monde et en Amérique Latine et au Mexique, il ressort que:

- Les enquêtes de terrain: On a une idée précise des conditions de culture du café concernant la sélection et la plantation des grains, la préparation des terrains, la protection des plantes, la problématique de la rouille (champignon phytopathogène qui attaque les feuilles de café) et des opportunités d'amélioration des procédés traditionnels de fermentation des grains de café.

D'un autre côté, il est apparu évident que l'agriculture et l'industrie du café dans l'état de Veracruz présente un degré d'avancement suffisant qui peut faciliter l'industrialisation de la transformation du café, de même que l'utilisation de résidus dérivés de la culture et de la transformation elle même (pulpe de café). On a observé aussi des différences dans les niveaux d'industrialisation que l'on rencontre dans l'état de Chiapas, spécialisé également dans la culture du café.

- Les études de laboratoire: Les échantillons récoltés dans les états de Veracruz, ont permis d'obtenir un grand nombre de souches de

residuo seco parece tener un efecto "probiótico" ruminal para el aprovechamiento de rastrojo de maíz, harina de sangre y aceites insaturados.

Durante el próximo semestre se pretende seleccionar a aquellos hongos filamentosos mas aptos para detoxificar la pulpa del café, encontrar las condiciones de operación mas apropiadas para cumplir con esta función y, finalmente, transferir estos resultados y ensayar en un nivel de planta piloto, con las instalaciones disponibles, para desarrollar bioensayos de los efectos probióticos antes indicados.

champignons filamenteux capables de croître sur de la pulpe de café. Des travaux d'isolement des souches et de leur caractérisation, on est parvenu à isoler une moisissure (*Penicillium sp.*) qui réponde aux exigences posées initialement, puisqu'elle possède la capacité de biodégrader la totalité de la caféine de la pulpe de café et que le résidu fermenté séché paraît posséder un effet "probiotique" pour les ruminants permettant de valoriser les rafles de maïs, la farine de sang ou les graisses insaturées.

Au cours de la prochaine étape, on pense sélectionner de nouveaux champignons aptes à détoxifier la pulpe de café, définir les conditions de fermentation les mieux adaptées, et finalement transférer ces résultats au niveau du pilote expérimental dans les installations disponibles, de façon à pouvoir réaliser des bioessais qui permettront de préciser les effets "probiotiques" indiqués précédemment.

9. PRODUCCION ACADEMICA Y FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

Como resultado de los trabajos en FMS, se han publicado los siguientes:

9.1. Artículos científicos.

1. Viniegra-González, G. 1984. Transformación microbiológica de la biomasa. Rev. Solar. Vol. 7: 8-14
2. Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M. Huet, MC. & Roussos, S. 1985. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions. Biotechnol. Bioeng. 27: 1385-1388
3. Raimbault, M., Revah, S. Piúa, F. & Villalobos P. 1985. Protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation using molds isolated from traditional foods. J. Ferm. Technol. 63: 395-399
4. Huerta-Ochoa, S., M. Gutiérrez-Rojas, R. López, A. E. Massucco y G. Viniegra. 1986. Caracterización de un fermentador dinámico para sustratos sólidos en planta piloto. Revista de la Academia Nacional de Ingeniería. Vol. 5 No. 2: 46-53.
5. Cruz, C. T., E. Oriol, B. Schettino, M. Gutiérrez-Rojas y G. Viniegra González. 1987. Determinación del grado de gelatinización en harina de yuca para fermentación sólida. Tecnol. Alimen. Vol. 22 No. 3: 4-7.
6. Revah, S., T. Reignault & J.M. Lebault. 1987. Accelerated development of swiss chese flavours by fermentation in slurry and granular substrates. Proc. 4th. European Congress on Biotechnology. Vol. 3 (Neijssel O. Van der Meer R., Luyben K. Eds.) Elsevier Publ. Amsterdam: 472-475.
7. Oriol, E., M. Raimbault, S. Roussos & G. Viniegra-González. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:498-503.
8. Oriol, E., B. Schetino, G. Viniegra-González & M. Raimbault. 1988. Solid state culture of *Aspergillus* on support. J. Ferment. Technol. 66:1-6.

9. PRODUCTION ACADEMIQUE ET FORMATION DE CHERCHEURS

Comme résultat des travaux sur la FMS, on a publié les articles suivants:

9.1. *Articles scientifique:*

1. Viniegra-González, G. 1984. Transformación microbiológica de la biomasa. Rev. Solar. Vol. 7: 8-14
2. Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M. Huet, MC. & Roussos, S. 1985. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions. Biotechnol. Bioeng. 27: 1385-1388
3. Raimbault, M., Revah, S. Piúa, F. & Villalobos P. 1985. Protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation using molds isolated from traditional foods. J. Ferm. Technol. 63: 395-399
4. Huerta-Ochoa, S., M. Gutiérrez-Rojas, R. López, A. E. Massucco y G. Viniegra. 1986. Caracterización de un fermentador dinámico para sustratos sólidos en planta piloto. Revista de la Academia Nacional de Ingeniería. Vol. 5 No. 2: 46-53.
5. Cruz, C. T., E. Oriol, B. Schettino, M. Gutiérrez-Rojas y G. Viniegra González. 1987. Determinación del grado de gelatinización en harina de yuca para fermentación sólida. Tecnol. Alimen. Vol. 22 No. 3: 4-7.
6. Revah, S., T. Reignault & J.M. Lebault. 1987. Accelerated development of swiss chese flavours by fermentation in slurry and granular substrates. Proc. 4th. European Congress on Biotechnology. Vol. 3 (Neijssel O. Van der Meer R., Luyben K. Eds.) Elsevier Publ. Amsterdam: 472-475.
7. Oriol, E., M. Raimbault, S. Roussos & G. Viniegra-González. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:498-503.
8. Oriol, E., B. Schetino, G. Viniegra-González & M. Raimbault. 1988. Solid state culture of *Aspergillus* on support. J. Ferment. Technol. 66:1-6.

9. López Ulibarri, R., S. Huerta, B. Schettino & M. Gutiérrez-Rojas. 1988. Gelatinization of cassava meal at pilot plant for solid state fermentation. (Submitted to: J. Food. Eng.)

10. Barrios-González, J., A. Tomasini, G. Viniegra-González & L. López. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. (Submitted to: Biotechnol. Lett.)

9.2. Patentes y Certificados de invención.

1. Raimbault, M. Roussos. s. 1985. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Patente francesa No. 85.08555.

2. Prebois, J. P., Raimbault, M. Roussos, S. 1985. Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide. Patente francesa No. 85.17934.

3. Oriol, E., Roussos, S., Raimbault, M., Barrios, J., Gutiérrez Rojas, M. & Viniegra González, G. 1986. Procédé de culture de microorganismes sur supports solides imprégnés en vue de la production et de l'extraction d'enzymes et métabolites. Patente depositada en la oficina de patentes francesa.

4. Javier Barrios González, Gustavo Viniegra González, Mariano Gutiérrez Rojas, Sevastianos Roussos, & Maurice Raimbault. 1988. Modificación del proceso de fermentación sólida para producir metabolitos secundarios microbianos. Certificado de Invención, México, No.17184

5. Mariano Gutiérrez Rojas, Sevastianos Roussos, Maurice Raimbault, Gustavo Viniegra González & Javier Barrios González. 1988. Sistema de producción de esporas microbianas por fermentación sólida en biorreactores estáticos. Certificado de Invención, México, No. 17187

6. Sevastianos Roussos, Maurice Raimbault, Javier Barrios González, Gustavo Viniegra González & Mariano Gutiérrez Rojas. 1988. Mejora en la producción de enzimas microbianas por fermentación sólida sobre productos agropecuarios y soportes. Certificado de Invención, México, No.17185

9. López Ulibarri, R., S. Huerta, B. Schettino & M. Gutiérrez-Rojas. 1988. Gelatinization of cassava meal at pilot plant for solid state fermentation. (Submitted to: J. Food. Eng.)

10. Barrios-González, J., A. Tomasini, G. Viniegra-González & L. López. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. (Submitted to: Biotechnol. Lett.)

9.2. Brevets et Certificats d'invention:

1. Raimbault, M. Roussos. s. 1985. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Patente francesa No. 85.08555.

2. Prebois, J. P., Raimbault, M. Roussos, S. 1985. Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide. Patente francesa No. 85.17934.

3. Oriol, E., Roussos, S., Raimbault, M., Barrios, J., Gutiérrez Rojas, M. & Viniegra González, G. 1986. Procédé de culture de microorganismes sur supports solides imprégnés en vue de la production et de l'extraction d'enzymes et métabolites. Patente depositada en la oficina de patentes francesa.

4. Javier Barrios González, Gustavo Viniegra González, Mariano Gutiérrez Rojas, Sevastianos Roussos, & Maurice Raimbault. 1988. Modificación del proceso de fermentación sólida para producir metabolitos secundarios microbianos. Certificado de Invención, México, No.17184

5. Mariano Gutiérrez Rojas, Sevastianos Roussos, Maurice Raimbault, Gustavo Viniegra González & Javier Barrios González. 1988. Sistema de producción de esporas microbianas por fermentación sólida en biorreactores estáticos. Certificado de Invención, México, No. 17187

6. Sevastianos Roussos, Maurice Raimbault, Javier Barrios González, Gustavo Viniegra González & Mariano Gutiérrez Rojas. 1988. Mejora en la producción de enzimas microbianas por fermentación sólida sobre productos agropecuarios y soportes. Certificado de Invención, México, No.17185

9.3. Cursos, seminarios y participación en eventos especializados

Durante la ejecución del proyecto se presentaron 42 trabajos en diferentes eventos especializados nacionales e internacionales, se dictaron 12 cursos en diferentes instituciones, incluyendo un curso especializado en FMS en la Universidad de La Plata, Argentina, en colaboración con el Centro de Investigaciones de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), en noviembre de 1985.

La conclusión del proyecto fue la organización de un seminario internacional titulado : "**Solid State Fermentation in bioconversion of agro-industrial raw material**" los 25, 26 y 27 de julio de 1988 en el centro ORSTOM de Montpellier. Las memorias fueron publicada en forma de un libro (anexo).

9.4. Formación de recursos humanos.

Se concluyeron siete Tesis de Licenciatura, cuatro de maestría, cuatro de doctorado y se encuentran en ejecución seis mas de maestría y doctorado.

a. Tesis de Licenciatura

Carmen Pozo. 1984. Ensilaje de harina de yuca fermentada. Licenciatura en Biología, Fac. de Ciencias. UNAM. México.

Maria del R. Trejo. 1986. Producción de pectinasas por fermentación en medio sólido. Licenciatura en Química y Farmacobiología, Fac. de Química. UNAM, México (recibió un premio en el Concurso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos).

Fernando Cancino. 1987. Evaluación nutricional de harina de yuca fermentada. Licenciatura en Químico Agrícola, Universidad Veracruzana, México.

Isabelle Canes. 1987. Transfert de la chaleur au cours de la fermentation sur milieu solide. Diplôme d'Ingénieur. Université de Technologie de Compiègne. Francia.

Carolina Meneses. 1988. Pregerminación de esporas de *Aspergillus niger*, en cultivo sumergido. Licenciatura en Químico Agrícola, Universidad Veracruzana, México.

9.3. Cours, Séminaires et Congrès spécialisés

Pendant le déroulement du programme 42 travaux ont été présentés lors de plusieurs congrès spécialisés nationaux ou internationaux, 12 cours se sont déroulés dans différents Instituts, englobant un cours spécialisé en FMS à l'Université de la Plata, Argentine, en collaboration avec le Centre de recherches sur les fermentations industrielles (CINDEFI) en Novembre 1985. Ce projet s'est terminé par un séminaire international intitulé "**Solid State Fermentation in bioconversion of agro-industrial raw material**", les 25, 26 et 27 juillet 1988 au Centre ORSTOM de Montpellier. Le compte rendu du séminaire a été publié sous la forme d'un livre (annexe).

9.4 Formation du personnel

En ce qui concerne la Formation, sur la base de ces travaux ont été passées 7 mémoires de licence, 4 thèses de maîtrise, 4 thèses de doctorat; on y ajoutera 6 thèses supplémentaires de maîtrise ou de doctorat en cours.

a. Deuxième cycle

Carmen Pozo. 1984. Ensilaje de harina de yuca fermentada. Licenciatura en Biología, Fac. de Ciencias. UNAM. México.

Maria del R. Trejo. 1986. Producción de pectinasas por fermentación en medio sólido. Licenciatura en Química y Farmacobiología, Fac. de Química. UNAM, México (recibió un premio en el Concurso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos).

Fernando Cancino. 1987. Evaluación nutricional de harina de yuca fermentada. Licenciatura en Químico Agrícola, Universidad Veracruzana, México.

Isabelle Canes. 1987. Transfert de la chaleur au cours de la fermentation sur milieu solide. Diplôme d'Ingénieur. Université de Technologie de Compiègne. Francia.

Carolina Meneses. 1988. Pregerminación de esporas de *Aspergillus niger*, en cultivo sumergido. Licenciatura en Químico Agrícola, Universidad Veracruzana, México.

Francoise Fort. 1988. Purification de pectinases produites par *Aspergillus niger* en fermentation solide. Diplôme d'ingénieur. Université de Technologie de Compiègne. Francia

Graciela Nava. 1988. Detoxificación de la pulpa de café con hongos filamentosos. Licenciatura en Química y Farmacobiología, Fac. de Química. UNAM. México.

b. Tesis de Maestría

Sergio Huerta. 1984. Efecto de la transferencia de masa y la acumulación de calor metabólico en la fermentación en cultivos sólidos. Maestría en Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Gerardo Saucedo. 1987. Contribución al estudio de la fermentación sólida de la yuca: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje. Maestría en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Dominique Dufour. 1987. Production de pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse. Diplôme d'Etudes Approfondies, Génie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne, Francia.

Paulina Lee. 1988. Evaluación técnica y nutricional del ensilaje piloto de yuca. Maestría en Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Universidad Iberoamericana, México

c. Tesis de Doctorado

Sevastianos Roussos. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Docteur es-sciences naturelles. Université de Provence. Francia.

Sergio Revah. 1986. Contribución al estudio de la producción acelerada de aromas de queso sobre sustratos granulares. Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Francia.

Ernesto Favela. 1987. Production d'éthanol par *Zymomonas mobilis* a partir de différents substrats d'origine végétale. Doctorat, Université de Provence. Francia

Francoise Fort. 1988. Purification de pectinases produites par *Aspergillus niger* en fermentation solide. Diplôme d'ingénieur. Université de Technologie de Compiègne. Francia

Graciela Nava. 1988. Detoxificación de la pulpa de café con hongos filamentosos. Licenciatura en Química y Farmacobiología, Fac. de Química. UNAM. México.

b. Troisième cycle

Sergio Huerta. 1984. Efecto de la transferencia de masa y la acumulación de calor metabólico en la fermentación en cultivos sólidos. Maestría en Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Gerardo Saucedo. 1987. Contribución al estudio de la fermentación sólida de la yuca: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje. Maestría en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Dominique Dufour. 1987. Production de pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse. Diplôme d'Etudes Approfondies, Génie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne, Francia.

Paulina Lee. 1988. Evaluación técnica y nutricional del ensilaje piloto de yuca. Maestría en Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Universidad Iberoamericana, México.

c. Thèses de Doctorat

Sevastianos Roussos. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Docteur es-sciences naturelles. Université de Provence. Francia.

Sergio Revah. 1986. Contribución al estudio de la producción acelerada de aromas de queso sobre sustratos granulares. Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Francia.

Ernesto Favela. 1987. Production d'éthanol par *Zymomonas mobilis* a partir de différents substrats d'origine végétale. Doctorat, Université de Provence. Francia

Eric Oriol. 1987. Etude sur l'effet de l'eau et de l'activité de l'eau sur les fermentations en milieu solide et sur des supports. Doctorat. Université Paul-Sabatier, Toulouse, France .

Se tienen siete trabajos de Tesis pendientes por concluir, cinco de ellas en universidades francesas y dos en México.

Se impartieron un total de 12 cursos a nivel de posgrado en México y en el extranjero.

Se ha logrado integrar un grupo de trabajo multidisciplinario, mediante la contratación temporal de personal local y extranjero.

Durante los últimos cuatro años, han colaborado un total de 14 mexicanos y dos extranjeros.

9.5. Acciones de cooperación

Se desarrollaron actividades conjuntas con los siguientes Institutos y Universidades:

a) El Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), con la colaboración permanente en las instalaciones de la UAM I de los siguientes investigadores: M. Raimbault, S. Roussos, L. Hannibal y Richard Auria, quienes desarrollaron diferentes líneas de investigación. Estos trabajos han sido presentados y resumidos en el Taller internacional de fermentaciones sólidas realizado en Montpellier, Francia del 25 al 27 de julio en la Unité de Biotechnologie, Centre ORSTOM de Montpellier (Biofutur. Octubre, 1988)

b) El gobierno de Francia, mediante el envío y aceptación en los laboratorios de la UAM I de los Cooperantes del Servicio Militar Voluntario francés: Eric Oriol, Gilles Bacquet y Dominique Dufour, mismos que con estancias de 14 meses, han colaborado en los programas de desarrollo tecnológico del presente proyecto.

c) La Universidad Técnica de Compiègne, Francia de dónde se han aceptado dos estudiantes en calidad de "estancias" durante seis meses cada una en los laboratorios de la UAM I. (Isabelle Canes y Françoise Fort)

d) El Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI) de la Universidad Nacional de la Plata de Argentina, a través de una estancia sabática por un año, del Dr. Alberto Emilio Massucco en las instalaciones de la UAM I.

Eric Oriol. 1987. Etude sur l'effet de l'eau et de l'activité de l'eau sur les fermentations en milieu solide et sur des supports. Doctorat. Université Paul-Sabatier, Toulouse, France .

Il reste 7 travaux de thèses à terminer, dont 5 en France et 2 au Mexique .

Il a été dispensé au total 12 cours au niveau du troisième cycle au Mexique et à l'étranger

Au niveau du personnel local, on est parvenu à intégrer un groupe de travail multidisciplinaire comprenant des chercheurs ORSTOM, des professeurs de la UAM, des étudiants et stagiaires français ou d'autres pays (cuba, Argentine) et du personnel contractuel temporaire (au cours des 4 ans, 14 Mexicains et 2 étrangers).

9.5. Actions de coopération

On a développé des activités conjointes avec les Instituts et Universités suivantes:

a) L'institut Français de la Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), grâce à une collaboration permanente dans les installations de l'Universidad Autonoma Metropolitana (UAM), unité de Iztapalapa, Département de Biotechnologie , incluant l'affectation permanente des chercheurs français suivants: M. Raimbault, S. Roussos, L. Hannibal, R. Auria, E. Oriol, qui développèrent les différentes lignes de recherche.

Ces travaux ont été présentés et résumés lors de l'Atelier International sur la Fermentation en milieu solide qui s'est déroulé au Centre ORSTOM de Montpellier en France du 25 au 27 Juillet 1988, Unité de Biotechnologie (cf. copie article de Biofutur, Octobre 1988) et dont les mémoires ont été édités sous forme d'un livre dont un exemplaire est joint. Ce document qui comporte 160 pages relatant les quelques 18 conférences présentées lors de ce Séminaire, fait le point des résultats récents obtenus dans le monde par les équipes travaillant sur ce sujet.

b) Le Gouvernement Français, au travers de l'affectation à la UAM de Mexico de Coopérants VSN (E. Oriol, G. Bacquet et D. Dufour), pour des durées de 14 mois chacun, a contribué au développement technologique du présent projet.

c) L'Université Technologique de Compiègne en France a accueilli en France des étudiants en formation Doctorale (S. Revah) et a envoyé à la UAM, 2 étudiants en séjours de fin d'étude de 6 mois chacun (Isabelle Canes et Françoise Fort).

e) El Instituto Cubano de Investigación sobre la Caña de Azúcar (ICIDCA) y el Centro Nacional de de Investigación Científica (CENIC) de Cuba. Se realizaron dos estancias en Cuba, una en cada Instituto, por un mes cada una: Eric Oriol y Sergio Huerta. Por parte de Cuba, se recibieron a cinco investigadores cubanos que realizaron estancias cortas en los laboratorios de la UAM I.

- d) Le Centre de Recherche et de Développement des Fermentations Industrielles (CINDEFI) de l'Université Nationale de La Plata en Argentine, à travers le séjour en année sabbatique de un an, du Dr. Alberto Massucco, dans les installations du niveau pilote de la UAM.
- e) L'Institut Cubain de Recherche sur les Dérivés de la Canne à Sucre (ICIDCA) et le Centre National de Recherche Scientifique (CENIC) de Cuba, ont participé à ce programme par l'envoi de 2 Stagiaires dans chacun de ces deux instituts pour un mois chacun (Eric Oriol et Sergio Huerta) et par le séjour à la UAM de 5 chercheurs cubains qui réalisèrent des séjours de courtes durée (1 semaine à 2 mois) dans les laboratoires de la UAM.
- f) Organisation d'un Séminaire International Sur les Utilisations de la Fermentation en Milieu Solide.

TABLE DES MATIERES

INDICE

1. Caractéristiques générales du projet <i>Datos generales del proyecto</i>	1
2. Objectifs spécifiques du projet <i>Objetivos generales del proyecto</i>	2
3. Activités <i>Actividades</i>	3
4. Résumé des résultats des recherches par étape <i>Resumen de resultados de investigación por etapas</i>	4
5. Enrichissement protéique du manioc <i>Enriquecimiento de la digestibilidad de fibras</i>	7
6. Amélioration de la digestibilité des fibres <i>Mejoramiento de la digestibilidad de fibras</i>	11
7. Détoxification de la pulpe de café <i>Detoxificación de la pulpa de café</i>	16
8. Discussion et conclusions <i>Discusión y conclusiones</i>	20
- Enrichissement du manioc <i>Enriquecimiento de la yuca</i>	20
- Utilisation des fibres <i>Utilización de las fibras</i>	21
- Détoxification du café <i>Detoxificación del café</i>	22
9. Production académique et formation <i>Producción académica y formación</i>	24
- Publications <i>Artículos</i>	24
- Brevets <i>Patentes</i>	25
- Cours et séminaires <i>Cursos y seminarios</i>	26
- Formation - Thèses <i>Formación y Tesis</i>	26
- Coopération <i>Cooperación</i>	28

RESUMEN

Los estudios sobre valorización por fermentación en medio sólido de tres sustratos agrícolas tropicales (yuca, bagazo de caña, pulpa de café) tenían cada uno su objetivo específico:

- El enriquecimiento proteínico de la yuca (*Manihot esculenta*) por medio del crecimiento de una cepa de *Aspergillus niger*, seleccionada por sus capacidades de fermentación, conduce a un incremento de 2 a 16% del contenido proteínico de la yuca. Los resultados obtenidos al laboratorio fueron reproducidos a una escala semi piloto (10-20 Kg), con dos tipos de reactores (agitado y estatico). El bajo costo de la soya hace difícil la competitividad de la biosíntesis de proteínas para alimentación animal. Los conocimientos obtenidos podrán servir a la fabricación de nuevos productos utilizados como materias primas en la confección de alimentos (probióticos).

- La fermentación en medio sólido aplicada al bagazo de caña, utilizando una cepa de hongo celulolítico (*Trichoderma harzianum*, *Aspergillus terreus*), puede ser utilizada para incrementar su valor digestivo para ruminantes, o para la producción de jugos con alta actividad celulolítica. Los resultados obtenidos permitieron desarrollar un nuevo proceso de fermentación sólida para la fabricación de jugos concentrados en enzimas u otros metabolitos fungicos (pectinasas, penicilinas); este proceso fue patentado por ORSTOM/UAM.

- Fue demostrada la posibilidad de detoxificar específicamente la pulpa de café usando una cepa de *Penicillium sp.*, aislada y seleccionada en México, cual degrada la cafeína con rendimiento superior a 80% después de menos de 48 horas. Una colección de 300 aislados fue obtenida, cuales están estudiados para otras características (pectinasas, polifenol oxidasas...) de estas cepas que crecen directamente sobre pulpa de café.

Al lado de los resultados técnicos y científicos, el proyecto ha permitido publicar 10 artículos científicos, depositar 1 patente y 3 certificados de invención, participar a congresos regionales e internacionales. Un seminario temático internacional sobre la Fermentación sólida fue organizado en Montpellier (25-27 julio 1988) con trabajos publicados (libro anexo).

Al nivel de formación, permitió entrenar 7 estudiantes de licenciatura, 4 de maestría, y la obtención de 3 tesis de Doctorado. Permitió también realizar acciones de cooperación entre Francia, México; Cuba, Argentina y Costa Rica.

La continuación del programa se orientará más específicamente hacia investigaciones para producción de pectinasas por fermentación en soportes sólidos según un proceso que autorizaría nuevas aplicaciones del uso de las pectinasas, particularmente en la agro-industria de café y para la fabricación de nuevos jugos de frutas tropicales. Una solicitud de apoyo fue mandada a la CEE-DGXII, programa SDT2, que está aprobada por las varias comisiones, y por el momento, en espera de financiamiento.

RESUME

Les études ont porté sur la valorisation par fermentation en milieu solide de trois types de substrats agricoles tropicaux (manioc, bagasse, pulpe de café), chacune ayant un objectif spécifique:

- L'enrichissement en protéines du manioc (*Manihot esculenta*) permet l'élévation de la teneur en protéines microbiennes de 2 à 16% grâce au développement contrôlé d'une souche d'*Aspergillus niger* sélectionnée pour ses capacités de croissance. Les résultats obtenus au laboratoire ont été reproduits à l'échelle semi-pilote (10-20 Kg), sur deux types de réacteurs (agité et statique). Le faible prix de la protéine de soja rend difficilement compétitive la biosynthèse de protéines pour l'alimentation animale. Les connaissances acquises pourront toutefois servir à la fabrication de nouveaux produits utilisés comme matières premières dans la fabrication d'aliments (probiotiques).

- La fermentation en milieu solide appliquée à la bagasse de canne à sucre, en utilisant un champignon cellulolytique (*Trichoderma harzianum*, *Aspergillus terreus*), peut être utilisée pour augmenter sa valeur digestive pour les ruminants, ou pour la production de jus à haute activité cellulasique. Les résultats obtenus ont permis de mettre au point un nouveau procédé de fermentation solide pour la fabrication de jus concentrés en enzymes ou autres métabolites fongiques (pectinases, pénicillines); ce procédé a fait l'objet d'un dépôt de brevet ORSTOM/UAM.

- Il a été démontré enfin qu'il était possible de réaliser une détoxification spécifique de la pulpe de café en utilisant une souche de *Penicillium sp.*, isolée et sélectionnée au Mexique, ce qui permet de dégrader la caféine à plus de 80% en moins de 48 heures. Une collection de 300 isolats a été réunie qui est actuellement criblée pour connaître les potentialités (pectinases, polyphénol oxydases...) de ces germes capables de se développer directement sur pulpe de café.

A côté des résultats techniques et scientifiques, le projet a permis de publier 10 articles scientifiques, de déposer un brevet et trois certificats d'invention, de participer à des congrès régionaux et internationaux. Un séminaire thématique international sur la fermentation solide a été organisé à Montpellier (25-27 juillet 1988) dont les travaux présentés ont été publiés (livre annexé).

Au niveau de la formation il a permis de former 7 étudiants de deuxième cycle, 4 étudiants de troisième cycle et à conduit à la soutenance de 3 thèses de doctorat. Il a permis enfin de réaliser des actions de coopérations entre la France, le Mexique, Cuba, Argentine et Costa Rica

La poursuite de ce programme devrait s'orienter plus spécialement vers des recherches visant à produire des pectinases par fermentation en milieu solide selon un procédé qui permettrait de nouvelles applications des pectinases, en particulier dans l'agro-industrie du café, et dans la fabrication de nouveaux jus de fruits tropicaux. Une demande a donc été déposée auprès de la DG XII, programme STD2, qui a été retenue par les commissions et est actuellement en attente de financement.