



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

COMMUNAUTE ECONOMIQUE EUROPEENNE

DG XII

DEUXIEME RAPPORT TECHNIQUE

Juillet-Décembre 1986

TITRE DU PROJET :

VALORISATION DES PRODUITS AGRICOLES TROPICAUX PAR  
FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE.

Responsables Scientifiques : Maurice RAIMBAULT (ORSTOM)  
Gustavo VINIEGRA GONZALEZ (UAM)

Références Contrats: CEE/ORSTOM : 418-TSD-A (F)  
CEE/UAM-I : 106-TSD-A (MEX)

**ORSTOM**

INSTITUT FRANCAIS DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

COMMUNAUTE ECONOMIQUE EUROPEENNE

DEUXIEME RAPPORT TECHNIQUE

Juillet-Décembre 1986

TITRE DU PROJET:

VALORISATION DES PRODUITS AGRICOLES TROPICAUX PAR  
FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE.

NUMERO du projet : TSD-A-106-MEX (B)

Coordinateur du projet : Gustavo VINIEGRA GONZALEZ

Contractant:

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE  
UNIVERSITE AUTONOME METROPOLITAINE  
UNITE D'IZTAPALAPA ( UAM-I )

APDO POSTAL 55-535, CP 09340  
MEXICO, DF  
TELEPHONE: 686-03-22 EXT: 589, 275  
TELEX : 1764296 UAMME

En Collaboration avec:

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT  
EN COOPERATION ( ORSTOM )

HOMERO 1804-404, COL. LOS MORALES  
CP 11510, MEXICO, DF  
TELEPHONE : 557-60-32  
TELEX : 1771607 UNAGME

## 2. RESUME

Les principaux résultats obtenus lors de notre recherche sont les suivants :

a) L'enrichissement protéique de la farine de manioc (*Manihot esculenta*) par la technique de fermentation solide, grace à l'utilisation de champignons filamenteux comme *Aspergillus Niger*, étudiés au niveau pilote (10-25 kg matière sèche). L'étude comprend l'installation et la mise en marche de prototype de fermenteurs, le modèle mathématique, les stratégies de contrôle et les manuels d'opération ; ainsi que l'évaluation nutritionnelle des échantillons du produit obtenu.

b) L'amélioration de la digestibilité de fibres par FS ; l'utilisation de supports fibreux comme la bagasse et la canne à sucre, ainsi que la production d'enzymes hydrolytiques : cellulases et pectinases.

c) Des études sur la détoxification du café par FS et l'isolement de souches capables de dégrader la caféine et leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques.

### 3. ENRICHISSEMENT PROTEIQUE DU MANIOC

#### 3.1. Introduction

Les résultats les plus importants ont été présentés dans notre premier rapport technique dans lequel sont développés les succès obtenus, au pilote, des méthodes de laboratoire par FS (production de spores et prétraitement thermique des substrats) ainsi qu'une amorce des modèles mathématiques caractéristiques de nos expériences, l'installation et la mise en marche de trois fermenteurs, qui permettent d'évaluer la production de protéines par A. niger avec des rendements très similaires à ceux obtenus au laboratoire. De ces travaux, se dégagent la nécessité d'améliorer les stratégies de contrôle du procédé, grâce à l'aide de programmes informatiques pour la prise de données en direct ainsi que le développement de modèles mathématiques qui répondent aux cinétiques expérimentales, sa résolution numérique et l'évaluation des paramètres, et enfin la validation des modèles pour le développement et le contrôle des fermenteurs.

#### 3.2. Résultats

Durant ce semestre, un fermenteur pour la FS sur différents substrats a été installé et mis en marche, cet équipement a été acquis en France à l'Institut de la Recherche chimique Appliqués (IRCHA). Il est de type dynamique et consiste en un pétrin de boulangerie avec un double fond et des perforations pour l'aération. Il a deux moteurs, un pour le bras d'agitation et l'autre pour la rotation ; la vitesse étant variable pour les deux. Il dispose d'un équipement de contrôle automatique et une série de périphériques. La description détaillée de l'équipement se trouve en annexe 1, ainsi qu'un manuel d'utilisation et d'entretien, élaborés par les ingénieurs Rual Lopez Uibarri et Gilles Bacquet (Université technique de Compiègne), ce dernier ayant effectué ce travail durant son temps de service militaire comme coopérant français à la UAM I.

L'utilisation de cet équipement a permis d'adapter un système de saisie de données en continu sur programme basic, adapté aux cartes d'interfaces d'un microordinateur Apple IIe, d'usage exclusif pour ce fermenteur. Le système de saisie des données fonctionne actuellement sur un seul canal, et transforme les signaux (pour le moment seulement des températures) digitaux stockés et sortis immédiatement sous forme de graphiques. Le manuel complet de fonctionnement de ce système, élaboré par Sergio Huerta Ochoa et Rual Lopez Uibarri, se trouve en annexe II.

Actuellement, les travaux sur la recherche d'un modèle mathématique se poursuivent. Ils tentent de valider les modèles de transfert de chaleur, proposés par Gilles Bacquet et Gerardo Saucedo, détaillés et discutés dans le rapport préalable. Ce modèle a été substantiellement modifié par G. Saucedo, qui a révisé la méthodologie complète pour résoudre mathématiquement le problème et simuler le comportement d'un bioréacteur de type colonne (de 6 cm

de diamètre et 45 cm de hauteur comprenant 0.5. kg de MS), avec lequel s'effectue l'enrichissement protéique du manioc. Cette méthodologie est détaillée dans l'annexe III. On peut y constater que la justesse des prédictions mathématiques est confirmée par les résultats expérimentaux obtenus.

Actuellement, ces modèles sont utilisés pour prévoir le comportement d'un équipement plus important 25-30 kg de MS dans le cadre du pilote dans un bioréacteur. Ces études réalisées par Isabelle Canes de l'Université de Compiègne, au cours d'un stage de six mois effectué à la UAM I, seront utilisés pour le développement de la FS de manioc dans ce type de réacteur. De même, actuellement, en ce qui concerne l'évaluation économique finale du processus d'enrichissement, une approximation de l'investissement nécessaire pour l'installation d'une unité pilote (100-150 kg de MS) pour la transformation par fermentation solide de matières premières tropicales d'origine agricole. Cette unité a été dessinée par l'ingénieur Mariano Gutierrez, Octavio Gonzalez et Isalas Ramos. Cette étude est détaillée dans l'annexe IV, dans laquelle, on peut voir que le montant global nécessaire pour l'installation de cette unité est de 280,000 \$ dollars. Dans ce rapport, nous présentons une étude complète de la factibilité économique de ce procédé.

Avec les équipements pour fermentation solide (FS) décrits dans ce rapport et le précédent, des lots de manioc ayant suivi différents traitements ont été produits ; sans ensilage (avec une gélatinisation partielle) ou préalablement ensilés pour des études ultérieures, lots qui furent inoculés par Aspergillus niger pour l'enrichissement en protéines.

Les résultats expérimentaux montrent qu'il n'existe pas une différence significative entre les différents prétraitements dans l'accroissement net de protéines après 35 heures de processus. Cependant, le manioc ensilé exige un traitement thermique moins fort dans le cas du manioc non ensilé, engendrant une économie substantielle dans le processus global. Ces échantillons sont soumis à une série d'évaluation nutritionnelle, sur rats dans les locaux de l'Institut National de Nutrition.

La méthodologie employée, et une ample discussion sur les résultats obtenus par Fernando Cancino et Gustavo Viniegra sont joints en annexe V. Ces résultats indiquent une faible digestibilité. Deux hypothèses en découlent, à vérifier le prochain semestre. a) Il existe une concentration élevée de l'azote inorganique émanant du produit après FS et b) la composition de la paroi cellulaire des champignons, principalement formée de kitine est pratiquement non digérée par les animaux de laboratoires utilisés (les rats) ; dans le cas d'utilisation de poulets nous pensons que ce problème sera moins important.

### 3.3. Discussion et conclusions

Quatre prototypes expérimentaux ont été mis en place, pour la FS de différents matériaux d'origine agricole. Avec le dernier prototype installé, nous avons développé une stratégie complète de contrôle automatique moyennant la prise de données en direct et en

temps réel, qui dans peu de temps, permettra d'inclure l'usage de modèles mathématiques similaires à ceux décrits dans ce rapport. Il est nécessaire de mentionner que les équipements de contrôle, périphériques et sondes sont en majeure partie d'importation. Cependant, en vue d'une plus grande intégration nationale, l'exécution d'un projet avec le Département de Ingénierie Electrique de la UAM I, a lieu actuellement, pour le développement d'équipements fabriqués à Mexico.

La faible digestibilité rencontrée (proche 34 %) du produit enrichi en protéines par FS, limite son application aux rations diététiques d'animaux monogastriques, jusqu'à des concentrations inférieures à 2% de la ration normale du poulet par exemple.

Ces résultats conduisent à proposer des modifications dans le processus de FS et à améliorer cette digestibilité grâce à des traitements appropriés : physiques, chimiques ou enzymatiques.

Finalement, il paraît indispensable d'établir une nouvelle stratégie quant à l'utilisation du produit final et au développement de nouveaux produits.

## 4. AMELIORATION DE LA DIGESTIBILITE PAR FS

### 4.1. Introduction

Grace à l'utilisation de fibres naturelles comme support Inerte pour améliorer la productivité du processus de FS, et en fonction des résultats de recherche précédemment obtenus, il a été démontré qu'avec un ajout de 15 à 30 % de bagasse de canne à sucre dans le milieu de culture solide, il est possible d'améliorer jusqu'à 35 % le taux spécifique de croissance d'A. niger sur manioc.

Probablement, ceci est dû au fait que les fibres cellulosiques se comportent comme un réservoir permanent d'eau et maintiennent une activité d'eau (Aw) élevée à l'intérieur du milieu de culture, de telle manière que l'absence d'eau n'est plus le facteur limitant de la croissance des microorganismes. L'usage de fibres dans le procédé, présente des avantages comme une meilleure porosité du milieu et une manifestation plus facile du substrat. Mais aussi quelques inconvénients ; la densité apparente des fibres est par exemple toujours plus faible et dans les mélanges finaux, le milieu de culture de FS requiert toujours des volumes opératoires supérieurs. La concentration de fibres du produit final sera fonction de la tolérance des animaux, ceci étant le facteur le plus limitant.

Dans tous les cas, on a observé que le substrat se consommait toujours partiellement et que la quantité de sucres assimilables obtenus après FS était toujours élevée. C'est pour cela que nous avons décidé d'étudier le problème d'incorporation de fibres celluloses à 3 niveaux :

a) le développement d'un système expérimental de FS, modèle qui permettra l'étude de la physiologie et de la biochimie des microorganismes inducteurs dans la FS, sans problèmes d'induction enzymatique ou de diffusion de nutriments.

b) l'étude de l'amélioration de la digestibilité des fibres ensilées et ayant subies la FS.

c) l'utilisation des résultats obtenus avec l'addition de fibres pour l'élaboration de nouveaux produits, dans le cas présent, deux enzymes hydrolytiques, cellulases et pectinases avec lesquelles les fibres agissent comme supports et inducteurs ;

### 4.2. Résultats

Pour l'étude du comportement de champignons filamenteux en FS, un modèle se dégage qui consiste à imprégner la bagasse de canne à sucre, lavée ou non, avec des sucres facilement assimilables comme le glucose et la saccharose, en plus des sels. Ces milieux synthétiques ont été étudiés au niveau du laboratoire avec A. niger, avec bagasse de canne et glucose en colonne de verre par Eric Oriol.

Les résultats de ces travaux sont présentés en annexe VI, pour lesquels on peut constater qu'en plus de l'activité initiale de l'eau, les facteurs physiques qui influencent ces procédés sont la concentration en glucose et la taille de l'inoculum. Une augmentation de la concentration de glucose donne de bons résultats jusqu'à 420 grammes de glucose par litre d'eau en milieu solide, montrant que les microorganismes employés dans les systèmes de FS présente une grande tolérance osmotique et une bonne efficacité puisqu'ils consomment jusqu'à 80 % du substrat initial.

En augmentant la quantité d'inoculum, les résultats obtenus sont positifs, raccourcissant le temps de fermentation et augmentant le taux de croissance, à l'inverse de ce qui se produit dans le cas de fermentation liquide.

D'autres facteurs physiques étudiés, comme l'humidité initiale et la taille des particules, ne semblent pas avoir d'effet sur les résultats cinétiques de la croissance d'A niger dans le procédé utilisé. Dans cette même optique, une série d'études réalisées avec Aspergillus terreus, a eu lieu à la UAM I, sur un mélange de canne et saccharose par Pedro Cleto Gonzalez et Ma. Antonieta Brizuela de l'Institut cubain de recherche sur la canne à sucre (ICIDCA), sous la direction de Gerardo Saucedo.

Les travaux des chercheurs cubains seront bientôt terminés et seront complétés par des travaux au niveau pilote à la UAM.

Les résultats obtenus qui se trouvent dans l'annexe VII sous forme d'une série d'études de microcalorimétrie, correspondants aux travaux réalisés par Eric Oriol dans les locaux du CENIC de Cuba, durant un séjour de trois semaines à la Havane.

De ces travaux avec A. niger, sur manioc et supports inertes, s'est révélée l'existence d'un pic énergétique pendant l'étape de transition entre la germination des spores et la croissance apicale. Ce phénomène a également lieu avec les systèmes sur fibres imprégnées de glucose avec une intensité croissante, au fur et à mesure que la concentration du substrat et la taille de l'inoculum augmentent.

Les études de digestibilité des fibres demeurent toujours en suspens et doivent être faites par l'INIFAP / INRA. Ces travaux n'ont pas encore été réalisés à cause de la mort du chercheur français F. Geoffroy de l'INRA - France.

Comme la production d'enzymes se révèle être une alternative intéressante pour les procédés de FS, une étude de caractérisation biochimique, physiologique et nutritionnelle a lieu actuellement sur un champignon, à capacité de synthèse de cellulase : Trichoderma harzianum.

Une synthèse du travail réalisé par les ingénieurs Leobardo Serrano et Jorge Aviles sous la direction de la QFB Angeles Aquiahuatl et du Dr. Sevastianos Roussos se trouve en annexe VIII. Comme on peut le constater, T. harzianum se révèle être une souche prototrophe qui croît à des températures comprises entre 15 et 35 C, fortement halophile et capable d'utiliser différentes sources de carbone. Ce



microorganisme germe rapidement en présence de sucres facilement assimilable comme le glucose ou fructose; en présence d'inducteur (cellulose), il synthétise des cellulases dès le départ de l'incubation, préférentiellement lorsque le PH est inférieur à 5.

La souche étudiée, présente de bonnes caractéristiques de croissance et de production de cellulases dans un milieu solide contenant de la bagasse de canne comme unique source de carbone et d'énergie.

D'autres produits présentant un intérêt pour ce type de culture, sont les enzymes pectinolytiques qui sont utilisées dans les industries alimentaires pour l'extraction, la clarification et la stabilisation de jus de fruits de pommes, mangue et raisin.

En annexe IX se trouve une étude de marché, les techniques et une évaluation financière pour la production de ces enzymes par FS au Mexique. On peut remarquer que les importations de ce produit approchaient les 350,000.00 US dollars en 1985 et que l'opportunité commerciale réside dans la substitution totale d'un marché croissant de produit qui représente actuellement un volume de 80 kg<sup>^</sup> jour d'un produit ayant une activité de 1300 ul<sup>^</sup>g.

Les avantages qu'offrent la technique de production de ces enzymes par FS, sont détaillés et discutés dans l'annexe X. Avec la collaboration du Dr. Agustín Lopez Munguía de l'Université Nationale Autonome de Mexico et la QFB María del Refugio Trejo, une série d'études a été faite avec utilisation de supports fibreux. Les travaux se font suivant les techniques de FS et de culture submergée avec de la bagasse de canne, de la pectine citrique comme substrat inducteur, du saccharose comme source de carbone et d'énergie et des sels, ainsi qu'avec une souche d'A. niger, moyennement productive d'enzymes pectinolytiques.

La productivité est 5 fois supérieure dans le cas de la FS que dans le cas de culture submergée, avec l'avantage d'obtenir directement par FS des concentrés sans passer par toute une série d'étapes d'extraction. Néanmoins, la stabilité de ces enzymes n'est pas encore tout à fait satisfaisante, et pour cela, nous pensons effectuer des recherches pour améliorer sa stabilité et trouver de nouvelles souches hyperproductrices de pectinases.

#### 4.3. Discussion et conclusions

Pour pouvoir comprendre les phénomènes biologiques, trouver les conditions optimales d'opération et de procédés de transformation capables de générer des produits d'intérêt industriel, l'utilisation de "modèle" paraît indispensable pour l'étude physique, physiologique et biochimique des microorganismes et des substrats intervenant dans la FS. L'information obtenue avec ce type de système, indique qu'il est possible d'utiliser des concentrations de substrats très importantes sans rencontrer d'effets inhibiteurs, et que l'efficacité est bien supérieure à celle rencontrée dans les études préalables effectuées en fermentations solides suivant les procédés conventionnels. Il paraît alors possible de produire des métabolites commerciaux comme

des enzymes hydrolytiques ou des substrats pharmaceutiques, grace a l'application de ces types de culture.

Ces travaux ne sont pas encore terminés ils requièrent des souches ayant des caractéristiques meilleures que celles qui sont disponibles. Actuellement, nous pensons utiliser ces résultats à un niveau pilote, et étudier en détail, la factibilité économique de chaque produit. L'application immédiate de ces résultats pour le développement de nouveau produit à forte valeur ajoutée permettra d'ouvrir une nouvelle perspective économique et de nouvelles opportunités pour les procédés de FS développés dans ce projet.

## 5. DETOXIFICATION DE LA PULPE DE CAFE

### 5.1 Introduction

Ce nouveau volet d'application de la fermentation en milieu solide concerne la production de nouveaux aliments pour le bétail par d'toxification de la pulpe de café, résidu agro-industriel abondant en Amérique Centrale.

L'hypothèse de travail concerne la possibilité de réaliser une fermentation en milieu solide utilisant une souche de champignon filamenteux sélectionnée non pas pour sa capacité a synthétiser des protéines "de novo", mais d'attaquer spécifiquement une substance toxique présente dans un résidu agro-industriel, qui par ailleurs contient déjà des protéines en quantité importante, mais qui ne peuvent être utilisés significativement dans les rations animales du fait de la présence de cette même substance toxique.

Nous avons pris la pulpe de café comme modèle pour expérimenté la validité de cette hypothèse, en raison de l'abondance de ce résidu dans cette région d'Amérique Centrale.

Cependant, si l'hypothèse peut être vérifiée, le processus pourrait être appliqué a d'autres résidus agro-industriels, comme les tourteaux de coton contenant du gossypol, ou à des produits végétaux susceptibles d'être ensuite introduit en alimentation animale ou humaine ( graines de soja, haricots...)

Nous présentons ici uniquement la première étape du travail qui correspond à la phase exploratoire et méthodologique. Les résultats seront présentés lors du prochain rapport semestriel.

### 5.2 Résultats

Une étude portant sur la détoxification du café a été initiée lors du présent semestre. Les résultats seront présentés conjointement par l'ORSTOM et la UAM I lors du prochain semestre à venir. Le plan de travail complet de cette étude est présenté en annexe XII' nous présentons ici de façon préliminaire les aspects généraux de la production et de l'industrialisation du café dans le monde, de l'Amérique latine et du Mexique, ainsi qu'une étude bibliographique sur la détoxification de la pulpe de café . Nous présentons également une série d'enquêtes réalisées par S. Roussos dans les zones de production de café au Mexique. Une enquête sur le café au Costa Rica avec qui nous avons établi une collaboration. Ces enquêtes visaient a :

A. connaître les conditions de production et le fonctionnement des "beneficio" pour le café au Mexique.

B. connaître les différents niveaux d'industrialisation et tirer parti ? in situ? des sous produits générés

C. d'améliorer génétiquement les différentes variétés de café utilisées

D. de cibler les opportunités de transformation biotechnologique dans le secteur agroalimentaire

E. de collecter des échantillons de terre pour isoler des microorganismes pouvant permettre la détoxification de la pulpe de café.

Pendant ces visites, des contacts ont été établis avec différents fonctionnaires de l'Institut Mexicain du Café ( IMECAFE ) et du secteur local de production, qui ont facilité le tournage d'un film en caméra vidéo 8 mm, contenant les étapes de culture et de transformation du café dans les différentes régions visitées. Nous avons par ailleurs collecté 36 échantillons de grains de café, de feuilles et de pulpe, et nous avons commencé un travail exhaustif de sélection et d'isolement de microorganismes capables de dégrader la caféine. Pour le moment, quelques 180 souches de champignons filamenteux présentent cette caractéristique. Ces travaux sur le terrain ont débuté en décembre 1986 et vont se prolonger ce semestre.

### 5.3 Discussion et conclusions

L'analyse bibliographique a confirmé la possibilité de rencontrer assez facilement des souches de champignons filamenteux capable de dégrader assez rapidement et spécifiquement la caféine qui peut être utilisée comme source d'azote. De même nous avons trouvé une méthode spectrophotométrique très simple qui permet de doser la caféine et de suivre simplement la cinétique de sa dégradation dans des milieux de culture à base d'extrait de café.

Après les enquêtes de terrain, nous avons une idée plus précise des problèmes de culture du café comme la sélection et la plantation de grains, la préparation de la terre, les méthodes de protection des plants et de la problématique de la rouille (champignon phytopathogène qui attaque les feuilles de café). D'autre part, il est apparu que l'agriculture et l'industrie agroalimentaire dans l'état de Veracruz présentait un degré d'avancement technologique suffisant pour permettre l'industrialisation du café et la mise en valeur des résidus, alors que l'état du Chiapas était plus spécialisé dans la culture du café.

Au Costa Rica, une entreprise valorise une faible portion de la pulpe de café par un traitement simple et un séchage' le produit est commercialisé pour l'alimentation animale. Au Mexique, l'INIREB valorise la pulpe de café comme substrat de croissance de champignons comestibles qui sont commercialisés.

Finalement, les souches collectées dans l'état de Veracruz, permettront d'obtenir un nombre suffisant de souches de champignons filamenteux, capables de croître sur pulpe de café. Il sera nécessaire d'élaborer une stratégie en laboratoire pour sélectionner les souches utilisables.

## 6. FORMATION ET PUBLICATIONS

Depuis l'édition du dernier rapport, la production académique du groupe de travail de l'ORSTOM / UAM peut se résumer en 3 points:

### a) Formation de personnels

4 thèses de licence ont été commencées et 4 autres ont été achevées (dont 2 pour l'Université de Veracruz).

2 thèses de maîtrise ont été commencées, une pour l'UAM et l'autre pour l'Université "Iberoamericana". Une thèse de maîtrise a été obtenue en génie chimique. De plus une thèse de doctorat est en cours d'élaboration, réalisée dans les laboratoires de la UAM pour l'Université de Toulouse (France).

Un coopérant de l'Université Technique de Compiègne réalise actuellement ses études de DEA (diplôme d'études approfondies) à Mexico, et une étudiante de la même Université effectue un stage de six mois.

### b) Coopération avec d'autres groupes de travail

Des relations ont été établies avec différents groupes de travail au Mexique. Avec l'Institut Technologique de Veracruz, par l'intermédiaire du Dr. Luis David Patino : échange de souches et de résultats de la fermentation de manioc en culture submergée ; avec le centre de fixation d'azote de la UAM, par l'intermédiaire du Dr. Carlos Huitron : échange de souches de champignons filamenteux et développement d'études physiologiques de spores.

Avec le gouvernement cubain, des relations scientifiques et techniques ont été établies et ont donné de bons résultats. Nous avons accueilli à la UAM deux chercheurs de l'Institut Cubain de Recherche sur la canne à sucre (ICIDCA) pendant 3 mois et nous pensons envoyer au moins deux chercheurs mexicains durant le prochain semestre à l'ICIDCA.

Un chercheur français a réalisé une mission de 3 semaines en Centre National de Recherches Scientifiques (CEMIS) et attendons celle d'un autre chercheur cubain du même Institut à la UAM.

### c) Travaux de recherche

5 articles ont été envoyés pour publication à des revues scientifiques mexicaines et étrangères, 29 autres ont été destinés à des congrès spécialisés 7 conférences et cours ont été présentés et nous avons déposé par l'ORSTOM une demande de brevet franco-mexicaine au bureau français des Brevets (ANVAR).

Les sujets des travaux mentionnés sont détaillés en annexe XIV.

## 7. CONCLUSIONS GENERALES

7.1. Les travaux concernant l'enrichissement protéique du manioc sont pratiquement terminés. Les études préliminaires de factibilité de ce procédé biotechnologique indiquent qu'il est techniquement possible d'enrichir en protéines la farine de manioc au niveau pilote (10 - 25 kg), mais que d'un point de vue économique, ce procédé ne serait pas rentable à Mexico pour l'alimentation animale, et cela pour deux raisons : la faible digestibilité que l'on constate sur le produit obtenu et le coût global du procédé, il paraît difficile de concurrencer le marché des concentrés, vu le prix élevé du manioc et l'usage généralisé de grains à bas prix.

Cependant, pendant cette période de travail du projet, un procédé complet a été mis au point au niveau pilote, ce qui permettra de tester de nouvelles matières premières, de nouveaux microorganismes et de développer de nouveaux produits, sans modifications importantes de procédé global.

7.2. L'utilisation de supports fibreux comme auxiliaire de la FS, a ouvert un large champ de recherche basique et appliquée. Grâce aux travaux effectués, une nouvelle étape dans l'application des techniques de FS a été franchie ; principalement en ce qui concerne la production de nouvelles Enzymes hydrolytiques (pectinases) très utilisées dans l'industrie agroalimentaire, ou la production de cellulases intéressantes à brève échéance. En ce qui concerne la production d'autres produits par FS, encore plus intéressants pour l'industrie, comme les antibiotiques et autres métabolites secondaires, des études sont en cours au stade du laboratoire à un stade préliminaire de recherche. En ce qui concerne la production d'Enzymes pectinolytiques par FS sur support fibreux, nous avons sollicité l'appui financier de la CEE, pour un projet, de 3 ans (à partir de Septembre 1987) en collaboration avec l'ORSTOM.

7.3. Les études concernant la détoxification de la pulpe de café sont à un stade préliminaire. Les zones cafélières les plus industrialisées ont été sélectionnées, zones dans lesquelles il sera possible d'effectuer une valorisation biotechnologique des résidus agroindustriels.

D'autre part, une grande quantité d'échantillons a été collectée "in situ", sur lesquels ont été isolés un nombre considérable de microorganismes capables de dégrader la caféine. Pendant le prochain semestre, nous pensons sélectionner les champignons filamenteux les plus aptes à détoxifier la pulpe de café, définir les conditions d'opération les plus appropriées et finalement, d'exploiter les résultats, au pilote avec les installations disponibles.

F E R M E N T A D O R

P E T R I N I R C H A

MANUAL DEL USUARIO

Rúal López Ulibarri y Gilles Bacquet

Planta Piloto de Fermentaciones

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

M E X I C O

Julio 1986

# INDICE

|   | pagina |
|---|--------|
| PRECAUCION  | 1      |
| INTRODUCCION  | 2      |
| I. FERMENTADOR  | 3      |
| II. EQUIPO DE CONTROL AUTOMATICO                            | 5      |
| II.1 Unidad de alimentación general de aire comprimido      | 5      |
| II.2 Unidad de electroválvulas                              | 6      |
| II.3 Unidad de la válvula automática                        | 6      |
| II.4 Unidad de regulación de temperatura con su programador | 6      |
| II.5 Unidad de pH   | 8      |
| II.6 Unidad del registrador                                 | 9      |
| II.7 Unidad de registro de peso                             | 9      |
| II.8 Bombas volumétricas                                    | 10     |
| III. OPERACION DEL EQUIPO                                   | 11     |
| III.1 Instalación y conexiones                              | 11     |
| III.1.1 Servicios requeridos                                | 11     |
| III.1.2 Colocación de los equipos                           | 11     |
| III.1.3 Alimentación y conexiones                           | 11     |
| III.1.4 Encendido de los equipos e instrumentos             | 13     |
| III.2 Operación   | 14     |
| III.2.1 Calibración general                                 | 14     |
| III.2.2 Gelatinización                                      | 15     |
| III.2.3 Fermentación  | 16     |
| III.3 Mantenimiento   | 17     |
| III.4 Ayuda   | 17     |
| III.4.1 Irregularidades                                     | 18     |
| III.4.2 Emergencias   | 19     |
| ANEXOS  | 20     |



\*\*\*\*\*  
\*  
\* P R E C A U C I O N \*  
\*  
\*\*\*\*\*

Se recomienda NO TRATAR DE OPERAR CUALQUIERA DE LOS EQUIPOS Y/O INSTRUMENTOS ANTES DE LEER COMPLETAMENTE EL PRESENTE MANUAL DEL USUARIO.

Una vez hecho esto, se recomienda identificar cada una de las partes que se señalan en la descripción del equipo CON LA AYUDA DEL MANUAL.

Se recomienda NO ABRIR LOS PANELES DE CONTROL CUANDO EL EQUIPO ESTA ENCENDIDO.

ES NECESARIO EVITAR DESCARGAS DE CORRIENTE ESTATICA A LOS CIRCUITOS ELECTRONICOS, lo que se logra tocando antes el soporte interno de los paneles.

Cuando se ve a operar el equipo (una vez instalado sección III) verificar que TODOS LOS EQUIPOS E INSTRUMENTOS ESTEN CORRECTAMENTE CONECTADOS Y ALIMENTADOS (corriente eléctrica y aire comprimido).

En caso que se requieran mayores especificaciones técnicas de los instrumentos y equipos, se recomienda CONSULTAR LOS ANEXOS TECNICOS ESPECIFICOS.

## INTRODUCCION

El presente manual es un documento técnico de un equipo piloto para fermentaciones en medio sólido construido en Francia por el Instituto Nacional de Investigación en Química Aplicada (IRCHA).

El equipo consta de tres partes principales: el fermentador, el equipo de control automático y los periféricos (fotografía 1).

El fermentador consiste en una olla de tipo amasadora de harina, con doble fondo con perforaciones y un brazo agitador adentro (Sección I).

El equipo de control automático se divide en tres paneles: panel de control general, panel de registro y panel de aeración (Sección II).

Finalmente los equipos periféricos consisten en: 2 bombas volumétricas y una balanza con registrador digital (Sección II).

En la tercera sección del manual se describen los servicios requeridos y las instrucciones de instalación y operación, detallándose los datos de funcionamiento de cada equipo.

Para ampliar las especificaciones técnicas específicas respecto a los instrumentos y equipos, se cuenta con algunos anexos proporcionados por los fabricantes, de esta manera, se presentan anexos para:

- la báscula de 600 Kg de capacidad,
- las bombas volumétricas,
- circuitos eléctricos del sistema de control general,
- el sistema del programador de operaciones,
- el controlador de temperatura y
- el registrador potenciométrico.

## I. FERMENTADOR (fotografías 1 y 2)

El fermentador consta de una olla tipo amasadora de harina con doble fondo y perforaciones para aeración y de un brazo agitador. Tiene dos motores, uno para el agitador y otro para la rotación de la olla, ambos con velocidad variable. Su tablero de control posee:

- interruptor principal de encendido-apagado,
- interruptores independientes tanto de encendido como de apagado para cada motor,
- botón para control manual o automático,
- interruptor de emergencia y luz indicadora de alimentación.

El tablero está protegido contra las sobrecargas eléctricas por medio de 2 fusibles térmicos de 6 y 22 amperes de capacidad.

Para realizar el control automático del fermentador, es necesario conectar el cable del tablero al equipo de control descrito en la sección II y poner el botón correspondiente en "AUTO" (ver sección III).

El equipo está soportado en una estructura móvil con ruedas que permite desplazarlo y también posee un dispositivo que facilita depositarlo sobre la balanza girando una manivela. El fermentador tiene una tapa móvil dividida en dos partes: una de protección del brazo agitador y otra con varillas desmontables que sirven de soporte para los sensores de temperatura y pH y para el aspersor.

La olla, para facilitar su descarga y limpieza, tiene la capacidad de levantarse verticalmente (Figura 1), para lo cual se requiere seguir los siguientes pasos:

- abrir el seguro del brazo agitador (a) girando el tornillo de bloqueo (b) y desplazando el tornillo de seguridad (c);
- levantar la tapa del fermentador (d) aprox. 90 grados;
- levantar el brazo agitador (e) aprox. 90 grados;
- girar la palanca del seguro de la olla (f) liberándola;

- quitar la barra de conducción y protección del equipo (g) y
- levantar la olla haciéndola girar hacia el lugar donde se coloca la barra de conducción.

En ésta posición es posible tener acceso al motor de la olla y al sistema de admisión de aire-vapor, el cual consiste en una abrazadera hexagonal que en su interior posee dos empaques cónicos que la hacen hermética.

## II. EQUIPO DE CONTROL AUTOMATICO. (fotografía 3)

El equipo de control esta constituido por 6 elementos principales que rigen la totalidad de las operaciones:

- 1 - unidad de alimentación general de aire comprimido;
- 2 - unidad de electroválvulas que distribuye los flujos de aire comprimido según las necesidades y la aereación básica;
- 3 - unidad de regulación de la válvula de aire en función del tiempo;
- 4 - unidad de regulación de temperatura y programador de operaciones;
- 5 - unidad de lectura de pH;
- 6 - unidad del registrador gráfico.

Además, se encuentran los equipos periféricos siguientes:

- 7 - balanza de 600 Kg de capacidad con registrador digital;
- 8 - 2 bombas volumétricas.

### II.1 - UNIDAD DE ALIMENTACION GENERAL DE AIRE COMPRIMIDO (fotografías 6 y 7)

Esta unidad recibe una alimentación de aire comprimido y por medio de 2 manómetros en serie se distribuye con una presión de,

- 4 bares para destapar orificios de aeración
- 2 a 3 bares para la aeración
- el elevador del sensor de pH
- el aspersor de agua

(se recomienda alimentar esta unidad con aire comprimido a 6 bares)



## FUNCIONAMIENTO DEL PROGRAMADOR

El conjunto de las operaciones esta determinado por el programador cuyos discos No.1 y No.2 corresponden a las posiciones de espera entre cada ciclo y durante la agitación, respectivamente. (Figura 3)

El disco No.1 conecta el reloj del tiempo de espera programado entre cada ciclo de agitación. Después de este tiempo el programador se activa y al girar pone en marcha las operaciones siguientes:

- registro en memoria del nivel actual del pH (para decidir la adición de álcali);
- apertura de la válvula de aire del circuito del aspersor;
- elevación del sensor de pH y
- se coloca en posición de espera No 2 y se detiene.

En esta posición se activa el reloj del tiempo de agitación durante lo cual el equipo realiza las operaciones siguientes:

- activar motores de agitación (brazo agitador y olla) y el motor de registro del tiempo de agitación (resistencia);
- apertura de la válvula de aire al fermentador;
- activar bomba de agua en el sistema del aspersor y
- activar bomba de álcali si el pH es inferior a la referencia.

Al final del tiempo de agitación, el programador se activa nuevamente y realiza las siguientes acciones:

- desconectar motores (brazo agitador, olla y registrador del tiempo de agitación);
- desconectar bombas (agua y álcali);
- desconectar la apertura de la válvula de aire al fermentador;
- bajar el sensor de pH a la masa;
- cerrar válvula de aire del circuito del aspersor;

- activar registro de pH;
- cerrar válvula del circuito de aire al rotámetro;
- descarga de aire a presión máxima al fermentador para destapar los orificios de aeración (5 segundos);
- reestablecer nivel de aeración normal, con lectura de gasto en el rotámetro y
- el programador se coloca en la posición de espera inicial.

Cuando la temperatura de la masa es superior a la de referencia, el controlador de temperatura rompe el ciclo de espera normal y el programador inicia un ciclo de agitación hasta llegar a la posición de espera No.2; se mantiene así hasta lograr una temperatura inferior a la de referencia. En ese momento se completa el ciclo descrito.

El tiempo mínimo de espera entre dos ciclos completos es de 1 minuto (duración de una vuelta del programador).

#### II.5 - UNIDAD DE PH (fotografía 5)

Este equipo consta de un potenciómetro y un regulador con indicador de cuarzo líquido conectado al canal 3 del registrador gráfico. Al frente presenta los controles que permite su calibración y seleccionar el pH de referencia los cuales se señalan en la figura 4.

El control de pH es de tipo todo/nada (Figura 5) y actúa sobre una bomba volumétrica que adiciona una solución alcalina al circuito de espreado durante el ciclo de agitación, cuando la lectura registrada es inferior al nivel de referencia. Esto último se hace necesario en el caso que se requiera controlar el pH de forma artificial, aunque se recomienda utilizar amortiguadores biológicos en el medio de cultivo (como urea).

NOTA: el electrodo de pH requiere una solución 1.0 molar de KCl.



**\*\* PARA MAYOR INFORMACION CONSULTAR EL ANEXO ESPECIFICO \*\***

## II.6 - UNIDAD DEL REGISTRADOR (fotografía 3)

Este registrador gráfico realiza lecturas simultáneas de 6 canales diferentes y tiene una velocidad de avance del papel que permite relacionar la distancia recorrida con el tiempo. En su parte interna se localizan los controles de calibración para la escala, velocidad de avance del papel y velocidad de impresión de las plumillas. Las plumillas son intercambiables de forma sencilla al igual que el papel. Para detalles de operación o modificación consultar manual específico (JUMO Measure et regulation).

La especificación de los canales es la siguiente:

Canal 1: temperatura del producto (violeta)

Canal 2: ciclos de agitación (café)

Canal 3: pH (azul)

Canal 4: apertura de la válvula de aire  
(café rojizo)

Canal 5: temperatura No.2 (verde)

Canal 6: peso (negro)

**\*\* PARA MAYOR INFORMACION CONSULTAR EL ANEXO ESPECIFICO \*\***

## II.7 - UNIDAD DE REGISTRO DE PESO (fotografías 3 y 8)

Este equipo consta de una balanza con capacidad máxima de 600 Kg y un registrador digital que registra el peso total del fermentador. Al lado de la lectura digital se encuentran los controles para determinar: cero correcto, tara a cero, inmovilidad y teclas de prueba. La lectura digital del peso se reporta en el canal 6 del registrador en forma continua.

**\*\* PARA MAYOR INFORMACION CONSULTAR EL ANEXO ESPECIFICO \*\***

## II.8 - BOMBAS VOLUMÉTRICAS

Son bombas ajustables en volumen unitario y en frecuencia de pulsación. Se calibran al inicio de cada experimento para que operen a un gasto determinado, tanto para adicionar agua o álcali según los requerimientos específicos. El rango de operación varía desde 0.02 hasta 2.8 ml/min.

- \*\* SE RECOMIENDA EVITAR PRENDER Y APAGAR DEMASIADO \*\*
- \*\* LAS BOMBAS PARA NO DAÑAR SUS CIRCUITOS ELECTRONICOS \*\*
- \*\* PARA MAYOR INFORMACION CONSULTAR EL ANEXO ESPECIFICO \*\*

### III. OPERACION DEL EQUIPO

#### III.1 INSTALACION Y CONEXIONES

##### III.1.1 Servicios requeridos

Instalación eléctrica : 110 volts 60 Hertz monofásica (positivo y neutro) y con tierra física ( ± 10% de tolerancia)

Aire comprimido : de compresora con filtro de aire, presión mínima de 4 bars.

Vapor : de caldera con regulador, presión requerida = 0.5 Kg/cm<sup>2</sup>.

##### III.1.2 Colocación de los equipos (fotografía 1)

Se recomienda colocar los equipos con sus periféricos de la forma señalada en la fotografía citada.

##### III.1.3 Alimentación y conexiones (fotografías 4, 5 y 6)

El fermentador puede funcionar tanto manualmente como de manera completamente automatizada. Por esta razón casi la totalidad de las conexiones salen o pasan a través del equipo de control.

Las conexiones se realizan por la parte trasera del equipo.

Por este propósito, es necesario retirar las tapas traseras del rack para tener acceso a las conexiones de cada panel.

Los paneles son movibles independientemente por medio de un soporte con ruedas que permite sacarlos por el frente y tener acceso al interior de cada uno.

Al panel de control general, panel superior (fotografía 4), se conectan (de izquierda a derecha):

- el cable de control del tablero del fermentador (motores);

- salida del cable al panel de registro gráfico;
- salida de los cables al panel de aeración;
- entrada del cable del sensor de temperatura 2 (opcional);
- entrada del cable del sensor de temperatura del fermentador y
- fusible (1.5 Amp.).

Al panel de registro y lectura de pH, panel central (fotografía 5), se conectan (de izquierda a derecha):

- entrada del cable del registrador de la balanza;
- entrada del cable del sensor de pH;
- salida del cable de control de la bomba de agua;
- salida del cable de control de la bomba de álcali y
- salida analógica a interfase (ADALAB).

Al panel de aeración, panel inferior (fotografía 6), se conectan (de izquierda a derecha):

- entrada de la manguera de alimentación general de aire comprimido (6 bares);
- salida de la manguera al rotámetro;
- entrada de la manguera del rotámetro;
- salida de la manguera para elevación del sensor de pH;
- salida de la manguera para descenso del sensor de pH;
- salida de la manguera para el aspersor y
- salida de la manguera para aeración del fermentador.

Para completar la instalación del equipo, se necesita:

- conectar la manguera de entrada de aire al fermentador;
- conectar las mangueras de entrada de aire al elevador del sensor de pH (inferior: elevar, superior: bajar);
- unir las mangueras de las salidas de las bombas y la entrada de aire al aspersor y conectar este circuito al aspersor (Figura 6);
- conectar el cable de la balanza al enregiistrador digital y
- verificar la alimentación del fluido respectivo de las bombas en tanques de 10 litros mínimo.

#### III.1.4 Encendido de los equipos e instrumentos.

Para encender los equipos e instrumentos del fermentador se requiere realizar las conexiones y alimentación referidas en la sección anterior (sección III.1.3), VERIFICAR que el tablero de control del fermentador esté colocado en posición "MANUAL" y su perilla de encendido (color negro) se encuentre en posición "0", VERIFICAR que IODOS los contactos de control estén colocados en posición "CERO" y conectar TODAS las unidades que requieran energía eléctrica (que son todas, excepto el panel de aeración).

En el caso del tablero del fermentador, para encender el equipo, la perilla de encendido se coloca en posición "1" girandola en el sentido de las manecillas del reloj y la luz del indicador de encendido "EN SERVICE" se encenderá indicando que esta alimentado. El botón de paro de emergencia (color rojo) debe estar desconectado. Esto se verifica girandolo en el sentido del movimiento de las manecillas del reloj, si salta a una posición mas alejada del tablero significa que se encontraba enganchado en la posición de "encendido", si no es así se encontraba "desconectado".

Una vez realizadas las operaciones anteriores, los paneles de control y de registro se encienden colocando los contactos de encendido en posición "M" (de en marcha), que para el caso del primero se localiza en la parte inferior izquierda del panel de control, y los del panel de registro se localizan: el de registro y control de pH, en la parte superior del potenciómetro (zona central superior del panel) y el del registrador potenciométrico en la parte

superior del tablero de la carta de registro (Fotografía 3). Al hacerlo, se encenderán las luces indicadoras de encendido situadas junto a los interruptores.

### III.2 OPERACION

```
*****
*
* LA CARGA MINIMA DEL REACION SE DEFINE POR EL NIVEL DE SUSTRATO
* SECO NECESARIO PARA TOCAR LA PARTE INFERIOR DEL SENSOR DE
* TEMPERATURA Y LA MAXIMA SE DETERMINA CUANDO EL NIVEL DEL MISMO
* A LA HUMEDAD DE OPERACION, ALCANZA ENTRE 5 Y 10 CM. DEL DOMO.
*
*****
```

\*\*\*\*\*

#### III.2.1 Calibración general

a) Bombas: ajustar el gasto deseado para cada bomba (ver sección II.8).

b) pH: calibrar el potenciómetro con dos soluciones buffer, sumergiendo el sensor y el cable de tierra (negro) en estas. El primer buffer se ajusta girando el segundo tornillo de arriba a abajo del lado izquierdo (letra "E") y el segundo girando el tornillo abajo de éste (también letra "E") situados en el tablero del potenciómetro (panel central) - ver sección II.5 - . Para seleccionar el pH de referencia, inclinar la palanca superior a la derecha (posición "2oR") para visualizar la referencia actual señalada con un signo negativo y ajustar la nueva referencia girando el tornillo superior del lado derecho (hoyo "2"), manteniendo la palanca en dicha posición.

c) Válvula automática: fijar velocidad de apertura de la válvula automática de aeración según el gasto mínimo requerido y el tiempo total de fermentación (se recomienda calcular la apertura máxima con base en el tiempo total de fermentación, tomando en cuenta que la válvula se abre en cada ciclo de agitación; por ejemplo, usando como sustrato papa y como inóculo *A. niger*, para una fermentación que dura 30 horas se calcula un tiempo de apertura máxima de 3 horas -10 % aprox.- con una velocidad: lenta, y un nivel de pulsación de 6).

d) Aeración: ajustar la presión de alimentación del panel de aeración registrada en los manómetros de dicho panel y en el rotámetro. Las presiones requeridas son: entre 4 y 6 bares para la aeración general y entre 2 y 3 bares para la válvula automática, que se ajustan con las perillas colocadas en su parte inferior. El gasto de aire inicial en el fermentador se establece por medio de la perilla de "AIRE DE LATENCIA" y para leerlo en el rotámetro se debe abrir la válvula de la parte superior del mismo (color naranja). Una vez establecido el gasto inicial, se cierra la válvula del rotámetro y la válvula de apertura automática controla el gasto durante la fermentación.

e) Balanza: calibrar el peso en "cero correcto" con la balanza vacía (tolerancia  $\pm$  2 Kg.). Colocar el fermentador sobre la balanza y anotar el peso del mismo vacío (referencia). Si se prefiere se puede trabajar en peso relativo, tarando el equipo vacío.

f) Relojes: ajustar los tiempos deseados entre ciclos de agitación (lado izquierdo) y de duración de los mismos (lado derecho), en el panel superior, girando la carátula de los mismos y la escala de tiempo (6 seg, 60 seg, 60 min, 6 hr), en la parte inferior derecha de cada uno, con la llave especial para dicho propósito.

g) Temperatura: seleccionar la temperatura de referencia a la cual se desea que actúe el control automático presionando el botón del lado izquierdo del indicador digital de temperatura (panel superior) que señala la referencia actual. Mantenerlo presionado y fijar la nueva referencia girando la perilla del lado derecho del mismo.

h) Registro gráfico: el registrador gráfico realiza lecturas simultáneas de 6 canales diferentes y tiene una velocidad de avance del papel que permite relacionar la distancia recorrida con el tiempo, por lo que se necesita seleccionar la hora "cero" de lectura. Esto se logra abriendo la puerta de acrílico del registrador, retirando el soporte del papel y girando el eje inferior de éste hasta la posición deseada.

### III.2.2 Gelatinización

Esta operación se realice de manera manual utilizando la balanza y el equipo de control únicamente como indicador y registrador de peso y temperatura, para lo cual se requiere:

- colocar en la posición "MANUAL" el fermentador;

- colocar en posición "0 (CERO)" el programador en el panel de control;
- calibrar la balanza y anotar el peso de referencia;
- poner el sustrato seco en la olla;
- poner en marcha los motores de agitación;
- mezclar la solución de sales con el sustrato por medio del aspersor, usando las bombas manualmente (sin cable de control);
- conectar el vapor a la olla (presión 0.5 Kg/cm<sup>2</sup>);
- dejar subir la temperatura hasta la de gelatinización y mantenerla durante el tiempo necesario;
- desconectar el vapor, vaciar la olla y
- destapar los orificios del doble fondo.

```
*****  
*                                                                 *  
* PELIGRO: RETIRE EL SOPORTE Y EL SENSOR DE pH *  
* ANTES DE CONECTAR VAPOR A LA OLLA *  
*                                                                 *  
*****
```

### III.2.3 Fermentación

Para realizar una corrida de fermentación automatizada, se requiere ejecutar las operaciones de instalación y conexión ya mencionadas (sección III.1). Para la etapa de inoculación se realizan las 6 primeras operaciones señaladas en la sección anterior (gelatinización) utilizando el sustrato gelatinizado y el inóculo en solución en lugar de las sales. Al término de la adición del inóculo, se completa la humidificación del sustrato con agua (esta etapa funciona también para despejar el inóculo residual en el circuito).

Para iniciar el proceso de control automático se necesita:

- proporcionar las soluciones requeridas a las bombas;
- conectar las bombas al control automático (panel central);



- seleccionar los tiempos entre ciclos de agitación y duración de los mismos (panel superior);
- colocar la válvula automática de aeración en posición inicial (cerrada) y seleccionar la velocidad de apertura de la misma (panel superior);
- seleccionar la temperatura de referencia (panel superior);
- seleccionar la posición inicial del papel del registrador;
- seleccionar el pH de referencia (panel central);
- seleccionar el nivel mínimo de aeración (panel inferior);
- colocar en posición "AUTO" el tablero del fermentador, el programador y el motor de registro de ciclos de agitación ("Recopie cycle") y
- colocar en posición de apertura "0" la válvula automática de aeración y en posición "AUTO" su control.

### III.3 MANIENIMIENTO

Se recomienda cambiar el electrolito del sensor de pH cada 3 corridas y debe guardarse sumergido en agua destilada.

El fermentador debe lavarse con agua y jabón al final de cada experimento.

Es importante mantener la balanza en posición horizontal. **NUNCA** en posición vertical y descargarla cuando no se esté utilizando.

Se recomienda proteger al equipo en general de factores ambientales como altas temperaturas, polvo, agua, animales indeseables, etc.

### III.4 AYUDA

En algunos casos se pueden presentar problemas para operar el equipo, por lo que aquí se presentan algunos de los posibles problemas más comunes y las causas que lo pueden originar. Mediante el uso frecuente del equipo, el operario

se familiarizará con el funcionamiento correcto del mismo, provocando que las sugerencias que aparecen aquí resulten obvias.

#### III.4.1 Irregularidades.

En el caso de que en alguno de los equipos no encienda el botón indicador de encendido, se puede deber a que no está correctamente colocada la clavija de alimentación eléctrica o que no se ha colocado en posición "M" (o "I", en el caso del fermentador) el interruptor de encendido.

Si a pesar de haber verificado esto, el equipo de control no enciende, se puede deber posiblemente a que se haya quemado el fusible de protección, por lo que se recomienda revisarlo (se localiza en la parte posterior del panel superior).

Si cualquiera de los indicadores con que cuenta el equipo (temperatura, pH y peso) señala lecturas incoherentes, ceros o, incluso, no enciende, se debe probablemente a que no se encuentran correctamente conectados a los sensores correspondientes, por lo que se recomienda verificar dichas conexiones.

En caso de que en el panel de aeración no se registre presión en los manómetros, se puede deber a que las válvulas que se encuentran bajo los mismos se encuentren cerradas (ver sección III.2.1 inciso d). Si a pesar de verificarlas no existe presión en el sistema se puede deber a que no se encuentra alimentado con aire comprimido por lo que se debe verificar la conexión de alimentación general de aire comprimido (parte posterior del mismo panel) o en su defecto comprobar si existe aire comprimido en la línea de alimentación de compresor.

Si el peso registrado no varía adecuadamente al adicionar sustrato o cualquier materia al fermentador, se puede deber a que no está correctamente depositado sobre la balanza o por una defectuosa conexión del sensor.

Cuando el motor de agitación o el de rotación de la olla no responden al mando manual o automático de puesta en marcha Y SE ESCUCHA UN GOLPETEO DENTRO DE LA CAJA DEL TABLERO DE CONTROL DEL FERMENTADOR, ocurre que los elementos térmicos de protección del mismo rechazan la carga que se les está administrando y la consecuencia es que no arrancan los motores. Esto puede ocurrir de manera ordinaria al inicio de cada experimento. La solución que se propone, en primer término, es el de intentar DE FORMA MANUAL poner en marcha los motores presionando los botones de arranque (de hule, color negro) y de paro (de hule, color rojo) que se encuentran en la parte superior derecha de dicho tablero alternando uno y otro, para cada motor. De no lograr dicho

propósito, ABRIR CON CUIDADO la caja del tablero quitando el tornillo de seguridad que se localiza en la parte central del extremo izquierdo de éste y presionar el botón de marcha del motor que no encienda. De esta forma se tiene acceso a los elementos térmicos de protección (cajas negras de baquelita). PRECAUCION: \*\*\* RECUERDE QUE EL EQUIPO ESTA ALIMENTADO CON CORRIENTE ELECTRICA \*\*\*. Los botones rojos en la parte inferior de las cajas negras, dentro de la caja del tablero, se deben deslizar cada vez que oprima el botón de marcha. Localize la caja que rechaza la carga (la que produce el ruido al accionar el botón de marcha) y oprima UNICAMENTE el botón deslizante que se encuentra en la parte inferior de la caja. Repetir ésta operación tantas veces sea necesario hasta lograr que no sea rechazada la orden de marcha.

Si a pesar de esta operación el motor de rotación de la olla no enciende, (es el que mas probabilidades tiene de reaccionar así, sobre todo cuando se encuentra vacía la olla), se recomienda favorecer el movimiento de rotación (para romper la inercia) girando la olla en el sentido inverso del movimiento de las manecillas del reloj.

#### III.4.2 Emergencias

El caso mas común de emergencia que se puede presentar en la operación del equipo, es que la olla, el agitador, o el resto de las operaciones se pongan en funcionamiento (manual o automáticamente) cuando el resto del equipo no se encuentra dispuesto para operar propiamente (Por ejem. las mangueras estén mal colocadas o sin conectar, objetos extraños al equipo sobre la olla, etc.).

Para este tipo de casos la solución es desconectar lo mas rápido posible el equipo involucrado, que en el caso del tablero del fermentador se logra presionando el botón de paro de emergencia (color rojo) mencionado en la sección anterior (irregularidades) y para el caso del equipo de control se logra colocando en la posición "A" (de apagado) los interruptores de encendido.

Una vez apagado el equipo, se corrige el desperfecto y se reinicia el experimento.

Tabla 4. Cinética de fermentación en "Petrin" con papa

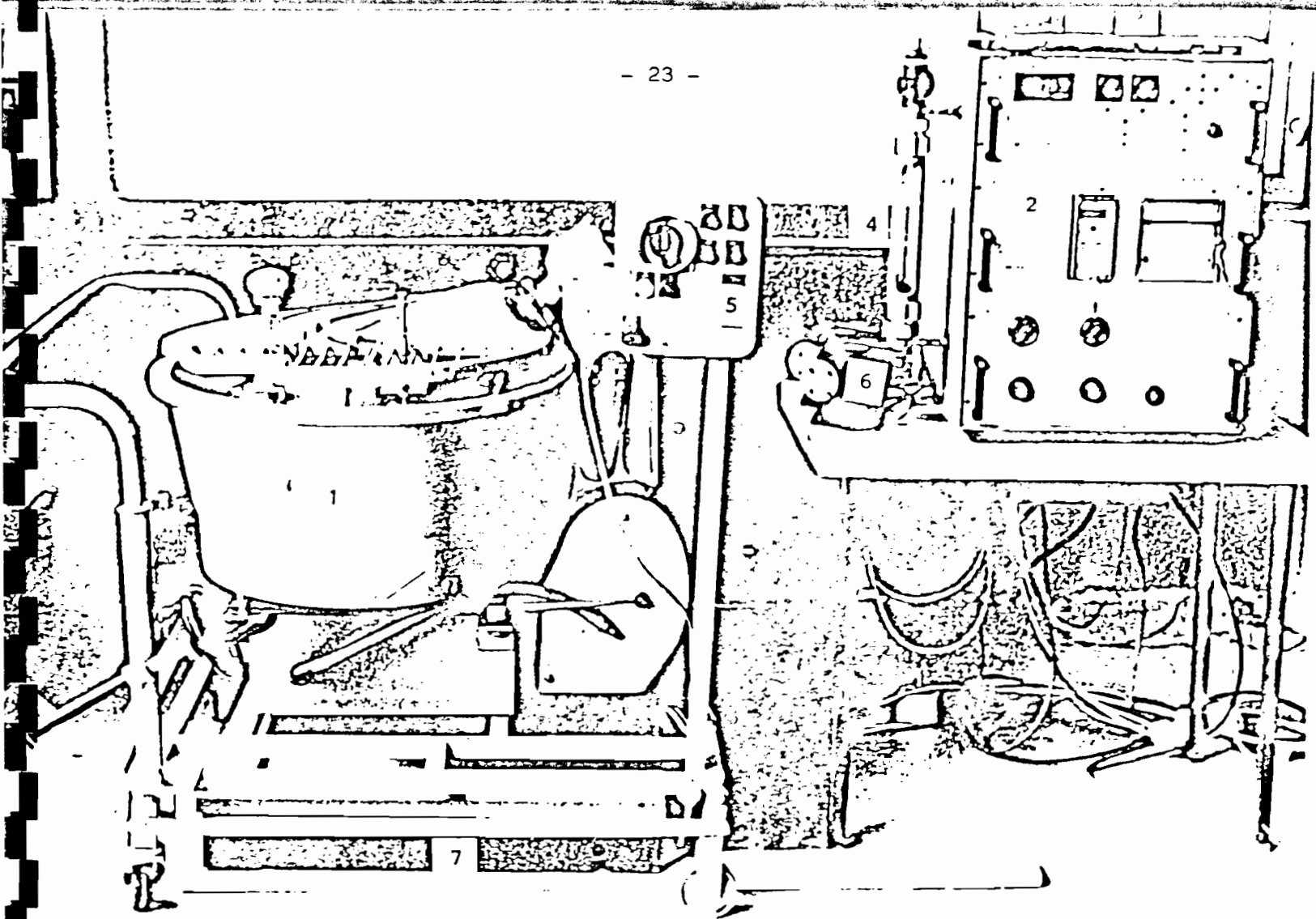
| Tiempo de incubación (horas) | pH    | Humedad (%) | Azúcares totales (%) | Proteínas (%) |
|------------------------------|-------|-------------|----------------------|---------------|
| 0                            | 4.05  | 56.16       | 79                   | 6.26          |
| 18                           | 4.1   | 55.32       | 92                   | 6.109         |
| 23                           | 3.95  | 56.2        | 98                   | 7.03          |
| 26                           | 4     | 56.42       | 78                   | 9.597         |
| 42                           | 4.275 | 58          | 67.15                | 16.24         |

Tabla 5. Cinética de fermentación de yuca en "Petrin"

| Tiempo de incubación (horas) | pH   | Humedad (%) | Azúcares totales (%) | Proteínas (%) |
|------------------------------|------|-------------|----------------------|---------------|
| 2                            | 5.3  | 41.96       | 90                   | 3.455         |
| 18                           | 5.55 | 41.07       | 96                   | 3.477         |
| 21                           | 5.55 | 42.01       | 97                   | 5.925         |
| 25                           | 5.45 | 41.59       | 96                   | 6.56          |

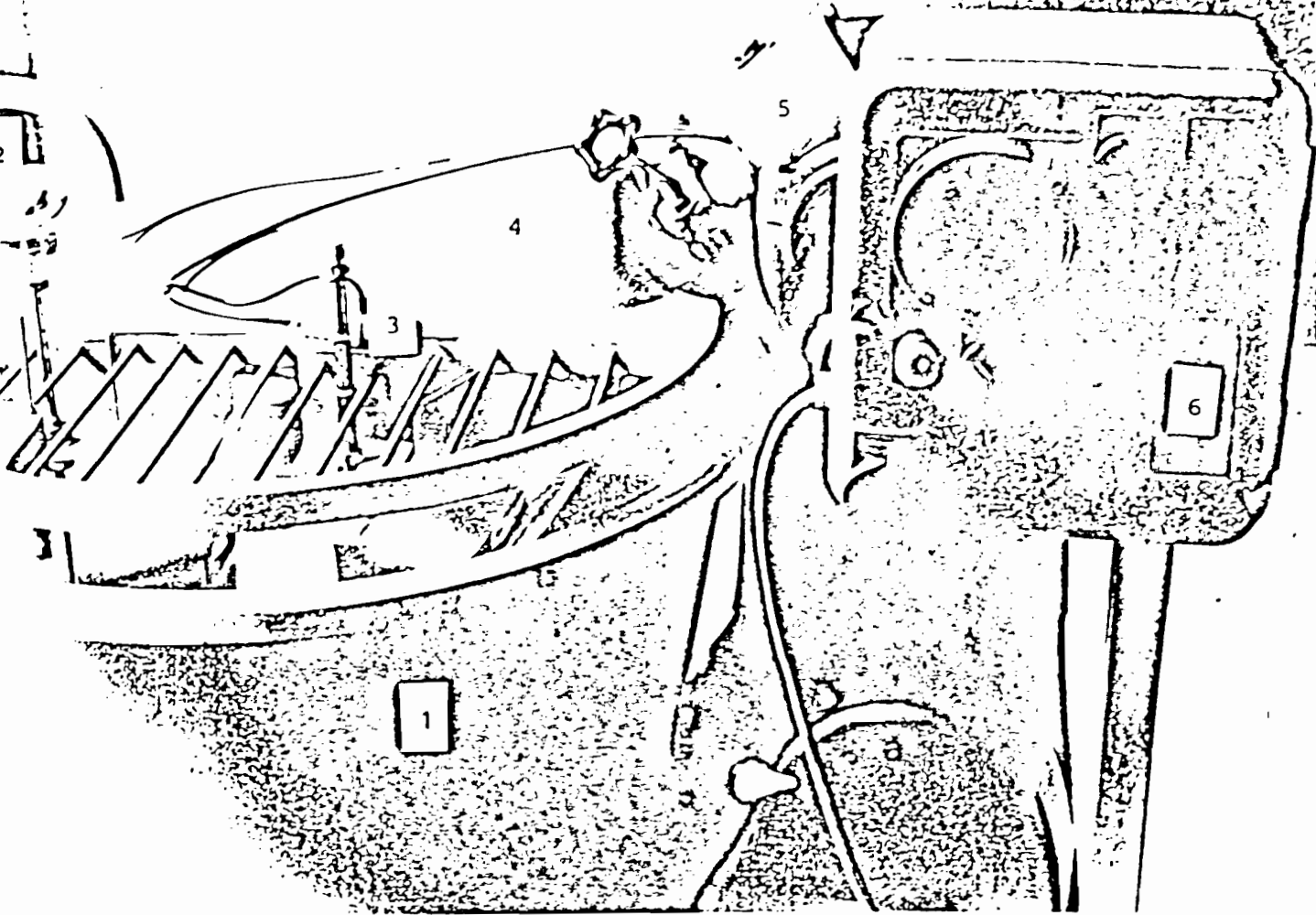
Tabla 6. Cinética de gelatinización en "Petrin"

| Tiempo de gelatin. (min.) | Presion vapor (Kg/cm <sup>2</sup> ) | Temperatura (C) | Humedad (%) | Grado de gelatin. (%) |
|---------------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| 0                         | 0.2                                 | 26.5            | 32.72       | 0                     |
| 45                        | 0.5                                 | 75              | 32.82       | 0                     |
| 55                        | 0.3                                 | 80              | 32.56       | 0                     |
| 60                        | 0.3                                 | 78.3            | 33.9        | 0                     |
| 65                        | 0.5                                 | 78.6            | 33.4        | 0                     |
| 70                        | 0.5                                 | 77.7            | 33.08       | 0                     |



FOTOGRAFIA 1: Fermentador " Petrin " con la unidad de control y los periféricos

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| 1- fermentador               | 5- tablero del fermentador |
| 2- equipo de control         | 6- bombas volumétricas     |
| 3- registrador de la balanza | 7- balanza                 |
| 4- rotámetro                 |                            |



FOTOGRAFIA 2: Detalle del fermentador

- |                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| 1- fermentador                        | 4- tapa           |
| 2- sensor de temperatura              | 5- brazo agitator |
| 3- soporte neumático del sensor de pH | 6- tablero        |



- 1- panel de aeración
- 2- unidad de lectura de pH
- 3- unidad de regulación de la válvula automática
- 4- controlador de temperatura
- 5- registrador gráfico
- 6- registrador de la balanza

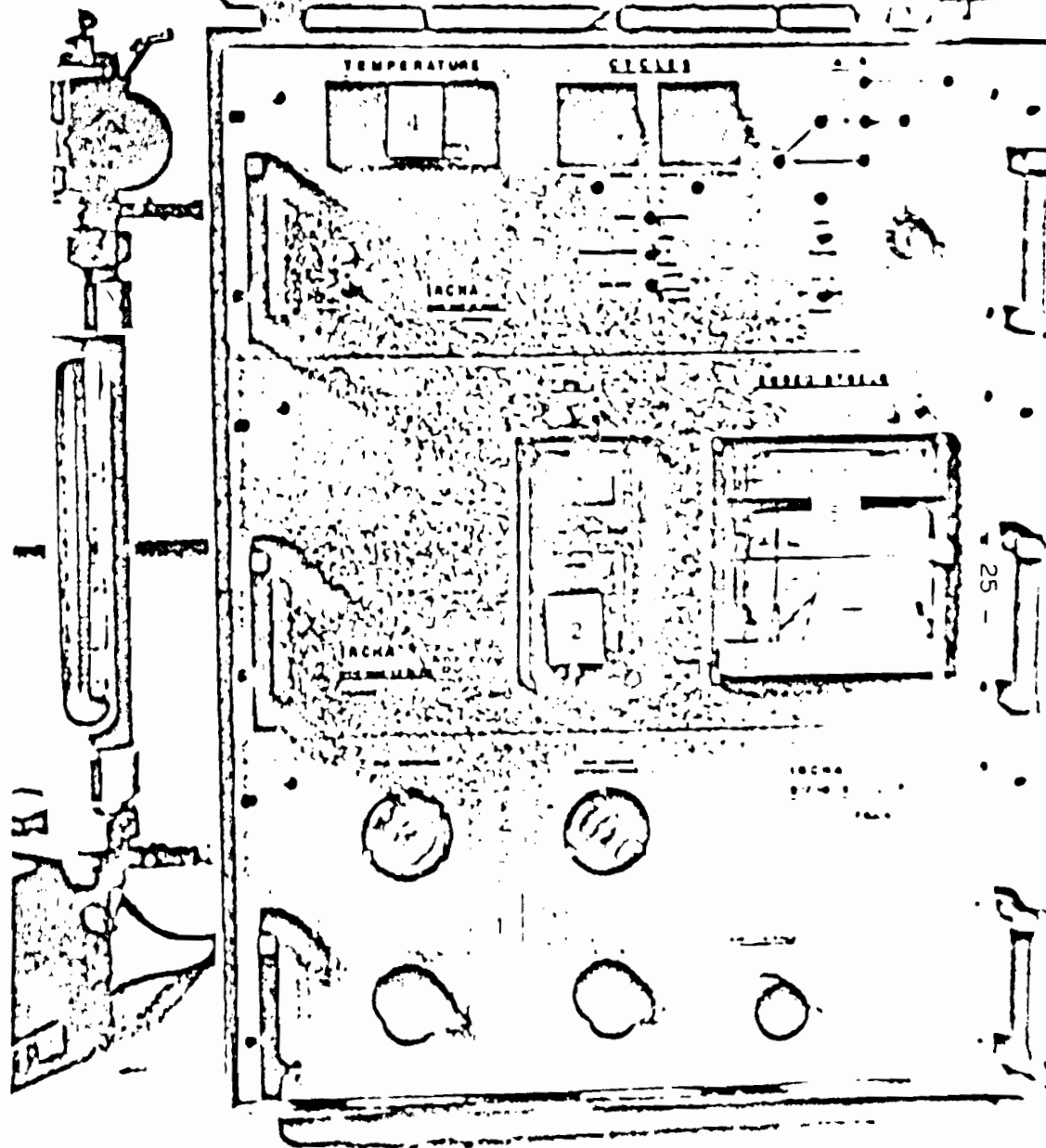
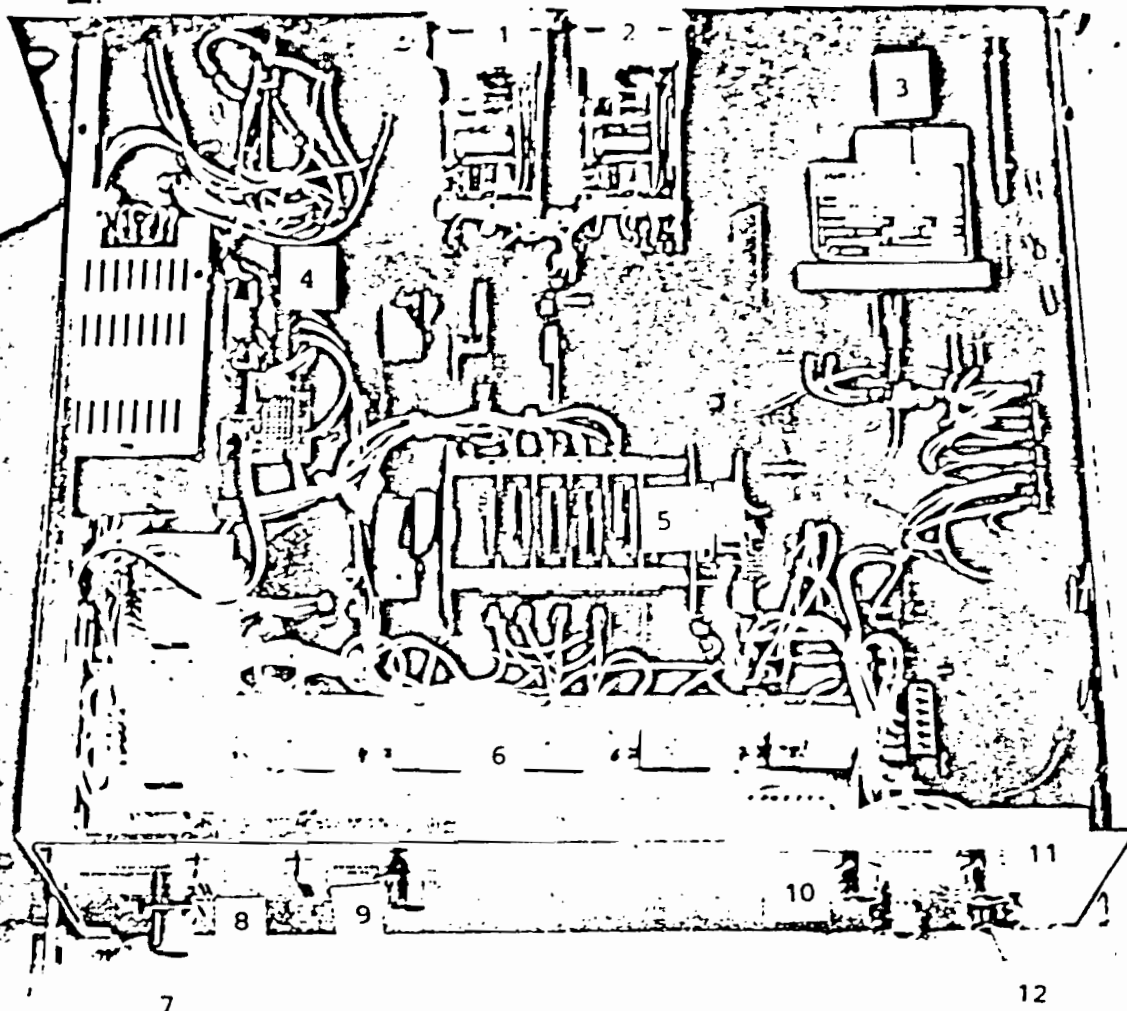


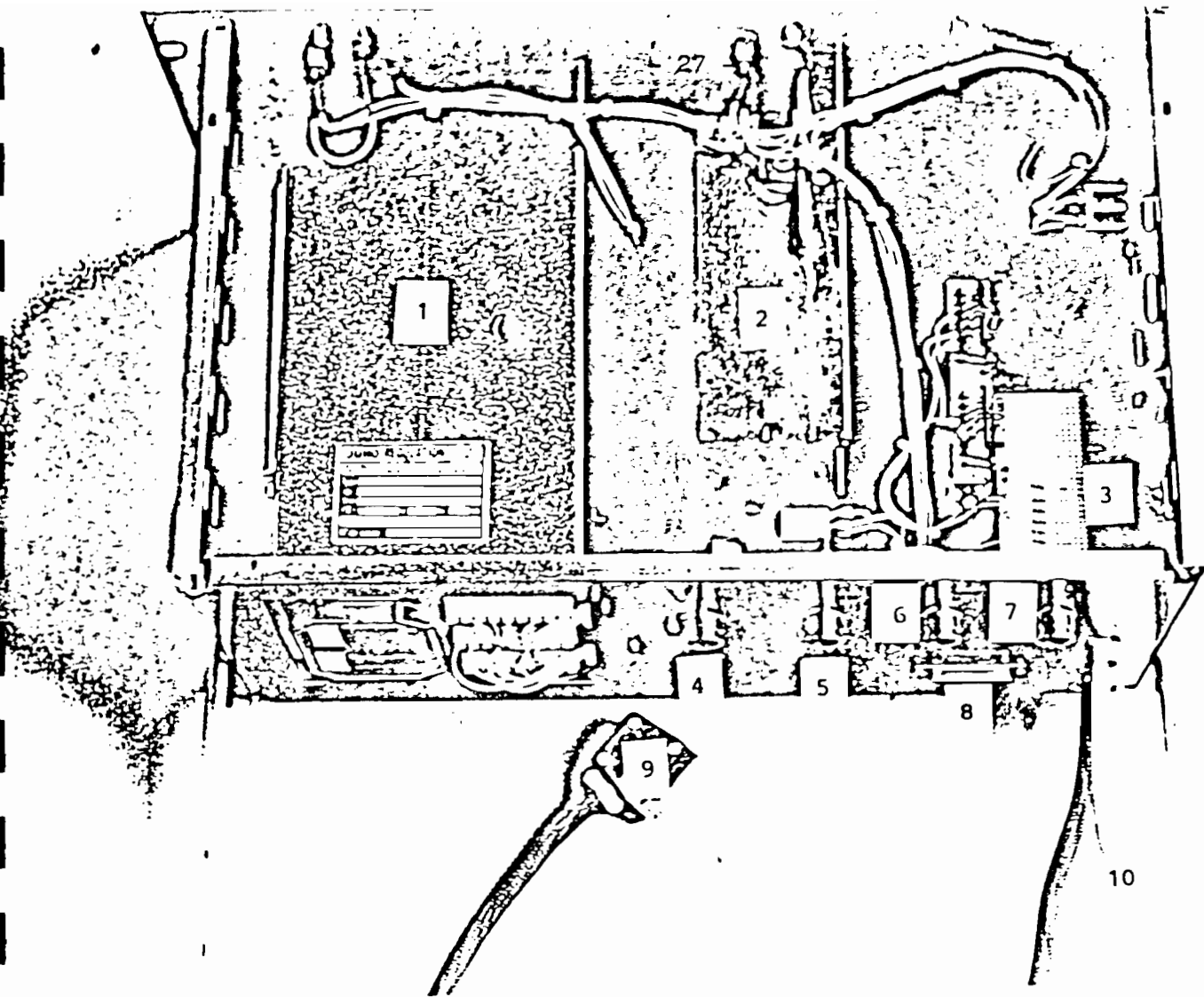
FIGURA 3: Equipo de control



FOTOGRAFIA 4: Panel de control general

(vista de arriba, posterior)

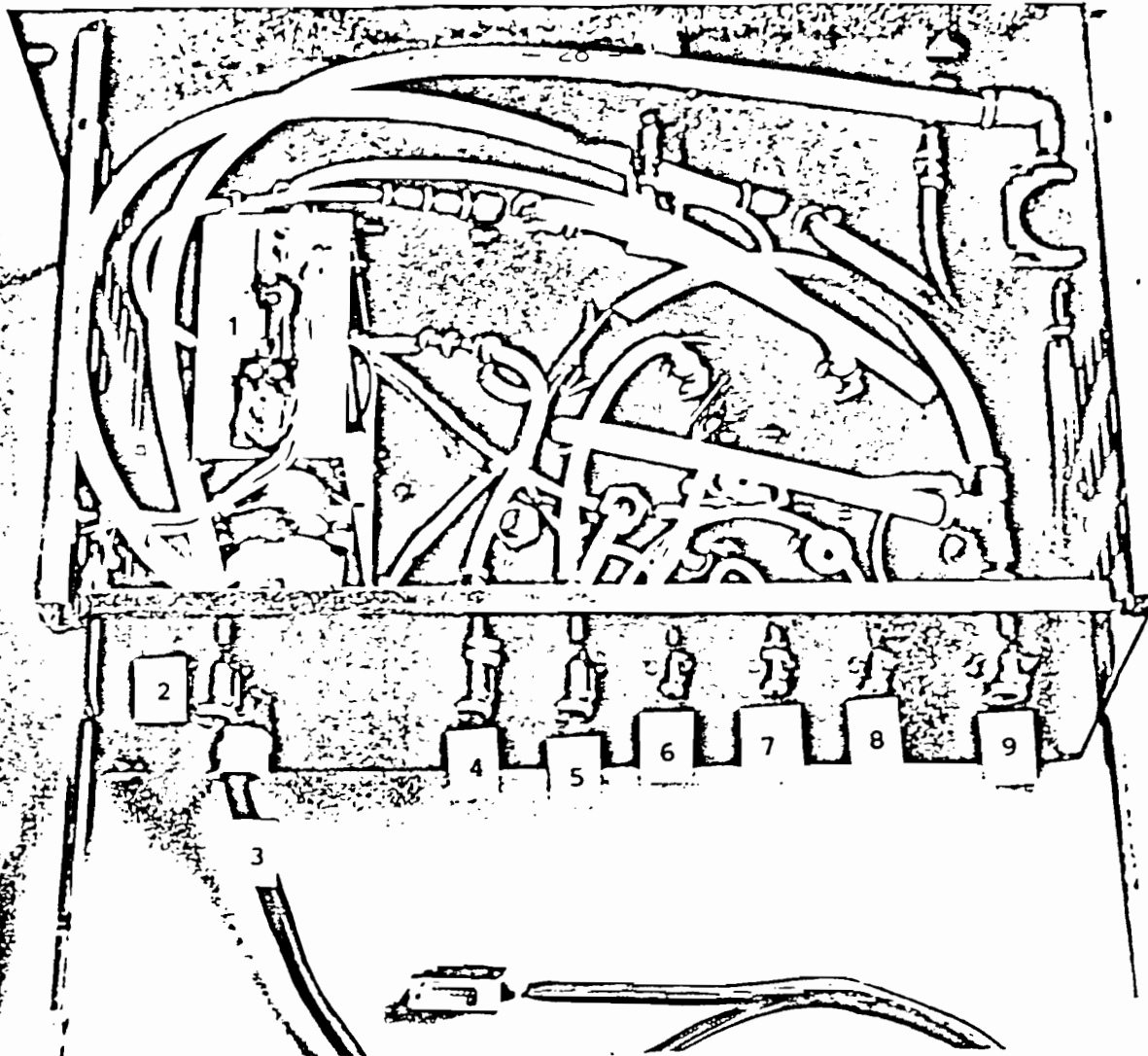
- 1- reloj de tiempo de agitación
- 2- reloj de tiempo de espera
- 3- controlador de temperatura
- 4- unidad de aeración automática
- 5- programador (con sus discos)
- 6- unidad de " relays "
- 7- entrada del cable de control del tablero del fermentador
- 8- salida del cable al registrador
- 9- salida de cables al panel de aeración
- 10- entrada del cable del sensor de temperatura nº 2
- 11- entrada del cable del sensor de temperatura del fermentador
- 12- cable de alimentación



FOTOGRAFIA 5: Panel de registro y de lectura de pH

(vista de arriba, posterior)

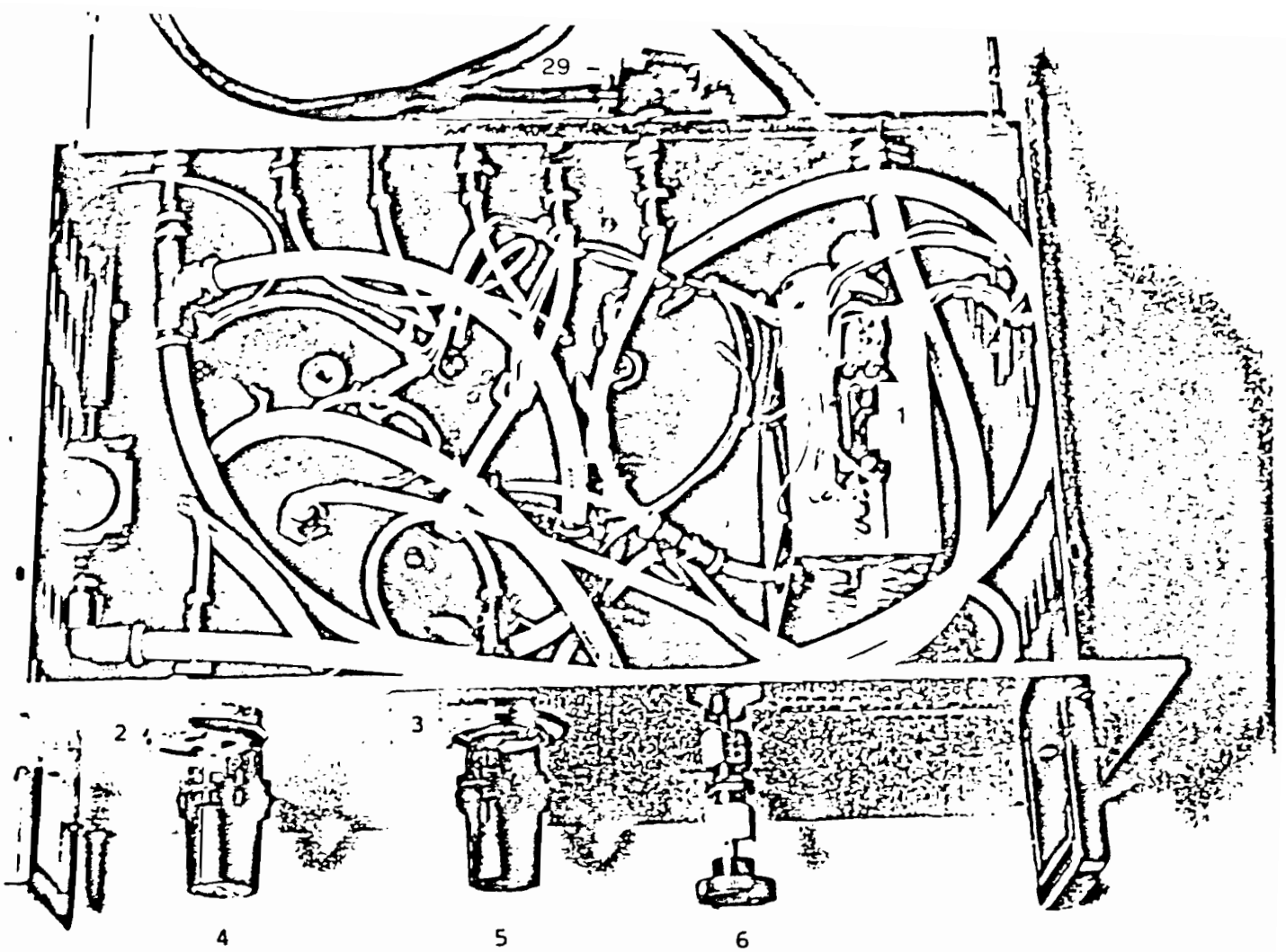
- 1- registrador gráfico
- 2- unidad de lectura y control de pH
- 3- tarjeta de conversión para 1ª interfase ADALAB
- 4- entrada del cable del registrador de la balanza
- 5- entrada del cable del sensor de pH
- 6- salida del cable de control de la bomba de agua
- 7- salida del cable de control de la bomba de alcali
- 8- salida del cable a la interfase ADALAB (analógica)
- 9- cable de entrada del panel de control
- 10- cable de alimentación



FOTOGRAFIA 6: Panel de aeración

(vista de arriba, posterior)

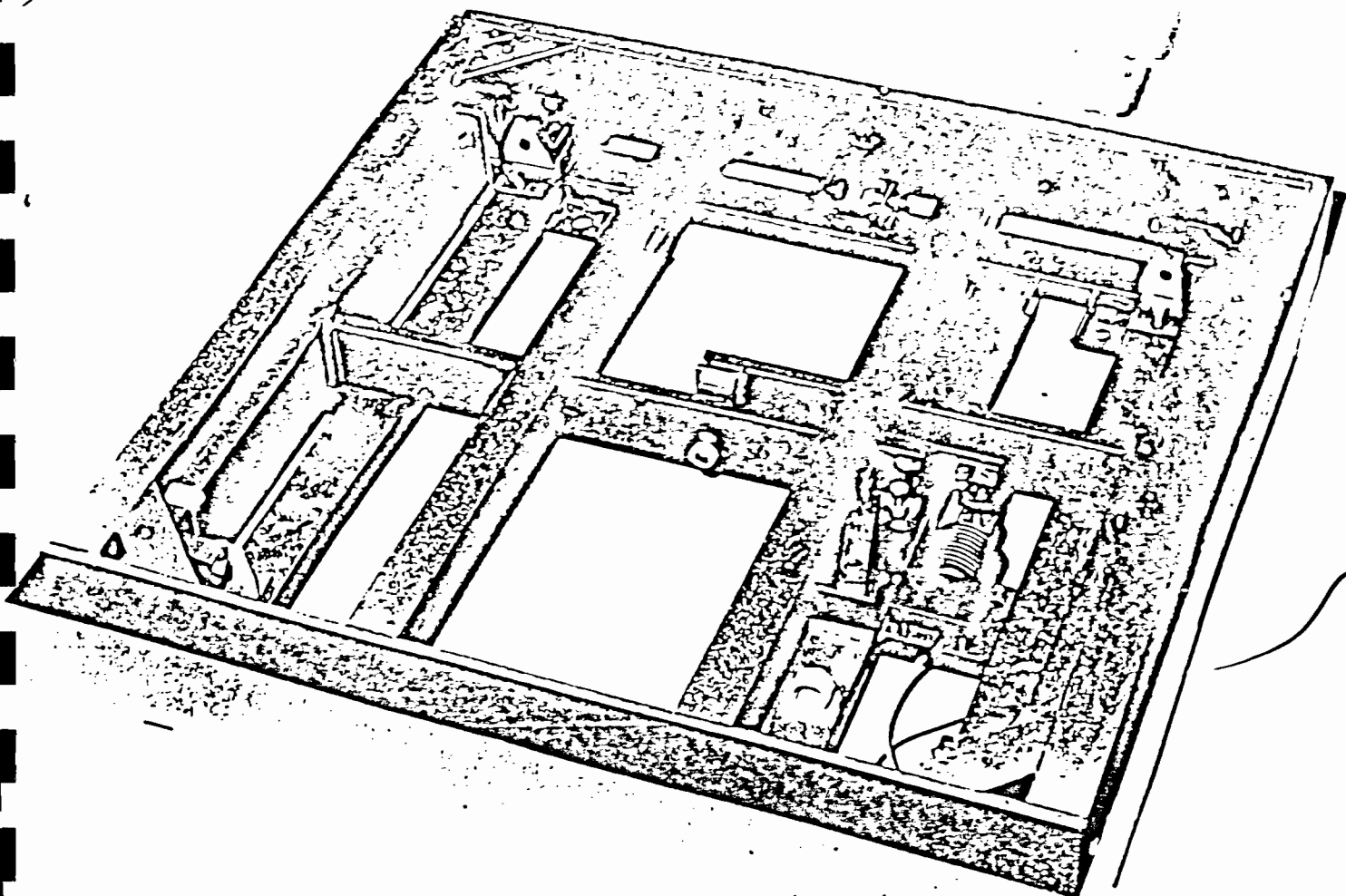
- 1- válvula automática de aeración
- 2- entrada de la manguera de aire comprimido
- 3- cable de control de la válvula automática
- 4- salida para la manguera al rotámetro
- 5- entrada para la manguera del rotámetro
- 6- salida para la manguera de elevación del sensor de pH
- 7- salida para la manguera de descenso del sensor de pH
- 8- salida para la manguera del aspersionador
- 9- salida para la manguera de aeración al fermentador



FOTOGRAFIA 7: Panel de aeración

(vista de arriba, frontal)

- 1- válvula automática de aeración
- 2- manómetro de aeración general
- 3- manómetro de la válvula automática
- 4- válvula de aeración general
- 5- válvula de alimentación al control automático de aeración
- 6- válvula de aeración inicial



FOTOGRAFIA 8: Balanza sin tapa

(vista superior)

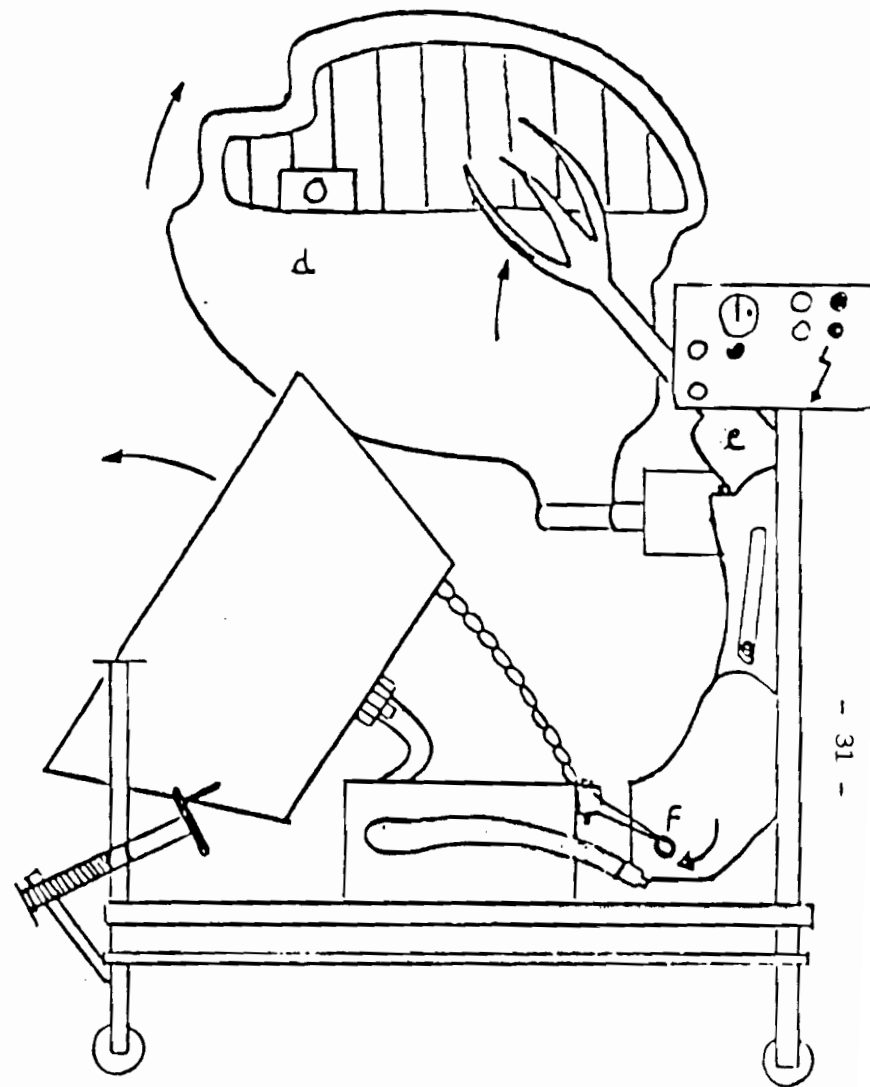
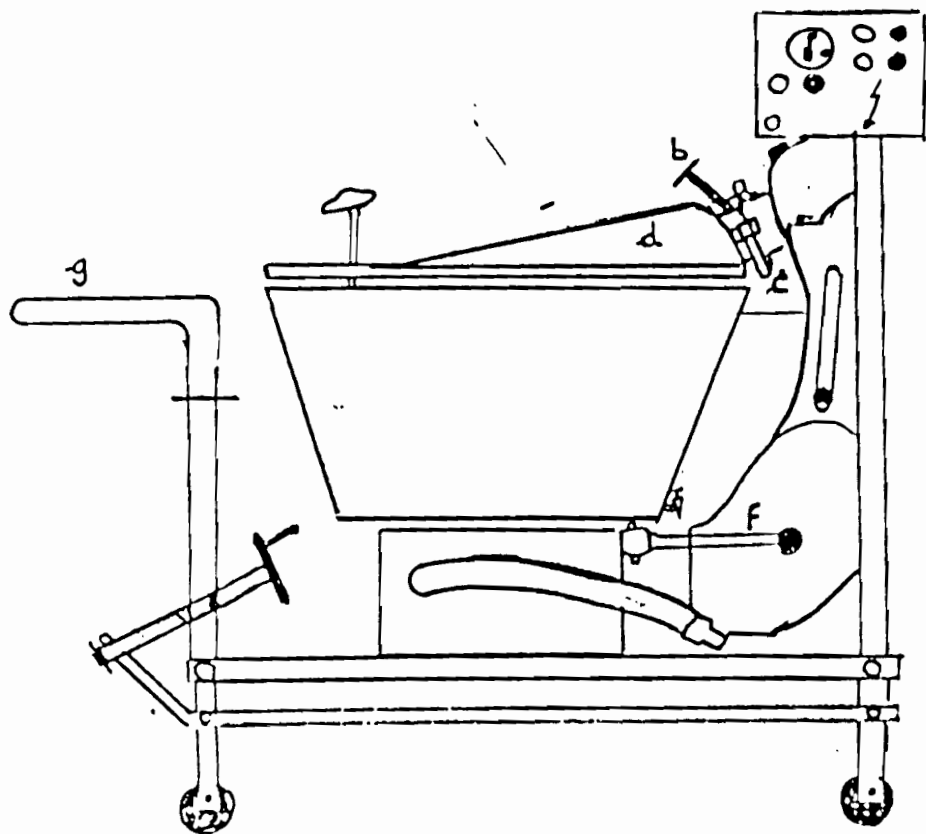
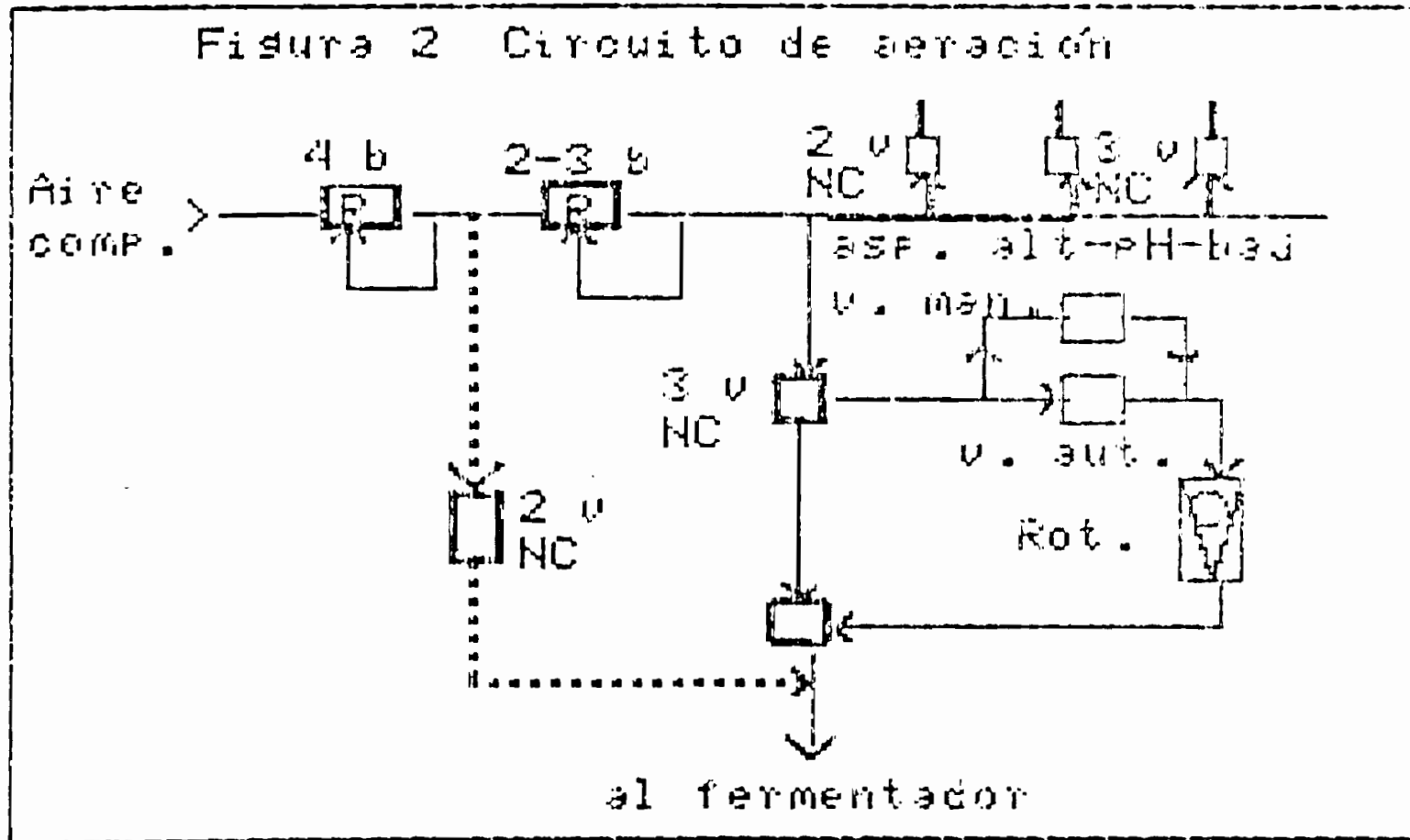
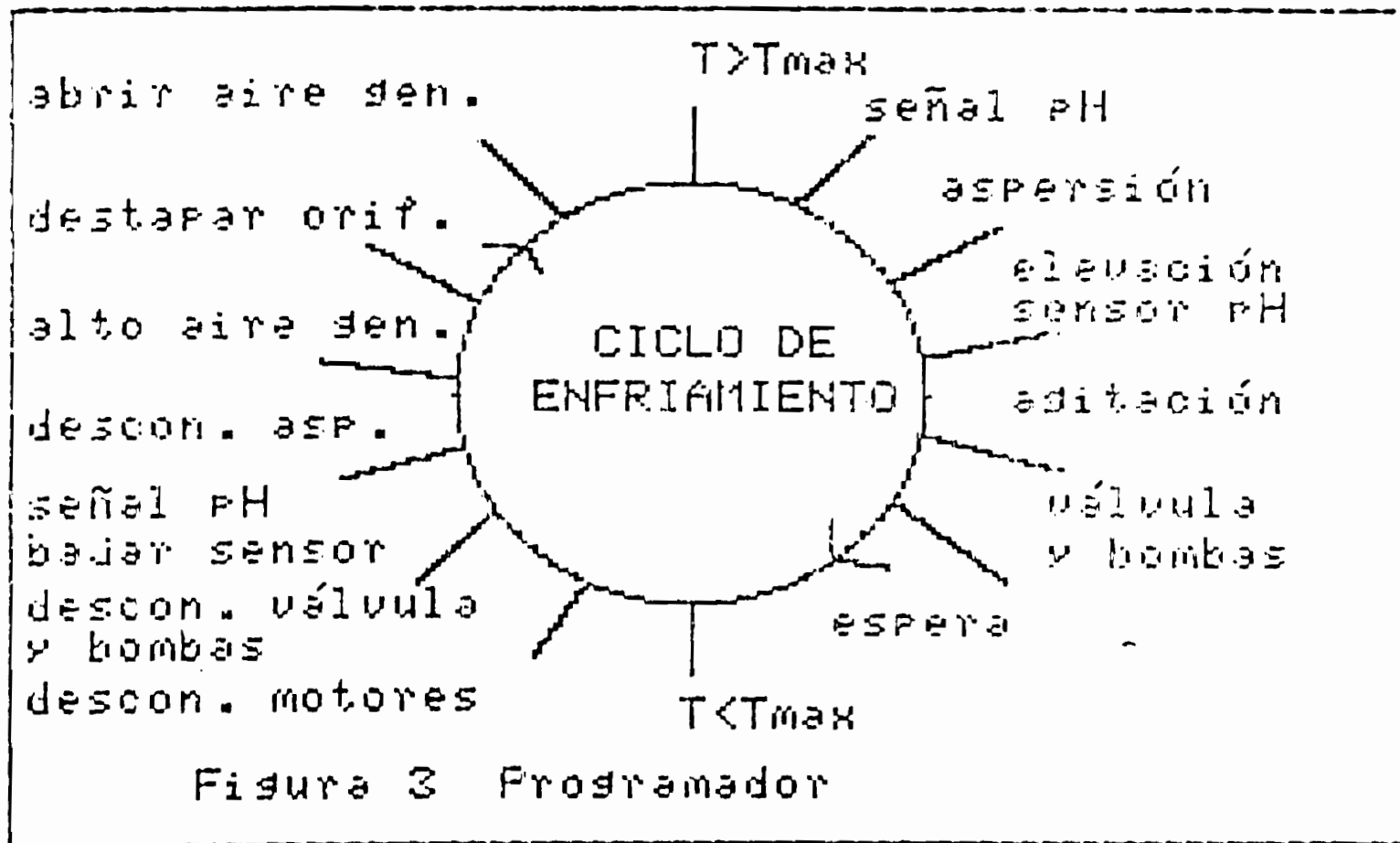


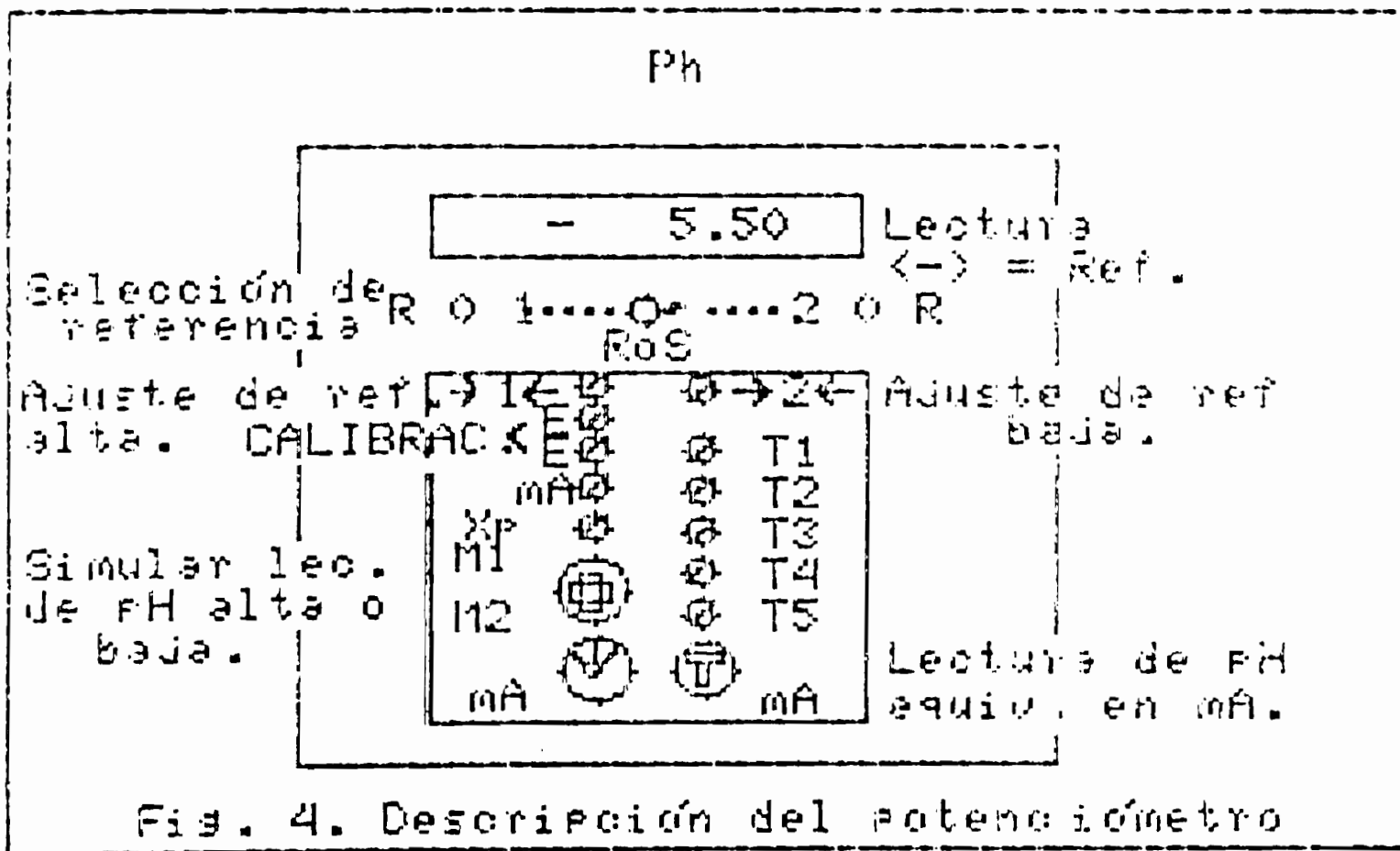
Figura 1: Diagrama del fermentador "Petrin-IRCIA"

Figura 2 Circuito de aeración









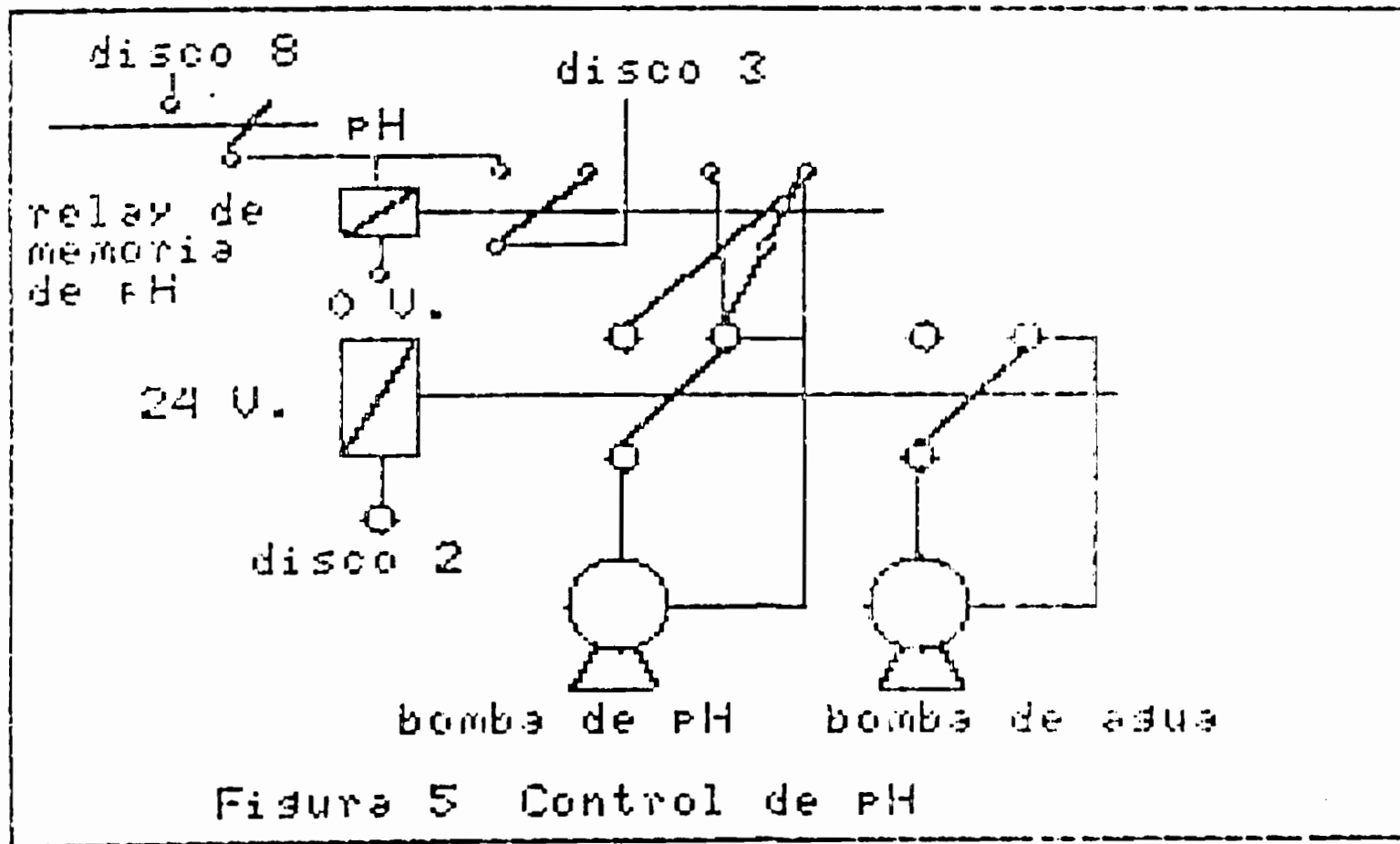
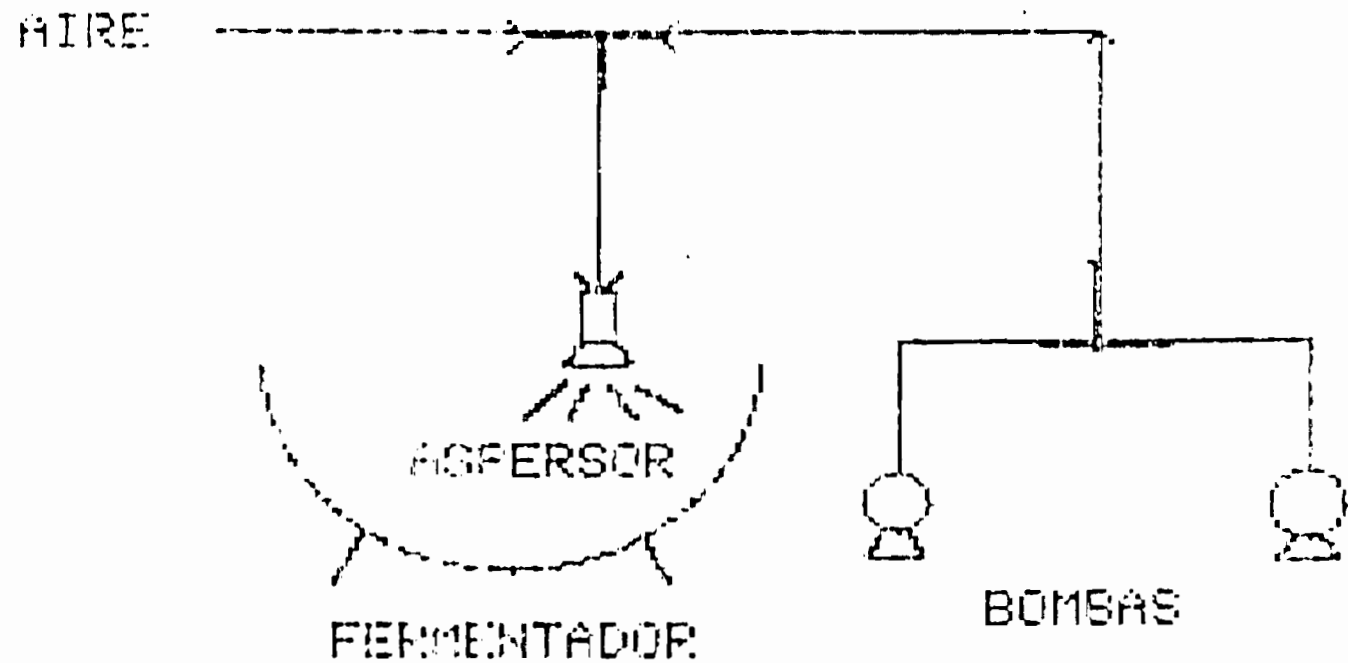
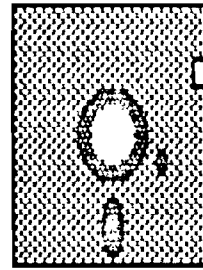


Figura 8 Circuito del espreador





# **CAPTURA DE DATOS POR COMPUTADORA**

## **MANUAL DEL USUARIO**

**POR :**

**SERGIO HUERTA O.**

**ROBAL LOPEZ U.**

**1986**

El presente trabajo forma parte del proyecto "Valorización de productos agrícolas tropicales por fermentación en medio sólido" financiado por la Comunidad Económica Europea aprobado de Noviembre de 1984 a Diciembre de 1987.

## INDICE

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| INTRODUCCION                       | 1  |
| ESTRUCTURA DEL PROGRAMA            | 2  |
| MANUAL DEL USUARIO                 | 3  |
| Introducción de datos              | 3  |
| Proceso de adquisición<br>de datos | 3  |
| Finalización del programa          | 5  |
| Modificaciones posibles            | 5  |
| DEFINICION DE LAS VARIAELES        | 6  |
| LISTADO DEL PROGAMA                | 8  |
| FIGURA                             | 11 |

# ADQUISICION DE SEÑALES ANALOGICAS POR COMPUTADORA

## Introducción

Los sistemas de adquisición de datos se utilizan para obtener datos en la operación de procesos y archivarlos en dispositivos secundarios de almacenamiento para su análisis posterior. La adquisición de datos por computadora proporciona una mayor exactitud en las lecturas realizadas, además de la ventaja de poder realizar colección de datos a velocidades muy grandes, en el caso de procesos de corta duración (una lectura cada .01 seg). Es posible diseñar un sistema de adquisición de datos con propósitos muy particulares para procesos especiales, con la utilización de interfaces adecuadas a dicho proceso.

El poder que representa la utilización de micro y mini computadoras se utiliza para combinar la adquisición de datos con otras funciones tales como comparación de los valores actuales de salida y los valores deseados, y entonces decidir la acción de control adecuada con base en la aplicación de modelos matemáticos que definen el comportamiento ideal de dicho proceso.

El presente programa está diseñado para la adquisición de señales analógicas en un canal, para un proceso particular, contemplando algunas características especiales y utilizando como interfase una tarjeta de adquisición ADA-LAE por Interactive Microwave Inc.



## ESTRUCTURA DEL PROGRAMA

El programa está estructurado principalmente de la siguiente manera:

- Inicialización de variables y activación de tarjeta de interfase.
- Selección de parámetros iniciales.
- Inicialización del archivo de datos (en disco).
- Indicación de tiempo real del proceso.
- Colección de datos (en línea).
- Indicación en cada lectura del tiempo, lectura y valor de la variable medida correspondiente.
- Graficación de datos al mismo tiempo de la captura, con opción de acceso a lista de valores <--> gráfica.
- Vaciado de datos al archivo cada número de lecturas especificado.
- Finalización del programa al cubrir el número de lecturas totales.

Las características de este programa, se derivan principalmente de la necesidad de resolver un problema: aplicarse a un proceso relativamente largo (de 30 a 60 hrs.) en comparación con procesos normalmente más cortos (de hasta 54.4 min.) para lo cual se hubiese preferido utilizar algún programa comercial existente. Esta diferencia obligó al diseño de un programa especial en donde además de tener tiempos indefinidos de proceso, se tuviera la opción de archivar cada tiempo determinado (o cada número determinado de lecturas) para evitar la pérdida accidental de éstas.

# MANUAL DEL USUARIO

## Introducción de datos

Al inicio del programa se requieren introducir los siguientes parámetros:

--> Tiempo de muestreo ? (seg) =

(Es el intervalo de tiempo entre cada lectura)

--> No. total de muestras ? =

(Es el número total de lecturas deseadas)

--> No. de muestras por lote archivado ? =

(Indica el tamaño del lote de lecturas para archivar en disco.

Se recomienda que sea un número submultiplo del No. total de muestras para asegurar el archivo de lecturas en su totalidad)

--> Nombre para el archivo de lecturas, drive ? -->

(Proporcionar el nombre deseado para el archivo de datos, indicando también el 'drive' (D1 ó D2) en donde se encuentra el disco, separándolo con una coma)

## Proceso de adquisición de datos

Una vez introducidos los parámetros iniciales, el programa construye en la pantalla una gráfica como la que se muestra en la figura 1, que sirve de patrón para la presentación gráfica de la variable de

proceso leída. Inmediatamente regresa al modo de texto y aparece la siguiente indicación:

\* \* Presiona <Return> para comenzar \* \*

Durante el proceso de adquisición, se presenta la opción de acceder a la gráfica o al modo de texto, según se desee utilizando las teclas que indica el programa:

Presiona: 'G' para gráfica

'T' para texto

Al optar por el modo de texto, la presentación de datos se obtiene con el siguiente formato:

TIEMPO REAL= 00:02:16

| No. | Tiempo | Lectura | Temperatura (°C) |
|-----|--------|---------|------------------|
| 1   | 0:0:20 | 738     | 21.08            |
| 2   | 0:0:40 | 737     | 21.01            |
| 3   | 0:1:00 | 738     | 21.08            |
| 4   | 0:1:20 | 739     | 21.14            |
| 5   | 0:1:40 | 739     | 21.14            |
| 6   | 0:2:00 | 739     | 21.14            |

Este ejemplo se obtuvo seleccionando un tiempo de muestreo de 2 segundos.

## Finalización del programa

Al finalizar el proceso de adquisición, se presenta la opción de acceder nuevamente a la gráfica o modo de texto, según se desee, para hacer las observaciones finales que se requieran. Para concluir el programa, simplemente se presiona la tecla <Esc>, localizada en el ángulo superior izquierdo del teclado.

## Modificaciones posibles.

El programa está diseñado para realizar lecturas de señales analógicas exclusivamente, y adaptado a un dispositivo específico que mide temperatura. Esto no indica que se pueda registrar únicamente esta variable, sino que, realizando algunas modificaciones sencillas, se logran adquirir señales analógicas de cualquier tipo. Las modificaciones corresponden al formato de impresión, tanto en el texto como en la gráfica y, desde luego, a los coeficientes de calibración localizados en las líneas 61 y 65 del listado del programa, y en la \*\* Subrutina Titulos \*\* (líneas 101 en adelante).

## Definición de las variables.

A\$ Variable para proporcionar una pausa.

C Valor ASCII de C\$

C\$ Valor alfanumérico de cada unidad de las variables de cadena con los nombres de los ejes X, Y y Título.

D% Entrada-Salida de intercomunicación con tarjeta ADA-LAB.

D\$ CTL-D (VALOR ASCII = 4)

DLAY TM#10

E\$ Dirección del 'drive'.

E1 Tiempo de lectura (Hrs).

E2 Tiempo de lectura (min).

E3 Tiempo de lectura (seg).

F\$ Nombre para el archivo de lecturas.

I Contador en ciclos FOR NEXT.

J Contador en ciclos FOR NEXT.

L Contador de lecturas archivadas.

LE Valor ASCII de la última tecla pulsada.

M Número total de muestras.

MA Contador de lecturas.

ML Número de lecturas por lote archivado.

MX Tiempo de lectura inicial o anterior.

MY Lectura inicial o anterior.

T Contador del reloj regresivo para medir el tiempo entre cada lectura.

TM Tiempo de muestreo.

TT\$ Título de la gráfica.  
TX\$ Nombre del eje 'X'.  
TY\$ Nombre del eje 'Y'.  
X Coordenada 'X' del nombre del eje 'X'.  
X(I) Tiempo de lectura (I).  
XT Coordenada 'X' del título de la gráfica.  
XX Coordenada 'X' del nombre del eje 'Y'.  
Y Coordenada 'Y' del nombre del eje 'X'.  
Y(I) Lectura al tiempo (I).  
YT Coordenada 'Y' del título de la gráfica.  
YY Coordenada 'Y' del nombre del eje 'Y'.

Programa de adquisición de  
señales analógicas

Por: Sergio Huerta Ochoa  
Rosal López Ulbarri

Listado del programa

2LIST

```

1 HOME
3 D% = 0: DIM C%(5),Q(5),D%(50):D# = CHR$(4):E# = "D1": PRINT
  D#;"BRUN QUICKI/O";",",";E#:L = 1
5 INVERSE : PRINT "PROGRAMA DE ADQUISICION DE SEÑALES": HTAB 1
  2: PRINT "ANALOGICAS.": NORMAL : PRINT : PRINT "Interfase
  ADALAB requerida.": PRINT
7 POKE 830,0: PRINT D#;"BLOAD UAM";",",";E#
9 HTAB 16: PRINT "Por: Rual Lopez Ulibarri": HTAB 21: PRINT "S
  engio Huerta Ochoa": PRINT : HTAB 24: PRINT "Septiembre'86
  ": PRINT
11 PRINT : HTAB 16: PRINT "Hora de inicio = 00:00:00": PRINT
13 PRINT : INPUT "Tiempo de muestreo ? (seg) = ";TM:TM = TM *
  10:DLAY = TM
15 INPUT "No. total de muestras ? = ";M
17 INPUT "No. de muestras por lote archivado ? = ";ML: DIM X(M
  L + 1),Y(ML + 1)
19 INPUT "Nombre para el archivo de lecturas, drive ? -->
  ";F#,E#
21 PRINT D#;"OPEN";F#;",",";E#
23 PRINT D#;"WRITE";F#: PRINT M
25 PRINT D#;"CLOSE"
27 HOME : HGR : HCOLOR= 3: HPLOT 34,9 TO 34,135: HPLOT 34,135 TO
  270,135: HPLOT 270,135 TO 270,9 TO 34,9
29 FOR I = 1 TO 20:II = 34 + ((I - 1) * 11.8): FOR J = 1 TO 10
  :IL = 135 - (J / 10 * 126) + 12.8: HPLOT II,IL - 2 TO II,I
  L + 2: NEXT J: NEXT I
31 FOR I = 1 TO 10:II = 135 - (I / 10 * 126): FOR J = 1 TO 20:
  IL = 34 + ((J - 1) * 11.8): HPLOT IL - 2,II TO IL + 2,II: NEXT
  J: NEXT I
33 GOSUB 101: POKE - 16301,0
35 VTAB 24: PRINT "% * Presiona <Return> para comenzar * *": GET
  A#: HOME :LE = PEEK (- 16368)
37 D% = 0000: & TO 0:MA = 1
39 VTAB 28: PRINT "Presiona 'G' para grafica": HTAB 10: PRINT
  "'T' para texto"
41 VTAB 1: HTAB 16: INVERSE : PRINT "TIEMPO REAL = ": NORMAL
43 VTAB 5: PRINT "No. "; TAB( 5);" Tiempo "; TAB( 17);"Lectura
  a"; TAB( 25);"Temperatura (°C)": PRINT : POKE 34,6: POKE 3
  5,21: HCOLOR= 3
45 D% = 32767: & TO 1
47 & T11:T = D%: & A10:Y(1) = D%
49 FOR SAMPLE = 1 TO ML:T = T - DLAY
51 & T11: IF D% < T THEN GOTO 59
53 LE = PEEK (- 16364): & A10:Y = D%:E1 = PEEK (36201):E2 =
  PEEK (36190):E3 = PEEK (36179)
55 IF LE = 64 OR LE = 71 THEN GOSUB 89
57 LE = PEEK (- 16360): GOTO 51
59 Y(L + 1) = Y: X(L + 1) = (E1 * 10000) + (E2 * 100) + E3
61 MX = 34 + ((MA / M * 236):NY = 135 - (((Y(L + 1) * .0614041 -
  24.236) / 50) * 126):MX = 34 + ((MA - 1) / M * 236):NY = 1
  35 - (((Y(L) * .0614041 - 24.236) / 50) * 126): REM T, m
  ax=50 °C
63 HPLOT MX,NY TO MX,NY
65 PRINT M#: TAB( 7);E1:"":E2:"":E3: TAB( 18);Y(L + 1): TAB(
  31);INT ((Y(L + 1) * .0614041 - 24.236) * 100) / 100
67 L = L + 1:MA = MA + 1
69 NEXT SAMPLE

```



```

71 GOSUB 85
73 IF MA < M THEN GOTO 83
75 LE = 84: GOSUB 89:: PRINT : PRINT " * * * Fin del experiment
   o * * *": PRINT : PRINT "Presiona <Esc> para terminar": GET
   S$
77 LE = PEEK ( - 16384)
79 IF LE = 27 THEN POKE 34,0: POKE 35,24: HOME : PRINT : PRINT
   : PRINT : PRINT " * * * Fin del programa * * *": TEXT
   : END
81 GOSUB 89: GOTO 77
83 L = 1: GOTO 45
85 REM Subrutina archiva **
87 PRINT D$;"APPEND";F$: PRINT D$;"WRITE";F$: FOR J = 2 TO ML +
   1: PRINT X(J),",",Y(J): NEXT J: PRINT D$;"CLOSE": RETURN
89 REM Subrutina modo **
91 IF LE = 84 THEN GOTO 99
93 IF LE = 71 THEN GOTO 97
95 LE = PEEK ( - 16368): RETURN
97 POKE - 16304,0: POKE - 16297,0: POKE - 16301,0: RETURN
99 POKE - 16303,0: POKE - 16300,0: RETURN
101 REM ** Subrutina Titulos **
103 TX$ = "Prueba real Muestra No.":TY$ = "Temperatura C"
   :TT$ = "Captura de datos <en linea>": HOME
105 POKE 233,96: POKE 232,0: HCOLOR= 3: SCALE= 1: ROT= 4: POKE
   49234,1:Y = 155:X = (236 - ( LEN (TX$) * 6)) / 2 + 34:XX =
   2:YY = (135 - ( LEN (TY$) * 7)) / 2 + 9:YT = 3:XT = (236 -
   ( LEN (TT$) * 6)) / 2 + 34
107 FOR JJ = 1 TO LEN (TX$):C$ = MID$ (TX$,JJ,1):C = ASC (C
   $) - 31: IF C < 0 THEN C = 1
109 DRAW C AT X + 6 * (JJ - 1),Y: NEXT JJ
111 FOR JJ = 1 TO LEN (TY$):C$ = MID$ (TY$,JJ,1):C = ASC (C
   $) - 31: IF C < 0 THEN C = 1
113 DRAW C AT XX,YY + 10 * (JJ - 1): NEXT JJ
115 FOR JJ = 1 TO LEN (TT$):C$ = MID$ (TT$,JJ,1):C = ASC (C
   $) - 31: IF C < 0 THEN C = 1
117 DRAW C AT XT + 6 * (JJ - 1),YT: NEXT JJ
119 REM ** Los numeros **
121 D = 236 / 10: SX = INT (S / 10)
123 FOR T = 0 TO 10: AX = INT (M * (T / 10) * 1000) / 1000: AX$
   = STR$ (AX): YY = 145: XX = 27 + (D * T)
125 FOR JJ = 1 TO LEN (AX$): C$ = MID$ (AX$,JJ,1): C = ASC (C
   $) - 31: IF C < 0 THEN C = 1
127 DRAW C AT XX + 6 * (JJ - 1),YY: NEXT JJ: NEXT T
129 YF = 50: PY = 5: YF = YF / BY: D = 128 / BY: YL = 0
131 FOR T = 0 TO EY: XX = 28: AX = INT ((YL + (YF * T)) * 10) /
   10: AX$ = STR$ (AX): YY = 137 - (D * T): IF LEN (AX$) > 1 THEN
   XX = XX - (6 * ( LEN (AX$) - 1))
133 FOR JJ = 1 TO LEN (AX$): C$ = MID$ (AX$,JJ,1): C = ASC (C
   $) - 31: IF C < 0 THEN C = 1
135 DRAW C AT XX + 6 * (JJ - 1),YY: NEXT JJ: NEXT T: RETURN

```



## DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA SIMULACION DE UN REACTOR DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO

Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa  
Depto. Biotecnología AP 55-535 CP 09340

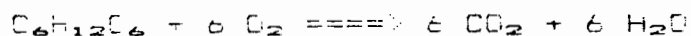
En esta sección se presenta el desarrollo de un modelo matemático de transferencia de calor para simular el comportamiento de un biorreactor de lecho empacado donde se lleva a cabo el enriquecimiento proteico de la yuca. El problema se estudia desde un punto de vista de reactores químicos catalíticos de lecho empacado, pero con las debidas restricciones propias del sistema biológico.

### 1. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

La utilización de algunos productos agrícolas primarios en la alimentación animal se ha visto limitado por su bajo contenido proteico. Como una alternativa para favorecer la utilización de la yuca en las dietas de animales, se ha planteado aumentar el contenido proteico de dicho material. La fermentación en sustrato sólido puede llevar consigo un aumento de proteínas en un factor de 4 a 8, a través del crecimiento de hongos filamentosos (Senel, 1975).

El crecimiento del hongo, entre otras cosas es posible gracias al consumo de azúcares (sustrato) que se distribuyen en asimilación (formación de biomasa) y en respiración (formación de  $CO_2$ ).

Durante el crecimiento de los hongos hay un gran desprendimiento de calor debido a la respiración del microorganismo:



Liberando 670 Kcal / g mol de sustrato respirado.

Raimbault (1980), estimó que cerca de 35 % del total de los azúcares consumidos se respira, esto es, que para un incremento de 15 % en proteína MS, se liberan globalmente cerca de 900 Kcal / kg MS durante la fermentación, otros reportes indican cantidades mayores de liberación de calor (3 200 kcal / kg MS) para sistemas de composteo (Finger et al 1976; Lonsane et al 1985).

Debido a las características del crecimiento, aproximadamente el 80 % del azúcar se consume en 10 horas, por lo que para mantener el medio isotérmico sería necesario remover cerca de 50 Kcal / hr kg MS, equivalente a calentar 3.2 l de agua 10 °C por

hora.

Por otra parte el crecimiento de hongos filamentosos es muy sensible a elevaciones de la temperatura, y en el caso de *Aspergillus niger*, de 10 a 12 °C arriba de la temperatura óptima (35 - 37 °C) el crecimiento decae notablemente.

En esta sección se pondrá especial atención en los problemas de liberación de calor metabólico y la consecuente elevación de la temperatura del medio, estos aspectos se estudiarán mediante modelos matemáticos tanto cinéticos como de transporte de calor (Moo Young et al, 1983).

Finalmente se desarrolla un modelo matemático para la predicción del comportamiento de un reactor de enriquecimiento proteico en medio sólido, basado en fundamentos bioquímicos y fisiológicos, apoyándose en datos experimentales.

## 2. EVIDENCIA EXPERIMENTAL

El sistema experimental que se empleó es muy parecido al de Raimbault (1980), por lo que parte de la evidencia experimental se toma de su reporte, y la parte complementaria necesaria para comprobar el modelo se desarrolla en este trabajo. El dispositivo experimental que se empleó en todos los casos se describe en la figura 1, la columna de vidrio se empaca con la yuca inoculada y húmeda que se fermenta, a través de la columna se pasaba aire previamente calentado y humidificado, la temperatura del aire de entrada y la del agua que circulaba por la chaqueta se regularon a 35 °C. En estas condiciones fue posible obtener medidas de temperatura en la dirección radial y axial de la columna, así como medir  $CO_2$  y  $O_2$ , en el aire de salida de la columna.

### 2.1 Cinética de $CO_2$ , $O_2$ y temperatura

Según los argumentos dados anteriormente, la elevación de temperatura del medio debería coincidir con la formación de bióxido de carbono y el consumo de oxígeno.

Como una primera etapa para sustentar el modelo, a la salida del lecho empacado se midió la temperatura, la formación de  $CO_2$  (%) y consumo de  $O_2$  (%), los resultados obtenidos se describen en la figura 2 a y b, se aprecia que existe una clara correspondencia entre las tres variables mencionadas, y que existen fundamentos bioquímicos para ello, por lo que es posible desarrollar un modelo que relacione el crecimiento de la biomasa, el consumo de azúcares, la formación de bióxido de carbono y la elevación de temperatura.

Por otra parte la gráfica (Fig. 2 b) del coeficiente respiratorio ( $CR = CO_2/O_2$ ) es congruente con otros datos obtenidos anteriormente (Bajrachayra & Mudgett, 1980; Raimbault, 1980).

donde se señala que en la región de crecimiento balanceado este coeficiente deberá tener un valor cercano a 1. Valores de CR mayores de 1 en la primera etapa de germinación de las esporas posiblemente este relacionada con un metabolismo endógeno, mientras que valores menores a 1 en las etapas finales de la fermentación posiblemente se relacionen con un incremento importante de la energía de mantenimiento y lisis celular.

### 2.2 Perfiles radiales y axiales de temperatura

Con el propósito de obtener los datos necesarios para desarrollar y comprobar un modelo de transferencia de calor se midieron en el reactor los perfiles axiales y radiales de temperatura.

En el centro de la columna mencionada se midieron los perfiles de temperatura en la dirección axial, de las 15 a las 30 horas de fermentación que es la etapa en que se presenta el mayor calentamiento, los resultados se encuentran graficados en la figura 2 a. Las diferencias máximas absolutas de temperatura observadas fueron de 0.04 °C/cm, durante toda la fermentación, esto es  $1.30 \pm 0.87$  °C en toda la longitud del reactor (Fig. 2 b), las diferencias máximas observadas en todo el reactor en 72 % de las muestras fueron menores a 1.75 °C (Fig. 3 c).

Por otra parte, se midieron los perfiles en la dirección radial, a una altura de la columna de 0.7 de la longitud total, y se encontró que los perfiles de temperatura eran muy importantes (Fig 4) se encontraron diferencias de hasta 5 °C/cm, esto es mas de 100 veces respecto al perfil axial, lo que lleva a un calentamiento de 15 °C arriba de la temperatura de incubación, esto es del centro a la pared

De este manera se concluyó que las diferencias de temperatura en la dirección axial eran menos importantes que los perfiles radiales, y por tanto podrían despreciarse del balance del reactor.

## 3. PLANTEAMIENTO DEL MODELO TEORICO

En los apartados siguientes se plantea el desarrollo modelo tanto para las expresiones cinéticas como para el balance en el bioreactor.

### 3.1 Modelo cinético

Dados los argumentos de la sección anterior se postuló que el modelo cinético inicial sería el propuesto por Raimbault:

Modelo logístico para el crecimiento:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - K X) \quad @ t=0 \quad X = 0.0012$$

Consumo de azúcares considerando mantenimiento:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} + m X \quad @ t=0 \quad S = 0$$

Formación de CO<sub>2</sub> como una fracción de los azúcares consumidos:

$$R_x = \frac{dCO_2}{dt} = Y_{CO_2} \frac{dS}{dt} \quad @ t=0 \quad CO_2 = 0$$

donde

- t : Tiempo (Hr)
- X : Biomasa (gX/gMS)
- S : Sustrato glucosa g (g/g MS)
- u : Tasa específica de crecimiento (Hr<sup>-1</sup>)
- K : Inverso del crecimiento máximo (g MS/g X)
- m : Coeficiente de mantenimiento (g S/g X Hr)
- Y<sub>x</sub> : Rendimiento de azúcares a biomasa (g X/g S)
- Y<sub>CO<sub>2</sub></sub> : Rendimiento de azúcares reductores a CO<sub>2</sub> que se respiran (g CO<sub>2</sub>/ gS)

En este momento se contaba con una serie de expresiones básicas y sus parámetros evaluados que describían el comportamiento de X, S y CO<sub>2</sub>. Además se disponía de cinéticas de crecimiento (Proteína) para diferentes temperaturas de incubación, reportadas por Raimbault (1980). Que serían útiles posteriormente. (Fig 5)

### 3.1.1 Interdependencia del crecimiento con la temperatura

La dependencia del crecimiento con la temperatura, se puede introducir haciendo u en función de la temperatura. Se tomaron los datos de Raimbault (1980) y estimando u gráficamente, los datos se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Estimación de u en función de la temperatura para el crecimiento de *A. niger* en yuca

| Temperatura (°C) | u (hr <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-----------------------|
| 30               | 0.18                  |
| 35               | 0.30                  |
| 40               | 0.34                  |
| 45               | 0.13                  |

Los valores experimentales fueron ajustados por un polinomio de cuarto orden para interpolar más datos "experimentales" de 30 a

ESTIMACION DE LA INVERSION FIJA  
PARA UNA PLANTA PILOTO DE FERMENTACION EN SUSTRATO SOLIDO.

Realizado por: OCTAVIO FRANCISCO GONZALEZ CASTILLO

## OBJETIVO

El objetivo de esta estimación es el de obtener un aproximado de la inversión fija que se requerirá para el proyecto de construcción de una planta piloto de fermentación en sustrato sólido en la UAM-I para lo cual se piensa aprovechar como infraestructura, una construcción denominada planta piloto #4 que se encuentra dentro de las instalaciones de la universidad. Esta estimación es preliminar y es necesaria para pasar a la siguiente etapa del proyecto.

## METODOLOGIA

Para calcular el costo del equipo se tuvo que hacer una selección previa del equipo entre un número muy grande de opciones que se tenían para cada operación unitaria, y se trato de manejar el peor de los casos tanto para requerimientos de espacio como en cuanto a costos. De cada uno de los casos seleccionados se realizó una cotización directa con proveedores salvo en el caso del esporulador en el cual existe una gran incertidumbre, también en el caso de la torre de humidificación no se presenta una cotización (la cual está en trámite con proveedor) sino una primera estimación "verbal" dada por el proveedor.

Para la estimación del monto de la inversión fija se utilizaron muchos métodos de estimación mediante factores reportados en la literatura y se analizaron todos los casos para finalmente decidirse por los dos métodos que mejor se adaptaron a nuestro proyecto. Se presentan los 2 tipos de estimado: el del cuadro 1 considera una inversión totalmente nueva donde no existe ninguna infraestructura previa; el del cuadro 2 nos permite descontar la infraestructura civil con que ya se cuenta para la realización del proyecto.



CUADRO 1  
 CUADRO DE ESTIMACION DE LA INVERSIÓN FIJA PARA LA PLANTA PILOTO MULTIPROPOSITOS CON ENFASIS EN LAS F.F.S.

| IDENTIFICACION DEL EQUIPO                  | NUMERO | COSTO EQUIPO<br>LAB. (DIC 1986) | FACTOR DEL MODULO<br>SIMPLE REAL (*) | COSTO DEL MODULO<br>SIMPLE REAL |
|--|--------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Mini Lavadora Automatica                   | TL-200 | 2282750                         | 2.4                                  | 5478600                         |
| Picadora Cutter 1HP                        | P-201  | 4698785                         | 2.1                                  | 9867448.5                       |
| Seccion de Charolas con aditamentos        | S-201  | 10137250                        | 2.3                                  | 23315675                        |
| Mezclador de Gavilanes de 4 Bultos         | M-201  | 3450000                         | 3.5                                  | 12075000                        |
| Molino de Martillos de 1 HP                | MC-201 | 805000                          | 2.8                                  | 2254000                         |
| Germinizador (Autoclave Horizontal)        | G-301  | 4471775                         | 2.8                                  | 12520970                        |
| Seis Fermentadores Tipo Zimotis            | FS-400 | 17250000                        | 1.5                                  | 25875000                        |
| Torre de Humidificacion                    | TH-401 | 3000000                         | 1.4                                  | 4200000                         |
| Esporulador                                | E-401  | 3000000                         | 1.5                                  | 4500000                         |
| Tanque Agitado de 150 l                    | TA-201 | 920000                          | 2.5                                  | 2300000                         |
| Tanque Agitado de 100 l                    | TA-401 | 816500                          | 2.5                                  | 2041250                         |
| Dos Micro-Autoclaves con canastilla        | AC-700 | 3239550                         | 2.8                                  | 9070740                         |
| Nueve Bombas de 1/3 HP                     | B-     | 482889                          | 3                                    | 1448667                         |
| Una Bomba de 1 HP                          | B-     | 83520                           | 3                                    | 250560                          |
| Compresor de Aire de 7.5 HP                | C-     | 2509295                         | 2.3                                  | 5771378.5                       |
| COSTO TOTAL EQUIPO (LAB)                   |        | 57147314                        |                                      |                                 |
| COSTO TOTAL DE MODULO SIMPLE REAL          |        |                                 |                                      | 120969289                       |
| IMPREVISTOS Y HONORARIOS (0.18)            |        |                                 |                                      | 21774472                        |
| COSTO MODULO TOTAL 1                       |        |                                 |                                      | 142743761                       |
| IMPREVISTOS POR PROCESOS INOVADORES (0.80) |        |                                 |                                      | 114195008                       |
| COSTO MODULO TOTAL 2                       |        |                                 |                                      | 256938769                       |
| INSTALACIONES AUXILIARES (0.30)            |        |                                 |                                      | 77081630                        |
| CAPITAL BASICO                             |        |                                 |                                      | 334020400                       |

\* G.D. Ulrich; "Procesos De Ingenieria Quimica"; Ed. Interamericana; Primera Edicion en Español; Mexico D.F. 1986

\*\* Nota: TOTAL 1= Considerando que no se tiene ninguna infraestructura previa para el proyecto.

III Estimación aproximada para el costo del piso de rejilla de hierro para el área 800 se estimó un costo de \$120,000/m<sup>2</sup>

| AREA | SUPERFICIE (M <sup>2</sup> ) | COSTO (\$X10 ) |
|------|------------------------------|----------------|
| 800  | 21.45                        | 2574           |

IV Estimación aproximada del costo del acondicionamiento físico del suelo:  
\$2,000,000

V El costo estimado para el acondicionamiento e implementación de puertas tiene un costo aproximado de:  
\$1,000,00.

VI El costo para la construcción de escaleras es de aproximadamente:  
\$500,000.

VII Es costo estimado para la edificación de sanitarios es aproximadamente:  
\$540,000.

VIII El costo estimado para una rampa impermeabilización del área 400, cimentación del equipo nos fué proporcionado de una manera global y dicho costo es de:  
\$2,000,000.

IX Imprevistos:  
\$1,600,000.

TOTAL = SUMA DE I,II,III,IV,V,VI,VII,VII,IX

TOTAL = \$20,000,000.

NOTA: Estas estimaciones están a costos de DIC-1986.

ESTIMACION PRELIMINAR DEL COSTO DE LA OBRA CIVIL NECESARIA PARA EL ACONDICIONAMIENTO FISICO DE LA PLANTA PILOTO #4

I Costo aproximado de la construcción de pisos y muros (\$90,000/m<sup>2</sup>), tomado como construcción tipo laboratorio.

| AREA | SUPERFICIO (m <sup>2</sup> ) | COSTO (\$X10 ) |
|------|------------------------------|----------------|
| 000  | 14.4                         | 1296           |
| 100  | 12.24                        | 1102           |
| 300  | 10.80                        | 972            |
| 400  | 22.50                        | 2025           |
| 500  | 10.80                        | 972            |
| 900  | 15.84                        | 1425           |
|      |                              | -----          |
|      | TOTAL                        | 7792           |

II Costo aproximado para la construcción de muros divisorios (\$50,000/m<sup>2</sup>) tomando como construcción tipo aulas e incluyendo servicios.

| AREA | SUPERFICIE (m <sup>2</sup> ) | costo (\$X10 ) |
|------|------------------------------|----------------|
| 400  | 5.72                         | 286            |
| 600  | 6.16                         | 308            |
| 700  | 6.16                         | 308            |
| 700  | 6.16                         | 308            |
| 900  | 15.40                        | 770            |
|      |                              | -----          |
|      | TOTAL                        | 2002           |

CUADRO 2

CUADRO DE ESTIMACION DE LA INVERSION FIJA

En la estimación de la inversión fija realizada en el cuadro anterior, no podemos descontar el valor de las infraestructura con la que ya se cuenta para el proyecto por lo que vamos a realizar otra estimación con un método que si nos permita hacer dicha discriminación.

METODO : MONTO INVERSION FIJA = F1\*F2\*F3\* SUM(COSTO EQUIPOS ENTREGADOS) (EQ. 1)

DONDE: SUM(COSTO EQUIPOS ENTREGADOS) = SUM(COSTO EQUIPOS LAB) \* 1.03

F1= 1.39 (Factor de instalacion de equipos para plantas de proceso sólido-líquido.)

F2= 1+f1+f2+f3+f4+f5

F3= 1+f6+f7+f8

Y DONDE:

| FACTOR                               | RANGO DE VALORES | VALOR SELECCIONADO |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| f1 (tubería de proceso)              | 0.10-0.30        | 0.20               |
| f2 (control automático)              | 0.05-0.10        | 0.10               |
| f3 (construcciones)                  | 0.60-1.00        | 0.35 *             |
| f4 (servicios y construcciones aux.) | 0.00-0.05        | 0.05               |
| f5 (líneas exteriores)               | 0.05-0.15        | 0.05               |
| TOTAL f1 a f5                        |                  | 0.75 *             |
| F2                                   |                  | 1.75 *             |
| f6 (ingeniería y construcción)       | 0.20-0.35        | 0.20               |
| f7 (factor de tamaño)                | 0.15-0.35        | 0.30               |
| f8 (contingencias)                   | 0.30-0.50        | 0.40               |
| TOTAL f6 a f8                        |                  | 0.90               |
| F3                                   |                  | 1.90               |

\*El factor de construcción solo se toma en cuenta parcialmente pues ya se cuenta con un edificio, el cual solo requiere de modificaciones menores

NOTA: La selección de los valores dentro de los rangos la realizamos en base a un análisis de las características de nuestro proyecto.

ENTONCES REGRESANDO A LA ECUACION 1 Y RESOLVIENDO TENEMOS:

$$\begin{aligned}
 \text{MONTO INVERSION FIJA} &= (1.39) * (1.75) * (1.90) * (1.03) * (57147314) \\
 &= (4.62) * (58861733) \\
 &= \$ 272044214
 \end{aligned}$$

NOTA: ESTE CALCULO TIENE UNA PRECISION GARANTIZADA POR EL METODO DE +/-20%

## COMENTARIOS A LA ESTIMACION DE COSTOS DE EQUIPO

### Lavadora

El equipo que se presenta en la cotización es tan solo una de las opciones que se tienen para esta operación unitaria. La opción presentada es la opción más cara y no precisamente la más adecuada, sin embargo se optó por trabajar con el caso más drástico en cuanto a costos en este equipo por la incertidumbre que todavía existe en su diseño.

También se cuenta con las siguientes opciones:

A) Utilizar 3 tanques de polietileno (cotizados con ROTOPALS, S.A. DE C.V.) los cuales se adaptarán para ser móviles y para realizar funciones de lavado. El costo de estos tanques sería de \$238,000.

B) Utilizar 3 tanques tipo media caña de Acero inoxidable montados sobre una base móvil y contando con un sistema manual de carga y descarga de materiales. Esta opción tiene el interés adicional de que se puede fabricar en la UAM-I a un costo muy bajo.

La cotización De esta opción esta en tramite con POLINOX.

### Picadora

Las opciones en el equipo de picado son múltiples y aun falta definir bien cual será la que se adopte, con fines de este presupuesto se trabajó con la picadora cutter que se tiene en la planta de carnes en la UAM-I con la cual ya se tiene experiencia y se sabe que es necesario cambiar las cuchillas a unas más resistentes (lo cual no hace el proveedor "HOBARD"). la otras opciones con las que se cuenta con cotizaciones son:

A) Picadora Cutter de 1/3 de HP (cotizado con HOBARD) la cual tiene un costo de \$3,510,145

B) Rebanadora de frutas y legumbres de 1 HP (cotizado con POLINOX) con un costo de \$2,817,500

C) Picadora Cutter de 2 HP (cotizado con el grupo PESA) con un costo de \$9,530,675

D) Molino picador de carne de 1/2 y de 3 HP (cotizados con HOBARD) los cuales cuestan respectivamente \$1,222,910 y \$3,171,700. Este tipos de equipos muelen en húmedo lo cual plantea una alternativa tecnológica interesante pues se podría primero picar y moler (al mismo tiempo) para luego secar.

### Secador de Charolas

Este equipo incluye además de el secador de charolas en sí a 40 charolas y a un carrito para transportarlas.

Actualmente no se tienen otras opciones analizadas en su cotización pero dentro de poco se tendrán para su análisis.

### Mezclador

En estos equipos también se presentan una gran variedad de opciones para fines del reporte, se está considerando un equipo con el cual ya se ha trabajado en la planta piloto y en el cual se piensa que se podría tanto mezclar, gelatinizar y(o) fermentar. Dentro de las opciones que se tienen cotizadas son las siguientes:

- A) Mezclador de listón (cotizado con POLINOX) con un costo de \$4,542,500
- B) Mezcladores para pastas de 2 y 5 HP (cotizados con HOBARD) con un costo respectivo de \$12,308,105 y \$17,663,310

### Gelatinizador tipo autoclave

Para la operación de gelatinización se tienen varias alternativas tecnológicas en estudio, se tomó la opción del autoclave horizontal por ser el caso extremo en costos y además por poder llevar acabo en el otras funciones como la de esterilización de materiales. Esta opción incluye: el autoclave en sí, 2 carritos y un juego de controles manuales.

### Fermentadores

Para esta operación unitaria se consideró el caso extremo en cuanto a requerimientos de espacio y muy probablemente también en cuanto costo, el reactor zymotis, pero aún dentro de estos reactores se tienen varias alternativas de diseño, con fines de esta estimación se tomó la primera de las dos siguientes:

- A) 6 reactores zymotis individuales
- B) 2 módulos cada uno con tres unidades equivalentes cada una a un reactor symotis individual (cotizado con PROCESADO DE MAQUINADO METALICO) con un costo de \$6,000,000 cada módulo

### Esoorulador

Por carecer de un diseño definitivo su costo se aproximó

### Tanques agitados

Estos tanques incluyen cada uno el costo de un agitador portátil. Faltaría calcular el costo para hacerlos móviles.

### Microautoclaves

Estos autoclaves de laboratorio incluyen canastilla y un juego de controles manuales.

### Bombas

El número y capacidad de estos equipos es preliminar por lo que estos costos se deben tomar con reserva, aunque si se observa su impacto en el costo total de la inversión fija es mínimo. Con respecto a estos equipos se están tramitando cotizaciones con otros proveedores.

### Compresor de aire

El tamaño de este compresor surge de un cálculo preliminar por lo que su cotización se debe tomar con reserva. De estos equipos se tienen otras cotizaciones donde el equipo resulta más económico.

#### NOTAS:

- 1.- Todos estos costos estan a costos de dic/1986, incluyen el IVA son libre a bordo en la planta y solo se respetaran en general en un corto periodo de tiempo.
- 3.- Los costos en material de laboratorio tambien se han aproximado en \$20,000,000
- 4.- Falta determinar todos los costos que se generarán por concepto de el equipamiento del taller mecánico.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) G.D. Ulrich; Procesos de Ingeniería Química; Ed. Interamericana; primera edición en español; Mex 1986.
- 2) Peters, Max.s y Klaus, K Timmerhaus; Plant design and economics for chemical engineers; Ed. Mc Graw-hill; tercera edición; New York 1980.
- 3) Resnick Williams; Process analysis for chemical engineers; Ed. Mc Graw-hill, New York 1981.
- 4) R.H. Perry; C.H. Chilton; Chemical engineers Handbook; Ed. Mc. Graw-Hill; New York 1973.
- 5) H.F. Rase y M.H. Barrows; Ingeniería de proyectos para plantas de proceso; Ed. C.E.C.S.A.; tercera impresión; Mex. D.F. 1976.
- 6) J. Giral, F. Barnes y A. Ramirez; Ingeniería de procesos; Ed. Alhambra; segunda edición; Mex. D.F. 1979.
- 7) J. Happel; Chemical process economics; Ed. Dekkev. inc.; segunda edición; New York 1968.
- 8) Ludwig Ernest E; Applied process design for chemical and petrochemical plants; Ed. Houston Gulf; 1964.
- 9) Rudd Dale, Charles C. Warson; Strategy of process engineering; Ed. Wiley; New York 1968.
- 10) Chemical Engineering Magazine; Modern cost engineering; Methods and Data; Ed. McGraw-Hill; New York 1979.



## CONCLUSIONES

El costo estimado del equipo (LAB)= \$57,147,314 pesos mexicanos  
=(\$57,150·U.S. Dollar)  
=====

El costo estimado de la inversión fija = \$ 272,044,213 (+-20%) pesos mex.  
=(\$ 272,000·U.S. Dollar)  
=====

Estas son estimaciones preliminares puesto que todavía falta definir con mayor precisión la especificación y selección del equipo adecuado para el proceso. Para su cálculo se consideraron en general los casos más extremos en costo y requerimientos de espacio por lo que pensamos que al optimizar la selección del equipo disminuirá el monto de la inversión en equipo y por ende en la inversión fija. Falta especial información y definición en los procesos de secado, gelatinizado, humidificación y esporulación.

No obstante dentro de las condiciones mencionadas los estimados son de una precisión adecuada pues para la estimación de costo de equipos se realizaron cotizaciones directas con proveedores y en la estimación de la inversión fija se empleo un método que garantiza una precisión de +-20%. Aunque es necesario hacer notar que falta incluir dos gastos considerables: equipo de laboratorio y equipo de un taller de mantenimiento.

=====

El efecto nutricional de harina de yuca (*Manihot esculenta*) enriquecida por fermentación de sustrato sólido y complementada con gluten de trigo.

por

Carcino-Alcázar, F. y Viniegra-González, G.  
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Avenida Michoacán  
y Purísima. Colonia Vicentina, Iztapalapa, México D.F.  
C.P. 09340 Tel. 6-86-03-22

## R E S U M E N .

Se determinaron los efectos nutricionales de harina de yuca enriquecida por fermentación de sustrato sólido (HYEFSS) y complementada con gluten de trigo (GT) observada en los animales monogástricos.

Se prepararon ocho dietas de un nivel de proteína del 10% proporcionada por la mezcla protéica en diferentes cantidades. Los parámetros observados para los efectos nutricionales fueron: Relación de Eficiencia Protéica (P.E.R.), Utilización Neta Protéica (N.P.U.) y Digestibilidad In Vitro.

Las dietas no resultaron con un balance óptimo de aminoácidos indispensables para ratas, siendo la Metionina el primer aminoácido limitante indispensable seguido de Treonina, Lisina, Valina, Triptofano e Histidina.

Por esto se presentó un retraso en el crecimiento del animal así como cambios cutáneos notorios. La presencia de un exceso de nitrógeno amoniacal afectó al nivel del nitrógeno protéico y disminuyó en la dieta no alcanzándose el porcentaje protéico necesario. Finalmente, las mediciones de digestibilidad in vitro resultaron con bajos valores siendo un factor adverso para las dietas.

## I N T R O D U C C I O N .

Algunos factores como el aumento en los costos de la producción agrícola y el lento incremento de la misma presenta una comparación alarmante con el crecimiento mundial de la población por lo que hace pensar en la necesidad de buscar nuevas fuentes alimenticias utilizando los recursos disponibles que no han sido explotados. Por esta situación se ve la necesidad de buscar métodos más efectivos con costos mínimos para el procesamiento de los alimentos. Las fermentaciones tradicionales han perdurado a través del tiempo por poseer características como favorecer el incremento en el contenido proteínico de sustratos con altas concentraciones de almidón y el enriquecimiento de los alimentos con vitaminas y aminoácidos indispensables.

Por lo tanto el presente trabajo de investigación es un proyecto de fermentación sólida para favorecer el enriquecimiento en proteína a la harina de yuca (*Manihot esculenta*) mediante la inoculación con cepas de mohos tales como *Aspergillus niger* y después de la fermentación obtener niveles próximos al 20% que es muy superior al 3% de proteína inicial.4-7

Por otra parte la calidad de una proteína se determinará con la eficiencia con la cual sea utilizada para la síntesis de proteínas tisulares y/o para el mantenimiento del organismo; ya que la función principal de la proteína en la dieta es la de suministrar una mezcla de aminoácidos en proporciones adecuadas para que se efectúen estas funciones vitales. 4-5

Cualquier método para medir el valor de las proteínas en los alimentos deberá directa o indirectamente evaluar estas funciones. Los métodos primordiales para evaluar la calidad protéica son el método químico y el método biológico.

Es pues que mediante la realización de los estudios mencionados anteriormente en este trabajo de investigación se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- Conocer la complementación de aminoácidos indispensables de las harinas de yuca con la adición de gluten de trigo mediante la ganancia en peso de los animales de experimentación.
- En base a nuestras dietas de harina de yuca con un porcentaje alto, medio y bajo tanto de proteína como de nitrógeno amoniacal determinar el mejor aporte nutritivo de nuestras dietas, así como conocer el porcentaje tolerable de nitrógeno amoniacal en el animal de experimentación.
- Disminuir el posible efecto de nitrógeno amoniacal adicionando un compuesto proteínico y de esta manera evitar la toxicidad aguda en el organismo.

#### M A T E R I A L E S Y M E T O D O S .

La evaluación nutricional se realizó con tres muestras que fueron enriquecidas por fermentación de sustrato sólido, producidas en la planta piloto de fermentaciones de la UAM I, con la siguiente codificación:

|  |      |
|--|------|
| Yuca ensilada gelatinizada fermentada (40 hrs) | 8637 |
| Yuca ensilada gelatinizada fermentada (30 hrs) | 9849 |
| Yuca gelatinizada ensilada fermentada (30 hrs) | 8198 |

A estas muestras se les realizó un análisis químico proximal con la finalidad de conocer su composición determinando el contenido de humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas y el extracto libre de nitrógeno. Con el contenido de proteína, grasa o extracto etéreo y fibra cruda de cada una de las muestras se procedió a realizar cálculos directos de las cantidades necesarias para preparar la dieta tipo: 10% de proteína, esta se preparará con los ingredientes básicos en la siguiente composición establecida por Morales et al,3:

| Ingredientes:        | Porcentaje (%): |
|----------------------|-----------------|
| Proteína.            | 10              |
| Aceite de maíz.      | 20              |
| Mezcla de minerales. | 5               |
| Mezcla de vitaminas. | 1               |
| Celulosa.            | 4               |
| Glucosa.             | 20              |
| Sacarosa.            | 20              |
| Almidón.             | 20              |

Preparándose 3 kg de cada dieta una vez elaboradas, nuevamente se analizó el contenido de proteína para verificar que se encontraban en 10%  $\pm$ , -0.3

Los factores de conversión de proteína utilizados fueron (6.25) para los productos fermentados, (5.7) para el gluten de trigo y (6.38) para la caseína.

Estos valores fueron obtenidos del 3 y 6. Teniendo las ocho dietas preparadas con los productos fermentados y la dieta de gluten de trigo se efectuaron las siguientes diluciones:

| Muestra. | g de producto a evaluar. | g de gluten de trigo. | Dilución (%) |
|----------|--------------------------|-----------------------|--------------|
| 8637     | 375                      | 2625                  | 12.5         |
| 8637     | 1500                     | 1500                  | 50.0         |
| 9849     | 375                      | 2625                  | 12.5         |
| 9849     | 750                      | 2250                  | 25.0         |
| 9849     | 1500                     | 1500                  | 50.0         |
| 8198     | 375                      | 2625                  | 12.5         |
| 8198     | 750                      | 2250                  | 25.0         |
| 8198     | 1500                     | 1500                  | 50.0         |

De esta manera se obtuvieron ocho raciones con la mezcla de los productos protéicos los cuales serían suministrados ad libitum a los animales de experimentación considerando: a) diez animales para caseína que se usará como control; b) dos animales como blanco para N.P.U. y c) diez animales por cada producto. Así también los animales de experimentación presentaron las siguientes características específicas:

Raza : Rata blanca.  
Especie : Wistar.  
Sexo : Machos.  
Edad : 21-23 días de nacidos recién destetados.  
Peso : 35-40 g

Con esta secuencia se efectuó la Relación de Eficiencia Protéica (P.E.R.) durante 28 días, posteriormente se realizó el ensayo de Utilización Neta Protéica (N.P.U.). Al finalizar estos análisis se determinó de la composición de aminoácidos, la digestibilidad y el porcentaje de nitrógeno amoniacal de los productos fermentados con la finalidad de explicar más ampliamente los resultados encontrados.

#### T E C N I C A S E M P L E A D A S

Análisis Químico Proximal.  
Relación de Eficiencia Protéica. (P.E.R.)  
Utilización Neta Protéica. (N.P.U.)  
Análisis cuantitativo de aminoácidos de la proteína.  
Digestibilidad In Vitro con pepsina en ácido clorhídrico.  
Determinación de nitrógeno amoniacal en la muestra.

#### R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

1. Químico proximal. Los datos químicos de composición proximal de las muestras determina que la 8637 presenta el más alto

porcentaje de proteína (16.70%); la 9849 se encuentra en un valor medio (14.35%) y la 8198 presentó el valor más bajo de proteína (13.93%).

2. Métodos biológicos. La ganancia de peso presentada demuestra el retraso del crecimiento al obtener valores tan bajos en comparación con los obtenidos con caseína. Así mismo al analizar el cuadro I demuestra que la digestibilidad de los productos son muy bajos por lo que en base a estos resultados y tratando de explicar las causas de los valores encontrados se procedió a evaluar el perfil de aminoácidos en las muestras así como la determinación de nitrógeno amoniacal. El cálculo teórico del balance de suplementación de aminoácidos indispensables para ratas en las mezclas de los productos protéicos determina a la Metionina como primer aminoácido limitante indispensable seguido de Treonina, Lisina, Valina y en algunas, deficiencia de Triptofano e Histidina; por lo que en un gran parte estas deficiencias influyeron en los valores mencionados anteriormente.

El nitrógeno amoniacal se encontró en una buena parte por lo que afectó al nitrógeno protéico y contribuyó a los valores tan bajos mencionados.

#### C U A D R O I

##### DIGESTIBILIDAD IN VITRO CON PEPSINA EN ACIDO CLORHIDRICO.

| Muestra.         | Proteína Total. | Proteína no digestible. | Digestibilidad (%) |
|------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|
| 8637             | 16.70           | 11.80                   | 29.34              |
| 9849             | 14.35           | 11.00                   | 23.34              |
| 8198             | 13.68           | 9.04                    | 33.91              |
| Gluten de trigo. | 72.45           | 10.30                   | 85.78              |

#### C O N C L U S I O N E S

- Ninguna complementación en las mezclas de los productos protéicos, harina de yuca enriquecida por fermentación de sustrato sólido (HYEFSS) y gluten de trigo (GT) dió resultados satisfactorios al administrarse a ratas.
- Lo anterior podrá explicarse debido a los siguientes factores:
  - a). Las muestras a evaluarse tienen bajos valores de digestibilidad.
  - b). El perfil de aminoácidos tanto de las muestras a evaluar como el gluten de trigo presentan deficiencias de aminoácidos indispensables en particular Metionina como primer aminoácido limitante indispensable seguido de Treonina, Lisina, Valina y en algunas, deficiencia de Triptofano e Histidina.
  - c). Parte del nitrógeno aportado en la dieta correspondió al nitrógeno amoniacal contribuyendo en gran manera a la

deficiencia observada.

- Por lo anterior se sugiere utilizar estos materiales en la alimentación de pollos de engorde que por sus características pueden presentar mejores resultados.

#### A G R A D E C I M I E N T O S

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Organización de Estados Americanos (O.E.A.), por haber patrocinado parcialmente la realización de este trabajo, así como al Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (I.N.N.S.Z.) División de Nutrición experimental y Ciencia de los alimentos -Departamento de Nutrición Animal-, por la colaboración brindada durante la fase experimental de esta investigación.

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

1. Association of Official Agricultural Chemist. Official methods of Analysis of the A.O.A.C. 14a. ed. Washington D.C. 1984  
Método 14.004:222  
Método 14.006:222  
Método 2.049:150  
Método 7.045:131  
Método 7.054:137
2. Campbell, J.A. Methods for Determination of PER and NPU, evaluation of proteins quality. Ed. National Academy of sciences. Washington. 1970. p.p. 99-105
3. Morales de León. et al, "Métodos Biológicos". Manual de técnicas de laboratorio para análisis de alimentos. L63. 1985. p.p. 143, 146-147 y 150-153.
4. Miller, G.A. and Lachance, P.A. "Protein chemistry and nutrition". Food Product development. December 1973
5. Miller, D.S. A procedure for determination of UNP using rats body N. Technique Evaluation of Proteins quality. Ed. National Academy of sciences. Washington 1970. p.p. 97-110
6. Pomeranz, Y. Wheat chemistry and technology. third ed. Ed. American Association of cereal chemists, incorporated st Paul Minnesota. U.S.A. 1978. p.p. 813
7. Reade, A.E. and K.F. Gregory. "High temperature production of protein enriched feed from cassava by fungus". App Microbiol. No. 30 1975 p.p. 880-909
8. Tejada de Hernández. et al, Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. Ed. INIP. SARH. México. 1983 p.p. 296-297

ERIC ORIOL  
REPORTE FINAL DE ACTIVIDADES  
Noviembre-Diciembre de 1986

li  
v  
3  
di  
d  
1

## RESUMEN

Este trabajo esta enfocado al estudio del agua en el cultivo sólido de Aspergillus niger.

En la primera parte, se probó un metodo de suplementar agua al medio sólido constituido por harina de yuca, mediante la introducción de fibras de bagazo de caña con una alta capacidad de retención de humedad. Un aumento del contenido inicial de agua acelera el crecimiento y permite una mejor utilización del sustrato. En lo que se refiere a la producción de glucoamilasas se mostró la existencia de un optimo de contenido de fibras asi como de humedad.

En una segunda parte, se hicieron ensayos de cultivos solidos de A.niger con medios liquidos sinteticos absorbidos sobre bagazo de caña y los cuatro parametros estudiados fueron: la humedad inicial, la concentración de glucosa, el tamaño de partícula del bagazo y el tamaño de inculo. La concentración de glucosa en solución afecta drasticamente la velocidad de crecimiento, encontrandose una relación lineal inversa entre la tasa especifica de crecimiento y la concentración. Un aumento del tamaño de inculo demostró tener una influencia positiva sobre la tasa de crecimiento y acortar el tiempo de fermentación. Los dos otros factores estudiados no produjeron efectos mayores sobre el comportamiento cinético de A.niger.

Estudios de termocalorimetria practicados con A.niger sobre harina de yuca y medio absorbido sobre bagazo revelaron la existencia de un brinco energetico relacionado a una fase de transición de la germinación al crecimiento apical. En el secundo caso, la intensidad de este fenómeno fue aumentando con la concentración de glucosa y el tamaño de inculo.



# I. Efecto del agua en el cultivo sólido de Aspergillus niger sobre almidón de yuca.

## I.1. Introducción

El cultivo en medio sólido ha sido utilizado en Japon tradicionalmente para la producción de alimentos fermentados del arroz o de la soya (Hasseltine 1965). Mas recientemente fueron desarrollados un numero importante de trabajos tendientes a utilizar esta tecnica para la elaboración de alimentos enriquecidos en proteínas para ganado o la síntesis de enzimas.

Raimbault (1980) demostró que mediante un cultivo sólido de A.niger sobre almidón de yuca se podia lograr un 12 % de incremento proteínico pero que el consumo de azucares no era total sino que el crecimiento se paraba quedandose aún en el medio un 25 a 30% de azúcar. Varios factores son descritos en la literatura como limitantes de la fermentación solida:

- La transferencia de oxígeno: un analisis de los gases efluentes enseñó que solamente se utilizaba de 3 a 4% del oxígeno presente en el aire en las condiciones de aireación del experimento (4 l/h/10 g de materia seca) por lo cual se pensó que este factor no era limitante.

- La remoción del calor metabolico: durante el crecimiento se liberan cantidades importantes de calor asociadas al proceso de respiración. La remoción de este calor se puede hacer por conducción o por convección a través del aire forzado pero para diametros de columnas superiores a 4 cm se pudieron observar fenomenos de calentamiento (Raimbault, 1980; Huerta, 1984; Bacquet, 1986) perjudiciales al buen desarrollo del cultivo. Sin embargo, en columnas de 2 cm de diámetro, la termostatación es suficiente y no se detectó calentamiento (Raimbault, 1980) por lo cual pensamos que este factor no era limitante en las condiciones de cultivo de laboratorio.

- El agua: En el metodo de cultivo de laboratorio considerado la humedad aumenta de un 10 a un 20% durante el proceso por efecto de la perdida de peso seco pero este agua se va incorporando al micelio y Raimbault (1980), en el establecimiento de la ecuación estoichiometrica de la reacción determinó que el agua libre residual despues de 25 h no rebasaba el 13% del peso total, valor limite para el crecimiento de los hongos. La baja capacidad de absorción de agua del almidón impide trabajar con humedades iniciales por encima de 50 a 55%, mas agua llevando a un sustrato pastoso de aireación difícil. El problema de suplear agua al medio puede ser abordado desde diferentes angulos:

- uno es de trabajar con un reactor de fermentación abierto dinámico, aspersando el medio a intervalos regulares pero ello lleva consigo problemas de homogeneización y de mezclado, no siempre beneficios para el desarrollo del micelio. Este tipo de reactor tiene la ventaja de poder facilitar la eliminación de las calorías pero es mas complicado que los sistemas estaticos de tipo charola o columna.

- otra respuesta la podia proporcionar un cambio en la textura del almidón de yuca mediante algun tratamiento fisico, aumentando asi su

capacidad de retención de agua. Se hicieron ensayos de extrusión, la cual por medio de una operación de compresión-decompresión aumenta la superficie específica del almidón. Se obtuvieron así sustratos que podían ser usados con 65 % de humedad inicial sin problemas de agregación y donde el desarrollo del micelio fue satisfactorio (Cruz et col. 1986). El mayor inconveniente de este preacondicionamiento es su costo, prohibitivo para un producto de bajo valor agregado como lo es la proteína microbiana para la alimentación ganadera.

- La ingeniería puede aportar algunas soluciones a estos problemas. Así Gervais et col. (1986) por medio de la regulación de la humedad relativa (Hr) del aire entrante al reactor logran mantener u aumentar la actividad de agua (Aw) de un soporte constituido por discos de celulosa. Un punto débil de este sistema resulta en el tiempo de respuesta del sistema (4 h) el cual es conveniente para procesos lentos (producción de esporas en este caso) pero demasiado largo para procesos rápidos como lo es el crecimiento de *A. niger*.

- existe también otra alternativa que consiste en introducir en el medio de fermentación un soporte con alta capacidad de retención de agua que permitiría así incrementar la humedad inicial de manera importante. Esta idea ha sido probada por Sato et col. (1983) que introducen pulpa de madera en la fermentación del salvado de trigo por *Aspergillus oryzae*. Esos autores observan un incremento en la cantidad de biomasa y en la cantidad de glucoamilasas sintetizadas. Las fibras lignocelulosicas parecen constituir un soporte idóneo para este propósito tomando en cuenta que mejoran la textura del sustrato volviéndolo más aireado y facilitan así su empacamiento en columnas. Retomamos esa idea y pensamos en introducir como soporte bagazo de caña, este material siendo un desecho agro-industrial fácilmente disponible y de bajo valor de utilización .

## I. 2. Material y métodos

### I. 2. 1. Material bruto

La harina de yuca utilizada fue obtenida a partir de tubérculo fresco, pelado, picado, gelatinizado a 120°C durante 15 mn, después enfriado a 0°C para evitar la retrogradación del almidón, secado y finalmente molido y tamizado, usando la fracción comprendida entre 20 y 50 mesh. Esta harina contenía aproximadamente 80% de almidón y 2 % de proteína en base seca.

El soporte utilizado fue bagazo de caña, esencialmente constituido por medula y obtenido del Ingenio de Zacatepec (Mor.). Este bagazo contenía aproximadamente 10% de azúcares residuales. Este bagazo fue tamizado, utilizando salvo especificaciones la fracción de 20-50 mesh.

### I. 2. 2. Conservación de la cepa y obtención de esporas.

La cepa fue sembrada cada seis meses sobre un medio "malt-agar" y conservada a 4°C. El medio utilizado para la obtención de esporas es el siguiente: Harina de yuca, 40 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g; Urea, 1 g;  $\text{CaCl}_2$ , 1 g; Agar, 15 g; Agua 1000 ml. El pH de este medio fue ajustado a 5.6 y el medio fue repartido en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón de 25 ml por matraz. Los matraces fueron esterilizados en

un autoclave a 110°C durante 25 mn. Los medios se dejaron despues enfriar hasta 40°C y se inocularon en la masa con 2 ml de una solución de esporas obtenida a partir de los tubos de conservación. Los matraces fueron incubados a 25°C durante 7 días. Después de este lapso de tiempo, las esporas fueron suspendidas en 100 ml de agua adicionada de 2 gotas de Tween 80 mediante una agitación con una barra magnetica. La suspensión de esporas fue filtrada con gaza para remover las particulas de medio o de micelio.

### I. 2. 3. Metodo de cultivo

El metodo de cultivo es una adaptación de aquel propuesto por Raimbault et col.(1980). El bagazo esta humidificado con el 50% del agua y la mezcla es esterilizada al autoclave durante 15 mn a 120°C para evitar toda contaminación ulterior por la microflora del bagazo. Por otra parte los sales se disuelven en los otros 50% de agua y después de la adición de las esporas el pH se ajusta a 2.7. El bagazo se enfria, se mezcla con la harina de yuca y se inocula con las esporas en suspensión en la solución salina. El material inoculado se empaca despues en columnas de vidrio a razón de 15 a 20 g por columna dependiendo de la densidad del material. Las columnas aireadas se ponen en un baño de agua termostataado (ref. Raimbault et col. 1980). La composición del medio salino es la siguiente:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 9.8 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.0 g; Urea, 2.4 g por 100 g de harina de yuca. Salvo especificación el tamaño de inculo fue de  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de harina.

### I. 2. 4. Metodos de analisis

#### I. 2. 4. 1. Gasometria

El consumo de oxígeno y la producción de  $\text{CO}_2$  durante las fermentaciones fueron medidos por gasometria. El aire efluente de la columna fue secado mediante pasaje a traves de una columna de condensación y de una columna de Silicagel<sup>®</sup> con indicador colorimetrico. Parte del aire seco estaba después bombeado a un analizador de oxígeno de tipo paramagnetico de marca Servomex<sup>®</sup> conectado a un registrador lo que permitia monitorear las fermentaciones. La otra parte del aire secado estaba bombeada hacia un analizador de  $\text{CO}_2$  Beckman<sup>®</sup> de tipo infrarojo igualmente conectado a un registrador. La tasa especifica de crecimiento promedio ( $\mu$ ) fue calculada a partir de las velocidades de consumo durante la fase de crecimiento balanceado.

#### I. 2. 4. 2. Analisis de las muestras de fermentación.

- El peso seco se determinó a peso constante, 24 h a una temperatura de 105°C.
  - En las fermentaciones con yuca sola, la biomasa fue estimada por el metodo de Lowry (1951) sobre muestras diluidas y homogeneizadas con un macerador de tejidos de tipo Potter.
- La presencia de ligninas produce interferencias con el metodo de Lowry, por lo cual en los productos de fermentación conteniendo bagazo, las proteínas fueron estimados a traves de los amino-acidos

totales sobre 200 mg de muestra secada a 60°C y molida (40 mesh). Las proteínas fueron hidrolizadas con HCl 7N a 120°C en ampollas selladas durante 20 mn y neutralizadas con soya. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue diluido para la reacción colorimétrica con ninhidrina (Snell & Snell 1956), la lectura se hizo contra un estándar de caseína tratado en las mismas condiciones - Para los análisis ulteriores, las muestras fueron diluidas en agua (25 veces) y homogeneizadas por medio de un UltraTurrax<sup>®</sup>.

Análisis de los azúcares totales: 1 ml del homogeneizado fue hidrolizado con 5 ml de HCl 1 N a ebulición durante 3 h. El hidrolizado fue neutralizado con soya 1 N y los azúcares reductores fueron medidos por el método de Miller (1959) después de una dilución adecuada.

Análisis de los ácidos nucleicos: 5 ml del homogeneizado fueron centrifugados y sobre la fracción insoluble se practicó una digestión con ácido perclórico a 70°C para extraer los ácidos nucleicos, los cuales fueron medidos por absorbancia a 260 nm contra una solución estándar de ARN de levadura.

Determinación de la actividad glucoamilásica: en un medio constituido por 2.5 ml de almidón a 15 g/l y 2 ml de amortiguador citrato pH 4.5 y 0.1M se añadió 0.5 ml de la muestra a actividad enzimática y se dejó a incubación en baño-maria a 60°C. Se tomó 1 ml al tiempo 0 mn y al tiempo 15 mn y se echó en 1 ml de reactivo alcalino de DNS donde se paró la reacción. Los azúcares reductores liberados fueron medidos por el método de Miller, 1959 y una unidad de actividad glucoamilásica se expresa como la cantidad de enzima que libera 1 micromola de glucosa por mn en las condiciones del experimento.

#### I. 2. 4. 3. Microcalorimetría

Los estudios de microcalorimetría fueron llevados a cabo sobre un aparato LKB<sup>®</sup> llamado Thermal Activity Monitor<sup>®</sup> de cuatro canales todos doblados por una referencia. Las condiciones de cultivo son las mismas que aquellas descritas en el I. 2. 2. con la excepción de que el cultivo se desarrolló a cabo en condiciones absolutamente estériles. El material sólido fue puesto en frascos de 3ml y la atmósfera fue saturada con una corriente de oxígeno puro antes de sellar el frasco herméticamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 37°C y en duplicado, los termogramas siendo registrados en continuo.

#### I.3. Resultados

##### I.3. 1.: Crecimiento de A.niger sobre almidón de yuca.

En la Fig.1 esta representada la cinética de crecimiento (medida por las proteínas (Lowry et col. 1951)), de consumo de azúcares y de producción de glucoamilasas de A.niger sobre almidón de yuca. En la Fig. 2 están representadas las cinéticas de velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, de consumo de O<sub>2</sub> así como el coeficiente respiratorio (Qr), relación de esas velocidades. Esos resultados confirman aquellos previamente obtenidos por Raimbault (1920) y Huerta (1934), sea un enriquecimiento proteínico del 10% peso seco inicial (PSI) llevado a

cabo en 25 h, un consumo de azucares proximo al 50% PSI resultando en un rendimiento de transformación de azucares a proteínas (Rx) del orden de .200, y una perdida de peso seco del 11%. El coeficiente respiratorio se mantiene cerca de 1.0 durante toda la fase de crecimiento para bajar despues. El perfil de acidos nucleicos (Fig. 3) es muy parecido a los perfiles de velocidad de consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$  pero se puede observar una diferencia de 2 a 3 h entre el tiempo de maxima actividad respiratoria y el tiempo de biomasa maxima medida a traves de las proteínas. Lo último muestra que la determinación de los acidos nucleicos constituye un indicador muy sensible del estado fisiológico del hongo.

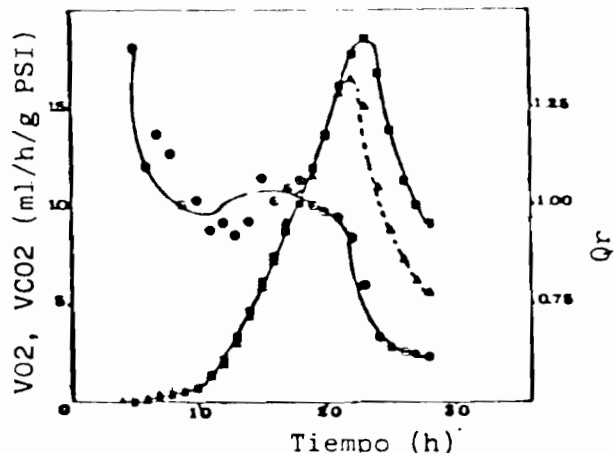
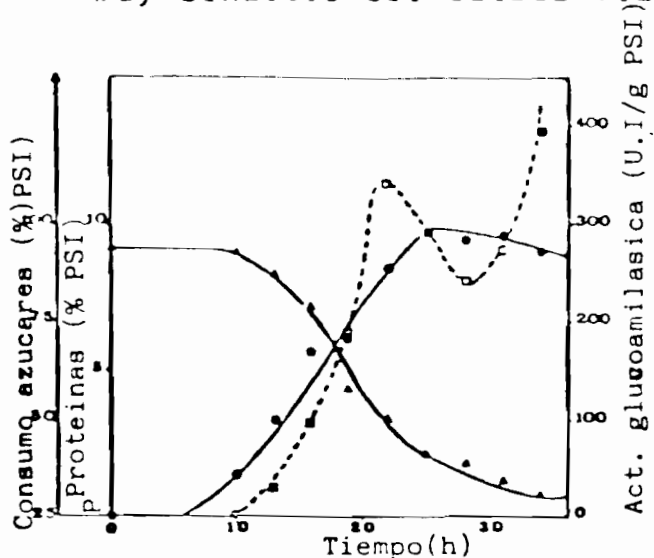


Fig. 1: Cinética de proteínas (—○—), consumo de azucares (—▲—) y producción de glucoamilasas (—□—) de *A.niger* sobre almidón de yuca.

Fig. 2: Cinética de producción de  $CO_2$  (—△—), consumo de  $O_2$  (—■—) y  $Q_r$  (—○—) durante el crecimiento de *A. niger* sobre almidón de yuca.

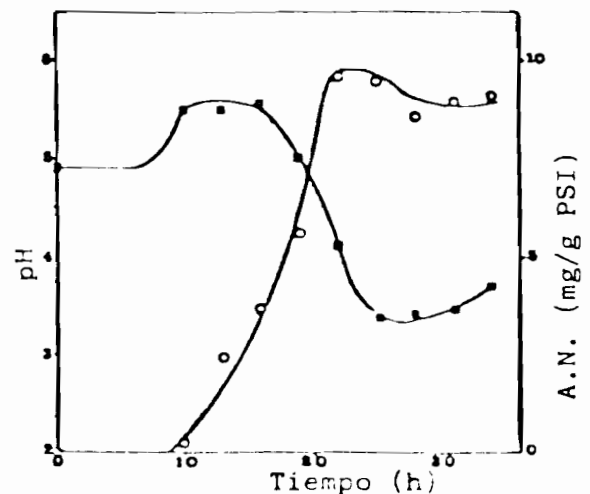


Fig. 3. Cinética de acidos nucleicos (—○—) y pH (—■—) durante el crecimiento de *A.niger* sobre almidón de yuca

El perfil de pH (Fig.3) muestra una ligera alcalinización durante las primeras 15 h, la cual se debe a la liberación de iones  $\text{NH}_4$  por hidrólisis de la urea. En una segunda fase, hay acidificación del medio en mayoría debida a la liberación de  $\text{CO}_2$ .

El incremento de proteínas medido por los A.A. totales después de 25 horas de cultivo dio un 15.7% PSI, elevando así el Rx a .284. Sin embargo, tal diferencia de resultados entre dos métodos de determinación de proteínas no es para extrañarse, Raimbault (1930) reportando una diferencia de aproximadamente 50% entre el método de Lowry (1951) y el método del nitrógeno total de Kjeldahl.

1.3. 2. Cultivos de A.niger con almidón de yuca y fibras de bagazo.

#### 1.3. 2. 1. Efecto del porcentaje de fibras

Fueron llevadas a cabo cinco fermentaciones con porcentajes de bagazo de 10 a 50% y una humedad inicial constante de 62%, los sales siendo añadidos en función de la harina en el medio. Los resultados están reportados en la tabla 1 donde podemos ver que la cantidad de proteínas disminuye conforme aumenta la concentración de bagazo en el medio con pequeñas variaciones en el Rx. Adn así, en todos los casos, las tasas de conversión (Ts) de sustrato son superiores a 70 % contra 58% con yuca sola lo que muestra que conforme la humedad aumenta, aumenta la utilización de sustrato.

En lo que se refiere a la síntesis de glucoamilasas, la introducción de fibras tiene un efecto positivo sobre todo si se considera el rendimiento por gramo de almidón de yuca en el medio, el óptimo situándose entre 30 y 40% de bagazo.

Tab. 1: Resultados obtenidos en los cultivos conteniendo diferentes porcentajes de fibras. (HI= 62%)\*

| de fibras | PPS<br>% | Xf-Xi<br>% | Si-Sf<br>% | Ts<br>% | Rx   | Act. glu.<br>(U.I./g PSI) | Act. glu.<br>(U.I./g yuca) |
|-----------|----------|------------|------------|---------|------|---------------------------|----------------------------|
| 10        | 23.4     | 15.01      | 57.5       | 73.9    | .261 | 388.5                     | 431.7                      |
| 20        | 22       | 12.01      | 55.1       | 78.5    | .218 | 369.3                     | 461.6                      |
| 30        | 16.9     | 9.50       | 44.4       | 71.2    | .213 | 354.9                     | 507.0                      |
| 40        | 15.2     | 9.96       | 38.4       | 70.7    | .259 | 287.8                     | 479.7                      |
| 50        | 11.2     | 9.39       | 40.1       | 87.2    | .234 | 129.5                     | 259.0                      |

Los resultados de proteínas y azúcares corresponden a 25 horas de fermentación y los resultados de glucoamilasas al máximo alcanzado durante las primeras 25 h de cultivo.

#### 1.3. 2. 2. Efecto del contenido de agua

Con el propósito de definir la influencia del contenido inicial de agua sobre la cinética de crecimiento de A.niger, se escogió un porcentaje de fibras de 20% que nos permitía trabajar con un amplio rango de humedades iniciales sin alterar la textura del sustrato. Se corrieron cinco fermentaciones con contenidos iniciales de agua de 42, 48, 55, 65 y 70% respectivamente. Las cinéticas de velocidad de

consumo de  $O_2$  y de consumo de  $O_2$  estar representadas en las Fig. 4 y 5.

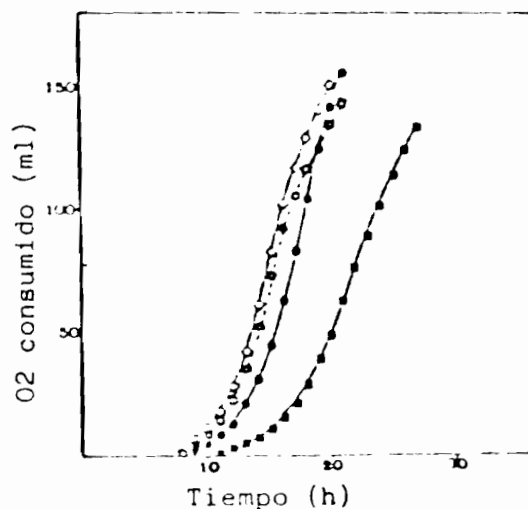
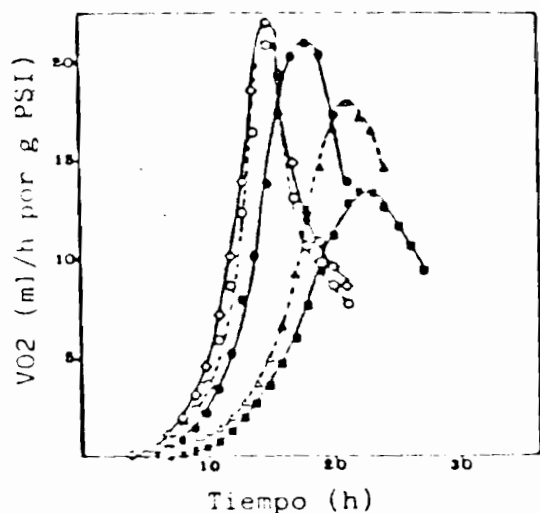


Fig. 4.: Velocidades de consumo de  $O_2$  observadas con diferentes contenidos de agua iniciales.

Fig. 5.: Cinéticas de consumo de  $O_2$  de *A. niger* observadas con diferentes contenidos de agua iniciales.

(—●—),  $H_i=42\%$ ; (—△—),  $H_i=48\%$ ; (—○—),  $H_i=55\%$ ; (—◊—),  $H_i=65\%$ ; (—◇—),  $H_i=70\%$

Podemos ver que un incremento de la cantidad de agua afecta drásticamente la cinética de crecimiento lo que se refleja en el  $\mu$  promedio observado durante la fase exponencial de crecimiento (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados de los cultivos con diferentes contenidos iniciales de agua (harina de yuca: 80%, bagazo: 20%)\*

| $H_i$<br>% | $T_f$<br>h | PPS<br>% | $X_f - X_i$<br>% | $S_f - S_i$<br>% | $T_s$<br>% | $R_x$ | $\mu$<br>$h^{-1}$ | Productividad<br>$h^{-1}$ (mg pr./gPSI/h) |
|------------|------------|----------|------------------|------------------|------------|-------|-------------------|---|
| 42         | 22.5       | 11.5     | 4.93             | 23.3             | 33.2       | .211  | .118              | 1.9                                       |
| 48         | 24         | 13.1     | 6.86             | 34.3             | 48.9       | .200  | .140              | 2.9                                       |
| 55         | 20         | 15.1     | 10.04            | 41.6             | 59.3       | .241  | .167              | 5.0                                       |
| 65         | 18         | 17.7     | 12.96            | 47.7             | 68.0       | .272  | .210              | 7.2                                       |
| 70         | 18         | 20.2     | 13.56            | 55.8             | 79.5       | .243  | .213              | 7.5                                       |

se consideró como tiempo final ( $T_f$ ) el tiempo correspondiendo a tres días después del tiempo de máxima actividad respiratoria.

En la Tabla 2 podemos observar que un incremento de la humedad inicial, además de modificar la productividad aumenta el consumo de azúcares y mejora así la cantidad de biomasa producida por 10 g de material seco empacado. Los  $R_x$  correspondiendo están parecidos a los observados con la sola yuca o en la Tabla 1. Estos resultados verifican la hipótesis de Raimbault (1920) según la cual el crecimiento de *A. niger* sobre almidón de yuca está limitado por el agua disponible en fin de

cultivo. Para varios autores como Narahara et col. (1982) y Sakurai et col. (1985), el concepto de actividad de agua (Aw) es mas importante que aquel de humedad. Nos quedaria por comprobar si la introducción de fibras modifica sensiblemente la evolución de la Aw del producto durante la fermentación.

Aunque la utilización de azúcares sea mayor con contenidos de agua superiores, el crecimiento se para existiendo todavia sustrato presente en el medio. Este nos hace suponer la existencia de otro(s) factor(es) limitante(s) como podrian ser la difusión intraparticularen (Moo-Young et col. 1982) o una densidad critica de micelio como propuesto por Laukevics et col. (1985).

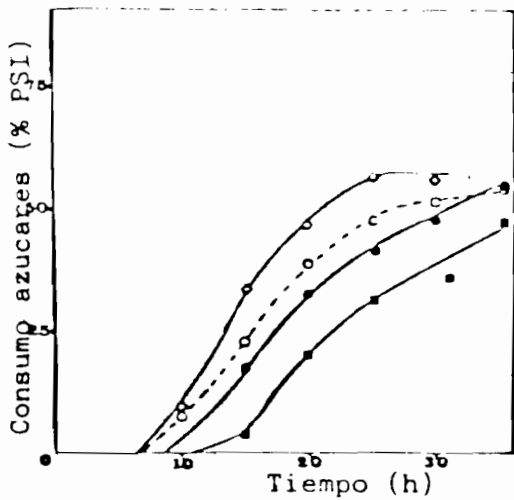


Fig. 6: Cineticas de consumo de azúcares *Aspergillus* observadas con diferentes contenidos de agua iniciales. (—■—), Hi=42%; (—○—), Hi=55%; (—□—), Hi=65%; (—◇—), Hi=70%

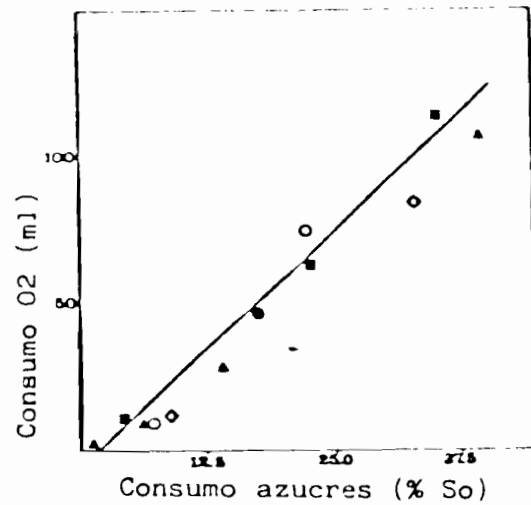


Fig. 7: Consumo de azúcares contra consumo de O<sub>2</sub> (datos obtenidos en los cultivos con diferentes niveles de agua iniciales)

Las cineticas de consumo de azúcares (Fig. 6) siguen el mismo perfil que las curvas de consumo de O<sub>2</sub> durante la fase de crecimiento y si se grafica el uno contra el otro (Fig. 7), encontramos una relación de 2.56 molas de O<sub>2</sub> consumidas por gramo de azúcar con una correlación de 0.961. Tomando en cuenta que en la reacción de respiración se necesitan 6 moléculas de O<sub>2</sub> para oxidar una molécula de glucosa, obtenemos que aproximadamente el 43% de la glucosa se consume en respiración. Este valor es cercano pero superior al valor de 35% reportado por Raimbault (1980) en su estudio esteoichiometrico de la fermentación sólida.



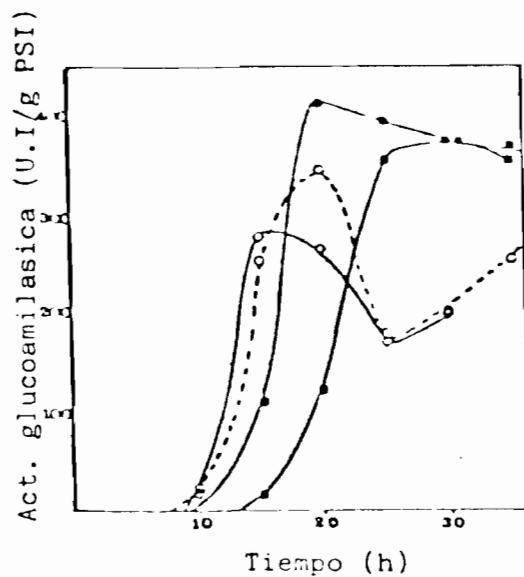


Fig. 8: Cineticas de producción de glucoamilasas obtenidas con diferentes niveles de agua iniciales. (—■—), Hi=42%; (---○---), Hi=55%; (·····△·····), Hi=65%; (-·-·-◇-·-·-), Hi=70%

Si se considera la producción de glucoamilasas, podemos observar en la Fig. 5 que sigue la curva de consumo de azúcares o la curva de consumo de  $O_2$ . En los cultivos conteniendo 65 y 70% de humedad aparece después de las 30 h una síntesis secundaria de glucoamilasas. Tal fenómeno había sido descrito por Alazard & Raimbault (1981) en cultivo sólido de *A.niger* sobre almidón de yuca. Esta síntesis, totalmente desligada del crecimiento, no fue reportada en medio líquido y entonces puede ser atribuida a la existencia de almidón residual.

Además de su efecto sobre la tasa de síntesis de enzima, la humedad inicial afecta la cantidad de enzima producida y la estabilidad de aquella, el óptimo situándose a 55%. Arriba de este valor, la producción es menor y la enzima parece ser menos estable. La existencia de un óptimo de humedad había sido reportado para la síntesis de amilasas (Narahara et col. 1982), de celulasas (Hoe Kim et col., 1985) y hidrolasas de la piel de naranja (Nishio et col., 1979). En lo que se refiere a la estabilidad de las glucoamilasas, conforme aumenta la humedad, parece que nos acercamos a las condiciones de fermentación sumergida donde las proteasas inactivan las glucoamilasas pasadas las 35 h de cultivo (Alazard & Raimbault, 1981)

### 1.3. 2. 3. Conclusiones

La introducción de fibras y por consecuencia de mas humedad en el medio acelera el proceso y incrementa el contenido proteínico gracias a una tasa de conversión del sustrato mas elevada. La productividad de proteína por g de peso seco aumenta también con el contenido de humedad inicial. Pero si se considera la productividad por reactor, la introducción de bagazo no es competitiva por la baja de densidad que este último provoca. Este inconveniente puede llegar a ser ventaja en el escalamiento del proceso puesto que la introducción de bagazo da una textura mas aireada al sustrato y

facilite así la remoción del calor por convección en el aire forzado a través la columna.

En lo que contempla la producción de glucoamilasas, se puso en evidencia un efecto benéfico de la introducción de bagazo sin que este pudiera ser relacionado al agua presente en el medio. Sato et col. (1922) reportan un fenómeno parecido en la producción de -amilasas y glucoamilasas por A.oryzae sobre salvado de trigo con pulpa de madera.

### 1.3. 3. Estudios de microcalorimetría

El microcalorímetro utilizado no contaba con una celda de flujo continuo, por lo cual los frascos tenían que ser sellados al principio del experimento. En estas condiciones, el crecimiento de los microorganismos aerobios puede ser rápidamente limitado por la concentración de  $O_2$  en el interior del frasco, lo cual nos obliga a utilizar pequeñas cantidades de sustrato. Un frasco contiene 3 ml de gas o sea 4.28 mg de  $O_2$  si se considera una presión parcial de  $O_2$  del 100%. Según Rimbault (1920) el  $Y_{O_2}$  de A.niger sobre almidón de yuca es de 1.55 g  $X/g S$ , lo que implica que la cantidad de  $O_2$  presente en el frasco es lo suficiente para producir  $4.28 \times 1.55 = 6.64$  mg de biomasa. Puesto que el rendimiento de transformación de azúcar a biomasa  $Y_x$  es de 0.55 g  $X/g S$ , la cantidad límite de sustrato presente en el frasco es de  $6.64/0.55 = 12.07$  mg. En consecuencia, el primer experimento se practicó con 10 mg de harina de yuca, esta cantidad representando apenas algunos granos en el fondo del frasco. Los termogramas obtenidos en las dos repeticiones están representados en la Fig. 9 donde se puede observar un buen paralelismo entre las dos curvas.

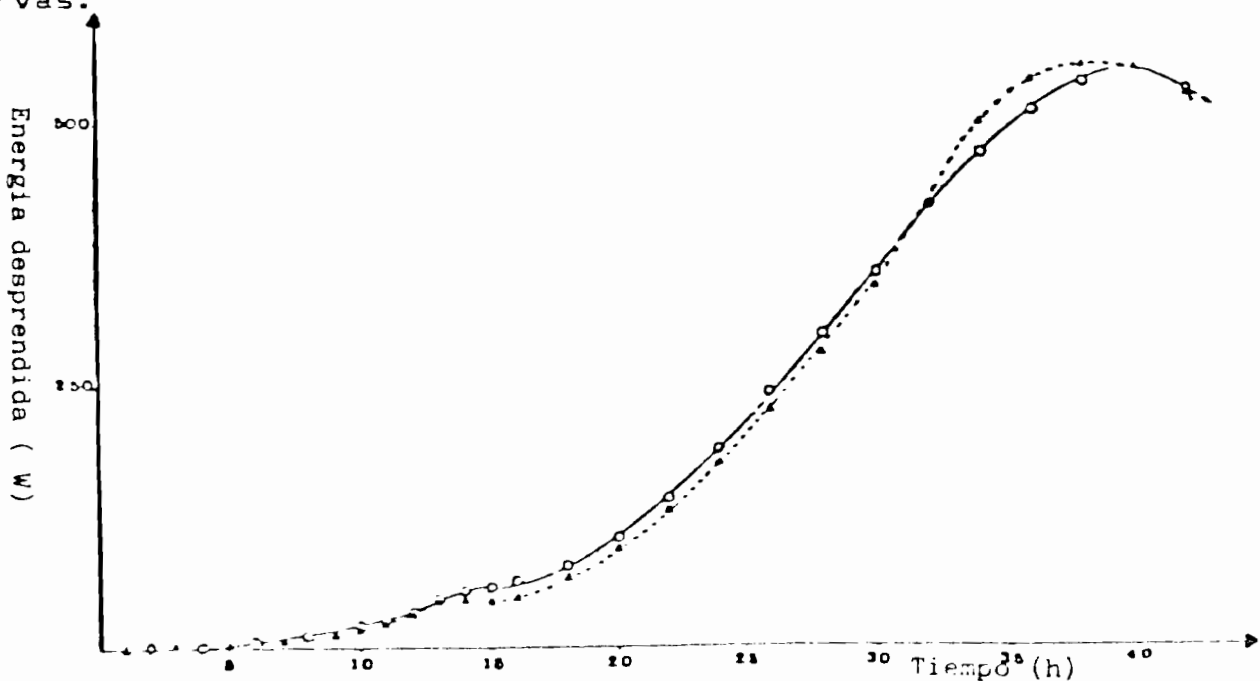


Fig. 9: Termogramas obtenidos durante el crecimiento de A.niger sobre almidón de yuca (10 mg)

El proceso es mas lento que cuando las fermentaciones toman lugar en columnas donde se puede observar un maximo de actividad respiratoria a las 25 h contra 33 h en este caso. Sin embargo, se puede destacar en los termogramas la existencia de un ligero brinco energético ocurriendo entre 11 y 15 h de cultivo.

Para poder medir este fenómeno con mas precisión, se realizó un experimento con 100 mg de sustrato, el  $O_2$  no siendo limitante hasta las 20 h en estas condiciones. La parte del termograma correspondiendo a las primeras 11 h del cultivo esta representada en la Fig. 10 donde el brinco energético es mucho mas claro.

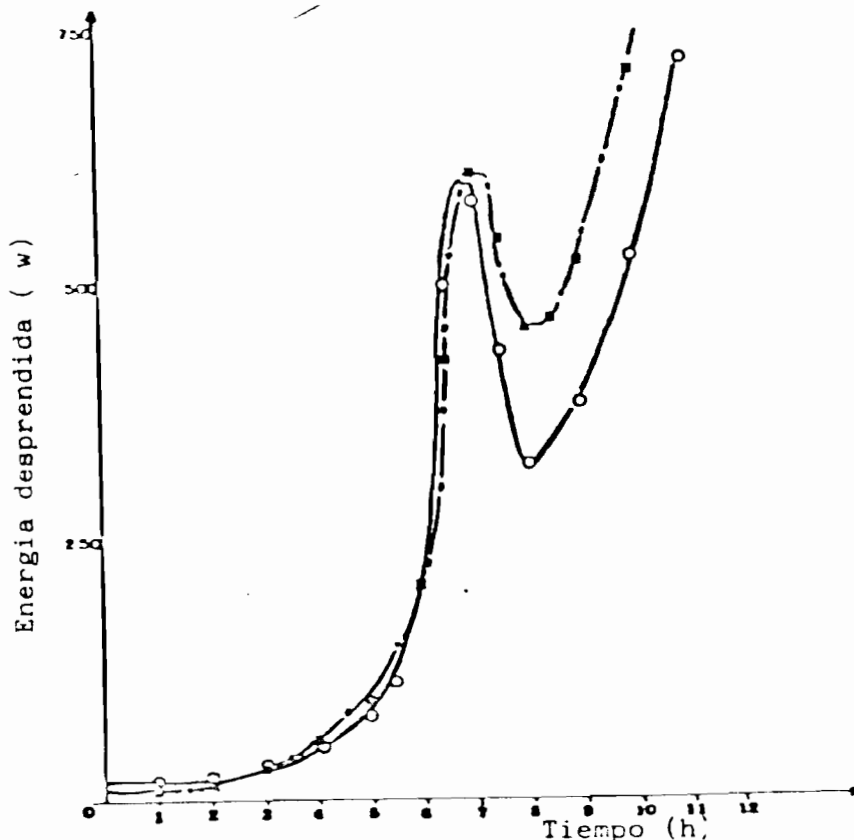


Fig. 10: Parte de los termogramas obtenidos durante el crecimiento de A. niger sobre almidón de yuca (100 mg)

En este termograma, el fenómeno ocurre las 6 y 8 h, mas temprano que en el primer experimento. Esta diferencia se puede explicar por la muy baja cantidad de sustrato y de inoculo ( $2 \times 10^8$  esporas) presente en el primer caso donde, al parecer, se alcanza una limite física del sistema. En el secundo experimento, la observación microscopica de un frasco tomado durante el pico nos muestra esporas germinadas, en fase homogénea en un 90% presentando un tubo germinativo de mas o menos cinco veces el tamaño de la espora. El periodo de entre 6 y 8 h corresponde al fin de la fase de germinación. Huerta et col. (1935) habian ya observado durante este periodo un cambio metabólico traducido por una baja drástica de los rendimientos intrínsecos. Habian sugerido para explicar esta baja la hipótesis del pase de una fase de germinación mayormente endógena a una fase de crecimiento exponencial exógena. La existencia de etapas de activación y germinación diferentes nutricionalmente habia sido descrita por

Sussman (1965) con Neurospora tetrasperma quien habia también puesto en evidencia la utilización de lípidos y azúcares endógenos en esporas activadas. Este experimento de microcalorimetría parece confirmar la existencia de una fase transitoria del crecimiento y del metabolismo hasta ahora no observada en gasometría.

Si nos interesamos a los rendimientos energéticos globales del crecimiento calculados a partir de la área por debajo de la curva (Fig. 9) se obtiene la cantidad de 7.352 calorías liberadas en 43 h. Considerando que de 10 mg, 8 mg son almidón y que el consumo de azúcares es del 60% (ref. III. 1. 1.), podemos estimar el consumo de almidón en 4.8 mg o sea 5.05 mg de glucosa (tomando en cuenta el agua de hidrólisis). La reacción de respiración produce la mayor parte de la energía liberada durante el crecimiento y si se calcula la cantidad de energía por mola de glucosa consumida, se obtiene el valor de:

$$7.352 \times 10^3 \times 180/5.05 = 262 \text{ Kcal/ mola de glucosa}$$

Raimbault (1980) en el estudio de la estequiometría del crecimiento de A.niger habia calculado que el 35% de la glucosa era oxidada en el proceso de respiración. Puesto que la reacción de oxidación libera 673 Kcal, cantidad que varia poco entre los microorganismos, una mola de glucosa produciria  $673 \times 0.35 = 235.5$  Kcal. La cantidad de energía liberada que determinamos mediante los termogramas es de 262 Kcal/M muy cerca del valor teórico.

## II. CULTIVOS SOBRE SOPORTES IMPREGNADOS

### II.1. Introducción

Con la anterioridad del trabajo hecho con yuca y bagazo, surgió la idea de utilizar un sustrato no mezclado con el soporte pero al estado disuelto y absorbido sobre un soporte inerte. Tal proceso nos permitiría conocer mejor el cultivo sólido y establecer comparaciones más claras con el cultivo sumergido por las siguientes razones:

- se pueden utilizar en las condiciones de fermentación sólida medios ya descritos en la literatura para las fermentaciones sumergidas.
- se pueden practicar fermentaciones sólidas con azúcares simples, evitando así los pasos de difusión de las exoenzimas hidrolíticas adentro de la matriz sólida.

- se separa el sustrato del soporte y se acerca de esta manera a las fermentaciones líquidas con hongos filamentosos inmovilizados reportadas en la literatura.

- existe un método sencillo de recuperación de los metabolitos extracelulares que logra obtener soluciones con alta concentración de producto (ref. producción-extracción de celulasas; Roussos (1985)), facilitando de esta manera la comparación con los rendimientos volumétricos obtenidos en fermentación sumergida.

La idea de practicar cultivos en medio sólido sobre soportes ha sido llevada a cabo por algunos autores: Lakshminarayana et col. (1975) produjeron ácido cítrico a partir de melaza absorbida sobre bagazo de caña con A. niger, Sato et col. (1983) utilizaron una solución de glucosa absorbida sobre pulpa de madera como modelo para el crecimiento en medio sólido de levaduras.

La literatura es escasa sobre las condiciones de cultivo de hongos filamentosos sobre soporte, así que se tenían que establecer los criterios para este tipo de cultivo. Había ante todo que escoger un soporte y, habiendo ya usado bagazo de caña como reservatorio de agua en el enriquecimiento proteínico de la yuca, este soporte nos pareció idóneo para empezar este trabajo. Con este soporte impregnado de una solución de sales, de glucosa y inoculado con esporas, se corrieron varias fermentaciones con Aspergillus niger variando diferentes parámetros y midiendo el comportamiento del hongo.

### II. 2. Material y métodos

#### II. 2. 1. Material bruto

El soporte utilizado fue bagazo de caña, esencialmente constituido por médula y obtenido del Ingenio de Zacatepec (Mor.). Este bagazo contiene aproximadamente 10% de azúcares residuales que un lavado permitió eliminar en un 80%. Este bagazo ha sido tamizado, utilizando salvo especificaciones la fracción de 20-50 mesh.

#### II. 2. 2. Conservación de la cepa y obtención de esporas.

#### Ref. I. 2. 2.

#### II. 2. 3. Método de cultivo

El método de cultivo es una adaptación de aquel propuesto por Rainbault et col. (1980). El bagazo está impregnado y mezclado con el 50% del agua conteniendo la glucosa disuelta, la mezcla siendo esterilizada al autoclave durante 15 mn a 115°C para evitar toda contaminación ulterior por la microflora del bagazo. Por otra parte las sales se disuelven en los otros 50% de agua y después de la adición de las esporas el pH se ajusta a 2.7. El bagazo impregnado se enfría y se inocula con las esporas en suspensión en la solución salina. El material inoculado se envasa después en columnas de vidrio a razón de 10 a 20 g por columna dependiendo de la densidad del material. Las columnas aeradas se ponen en un baño de agua termostataado a 35°C (ref. Rainbault et col. 1980). La composición del medio salino es la siguiente:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 9.8 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.0 g; Urea, 2.4 g por 100 g de glucosa. Salvo especificación el tamaño de inóculo fue de  $2 \times 10^7$  esporas por grano de soporte.

#### II. 2. 4. Métodos de análisis

##### II. 2. 4. 1. Gasometría

Ref. I. 2. 4. 1.

##### II. 2. 4. 2. Análisis de las muestras de fermentación.

Ref. I. 2. 4. 2.

Para el análisis de la glucosa, las muestras fueron diluidas en agua (25 veces) y homogeneizadas por medio de un UltraTurrax<sup>®</sup>. Luego los homogeneizados fueron centrifugados y la glucosa se determinó directamente sobre el sobrenadante por el método de Miller (1959).

##### II. 2. 4. 3. Microcalorimetría

ref. I. 2. 4. 2.

#### II. 3. Resultados

II. 3. 1. Estudio de los parámetros en las fermentaciones de A. niger sobre bagazo de caña impregnado.

##### II. 3. 1. 1. Humedad

En cultivo sumergido, todos los microorganismos son sensibles con diferentes grados a la presión osmótica (P.O.) de la solución nutritiva. Para evitar que la P.O. interfiera en nuestro estudio, fijamos la concentración de la solución de glucosa a 163 g/l y lo único que hicimos variar para trabajar a diferentes humedades fue la relación agua/bagazo. En la tabla 3 están los datos para las seis relaciones utilizadas que corresponden a un rango de humedad inicial del 40 al 75%.

Tabla 3: Datos obtenidos con diferentes relaciones agua/bagazo.

| Relación agua/bagazo | Humedad inicial % | Tiempo de actividad respiratoria max. h | VO <sub>2</sub> max * | mu h <sup>-1</sup> |
|----------------------|-------------------|---|-----------------------|--------------------|
| 0.77                 | 40                | 16.0                                    | 30.6                  | .166               |
| 1.21                 | 50                | 15.5                                    | 41.6                  | .150               |
| 2.00                 | 60                | 13.5                                    | 46.6                  | .179               |
| 2.76                 | 65                | 13.0                                    | 48.9                  | .182               |
| 3.94                 | 70                | 15.0                                    | 37.9                  | .153               |
| 5.19                 | 75                | 15.5                                    | 38.3                  | .175               |

\*: Velocidad máxima de consumo de O<sub>2</sub> (ml/h por 1g glucosa)

En esta tabla se puede apreciar que la relación agua/bagazo no tiene una influencia clara sobre la velocidad máxima de consumo de O<sub>2</sub>, así como sobre la tasa de crecimiento calculada. Una mayor relación agua/bagazo parece solamente acortar el tiempo de fermentación por el efecto de una germinación mas temprana. Para los estudios siguientes utilizamos una relación de 2.76 correspondiendo al tiempo de cultivo el mas corto.

### II. 3. 1. 2. Concentración de glucosa en la solución.

Guardando una relación agua/bagazo de 2.7, se probaron varias concentraciones de glucosa en la solución de impregnación, desde 37 hasta 477 g/l. En las fig. 11 y 12 están representadas las curvas de velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y las curvas de consumo de O<sub>2</sub> por 1 g de glucosa.

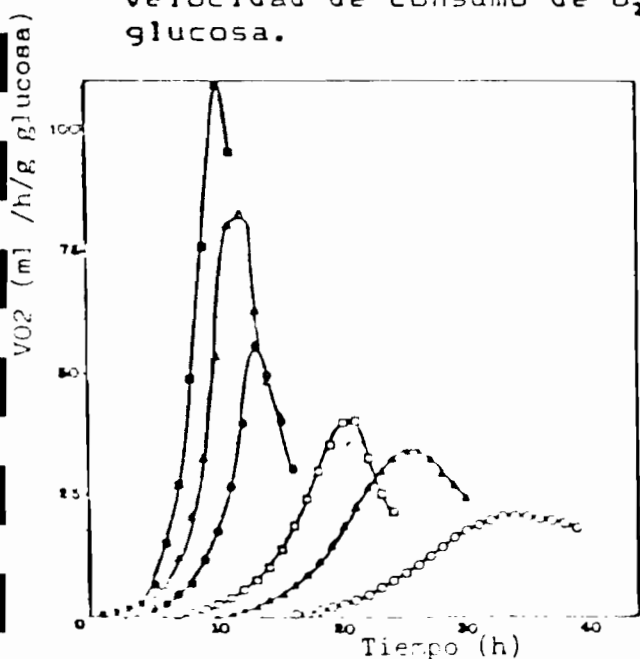


Fig. 11: Velocidades de consumo de O<sub>2</sub> observadas con diferentes concentraciones de glucosa en la solución de impregnación

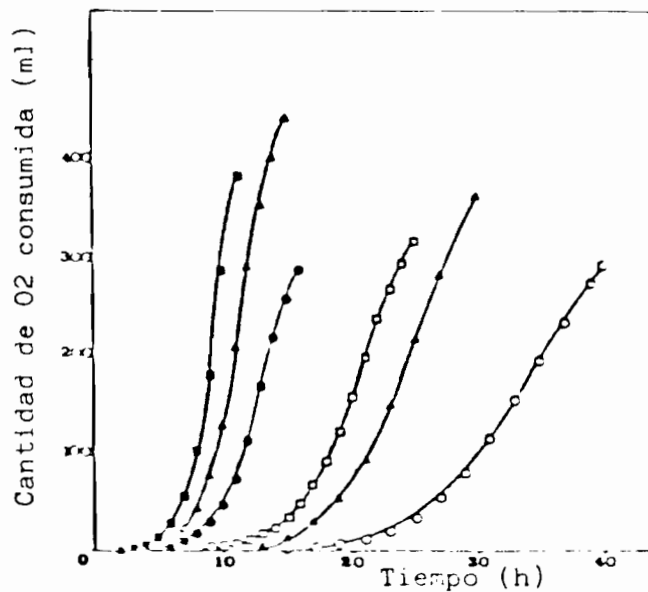


Fig. 12: Cinéticas de consumo de O<sub>2</sub> observadas con diferentes concentraciones de glucosa en la solución de impregnación

(-o-), 36 g/l; (-Δ-), 57 g/l; (-●-), 167 g/l; (-□-), 260 g/l; (-▲-), 330 g/l; (-○-), 417 g/l.

Estas figuras indican que un aumento en la concentración de glucosa afecta drásticamente las velocidades de crecimiento del hongo. El  $\mu$  promedio reportado como función de la concentración de glucosa sigue una recta de pendiente negativa entre 56 y 477 g/l (Fig.13). Un incremento de la concentración de azúcar produce un aumento proporcional de la presión osmótica de la solución así como una disminución de la  $A_w$  del sustrato, por lo cual resultaría interesante estudiar estos dos fenómenos por separado (trabajando con sales inorgánicas para aumentar la P.O. y polioles no metabolizables para bajar la  $A_w$  sin mover la concentración de sustrato). Podemos pensar que esta pendiente es representativa de la osmotolerancia de la cepa utilizada pues el intercepto de la recta con el eje de los abscisas no indica una concentración de inhibición de 536 g/l muy cerca de los valores de 600 g/l reportados en la literatura.

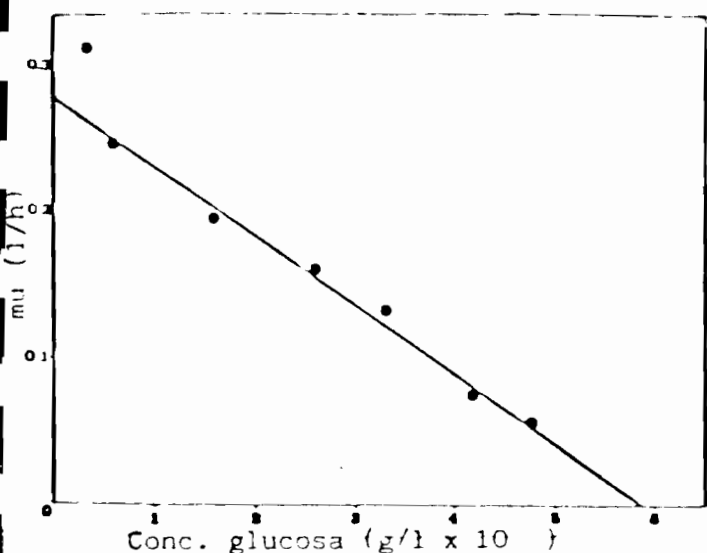


Fig. 13: Representación del  $\mu$  como una función de la concentración de glucosa en la solución de impregnación

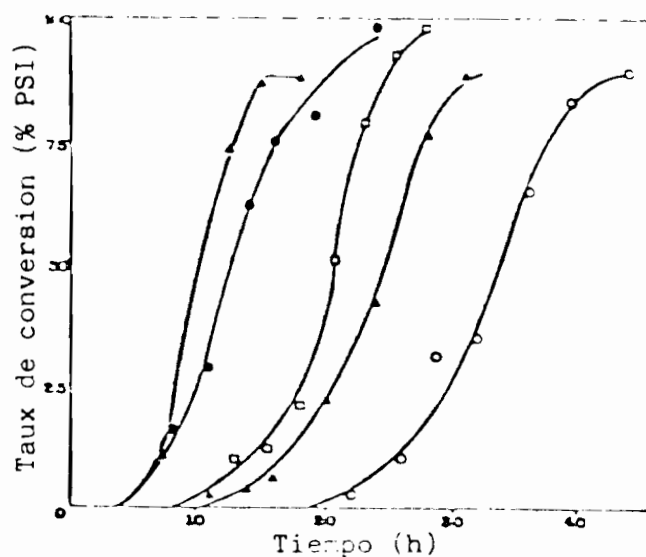


Fig. 14: Cinéticas de consumo de azúcar observadas con diferentes concentraciones de glucosa en la solución de impregnación  
 (- $\Delta$ -), 57 g/l; (- $\circ$ -), 167 g/l;  
 (- $\square$ -), 260 g/l; (- $\triangle$ -), 330 g/l;  
 (- $\circ$ -), 417 g/l.

La curva acumulada de consumo de  $O_2$  (Fig. 12) presenta un perfil parecido a la curva de consumo de azúcares (Fig. 14). La relación  $O_2$ /azúcar consumido parece constante a través de los aumentos de concentración de azúcar.



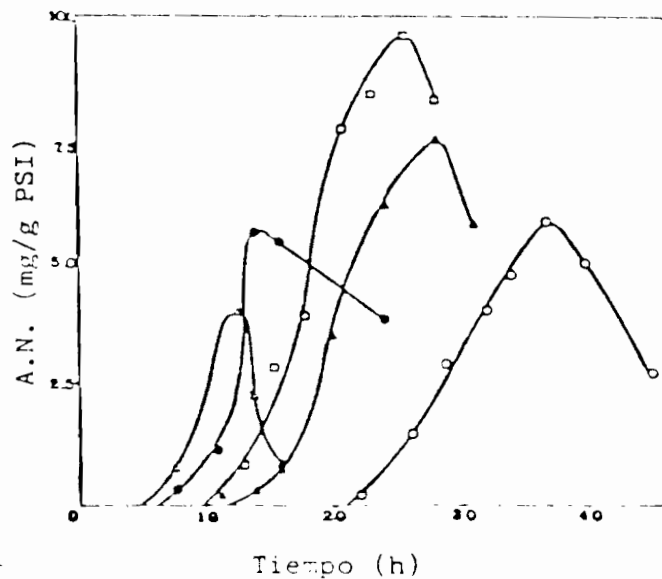


Fig. 15: Cineticas de acidos nucleicos observadas con diferentes concentraciones de glucosa en la solución de impregnación  
 (-Δ-), 57 g/l; (-○-), 167 g/l  
 (-□-), 260 g/l; (-▲-), 330 g/l;  
 (-○-), 417 g/l.

La Fig. 15 muestra las cineticas de los acidos nucleicos y se puede observar que las cantidades maximas de ARN producidas son dependientes de la concentración de azucar pero también de la velocidad de crecimiento, el maximo siendo sintetizado con 260 g/l. En las fermentaciones con 330 y 417 g/l se produce más biomasa (Tab. 4) pero menos ARN fue detectado, lo cual se puede atribuir a una baja tasa de crecimiento.

Tabla 4: Datos obtenidos en cultivos de *A. niger* con diferentes concentraciones de glucosa en la solución de impregnación (Tamaño de partícula = 20X<50 mesh, relación agua/bagazo = 2.7, tamaño de inoculo =  $2 \times 10^7$  esporas / g de soporte)

| Conc. de glucosa (g/l) | Inc. de proteínas (% psi) | Consumo azucares (% psi) | Rx   | V O <sub>2</sub> max. * | Tf (h) | PPS (%) | Nu (h <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|------|-------------------------|--------|---------|-----------------------|
| 57                     | 2.72                      | 12.91                    | .210 | 85.3                    | 11.5   | 11.6    | .244                  |
| 167                    | 5.33                      | 26.80                    | .199 | 55.6                    | 15.0   | 15.7    | .194                  |
| 260                    | 7.81                      | 41.56                    | .188 | 48.9                    | 22.0   | 17.3    | .142                  |
| 330                    | 8.83                      | 45.09                    | .197 | 34.3                    | 26.5   | 18.9    | .114                  |
| 417                    | 10.28                     | 50.56                    | .203 | 20.5                    | 31.0   | 19.0    | .073                  |

\*: Velocidad maxima de consumo de O<sub>2</sub> (ml/h por 1g glucosa)

Si se considera la cantidad de proteína alcanzada al fin de la fermentación (Tab.4) se puede destacar que aumenta con la concentración de glucosa en la solución con rendimientos de transformación parecidos. Aún con concentraciones de glucosa altas, la degradación de los azucares (ref. fig.14) es muy rápida, mas del

83% de los azúcares siendo consumidos a las 40 horas con una concentración de 417 g/l en la solución de impregnación. Datos de fermentación sumergida obtenidos con *Tricholoma nudum* (Reusser et col. (1958) según Solonons (1974)) muestran que un aumento de la concentración de melaza (de 59.6 a 120 g de azúcar/l) produce un decremento del  $\mu$  y del rendimiento de transformación de azúcar a biomasa, este último pudiendo ser atribuido a una limitación en  $O_2$ . En cultivo sólido, aun con concentraciones en la fase líquida 3 a 4 veces más elevadas, no se presentaron variaciones significativas del Rx como del  $R_{O_2}$  conforme aumenta la concentración de azúcar.

### II. 3. 1. 3. Tamaño de fibras del soporte

Fijando una relación agua/bagazo de 2.7 y una concentración de glucosa de 280 g/l se corrieron cinco experimentos con tamaño de fibras de 10 a 150 mesh. Se comprobó antes del experimento que la concentración de azúcares en las diferentes fracciones era muy similar. En la Fig. 16 están representadas las velocidades de consumo de  $O_2$  y se pueden observar perfiles parecidos en un principio (fases de germinación y de crecimiento exponencial) variando únicamente al fin de cultivo, siendo los máximos más elevados y las curvas más agudas cuando se disminuye el tamaño de partícula. Esto significaría que el tamaño de partícula afecta el tipo de cinética sobre todo en las últimas horas de la fermentación, el acceso al sustrato presente en el corazón de la fibra dificultándose al fin del crecimiento conforme su tamaño aumenta.

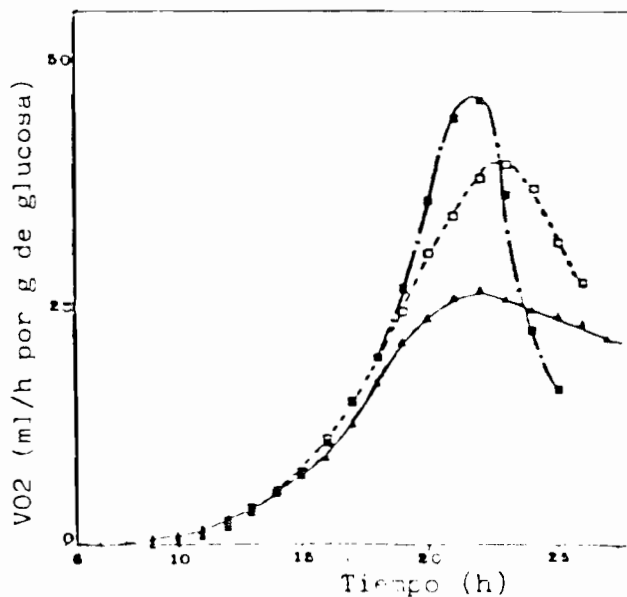


Fig.16: Efecto del tamaño de partícula sobre las velocidades de consumo de  $O_2$   
 (-△-),  $10 < X < 20$ ;  
 (-○-),  $10 < X < 20$ ;  
 (-■-),  $30 < X < 50$ ;

Los datos de análisis finales sobre las muestras de 25 h no muestran variaciones significativas sobre la cantidad de biomasa sintetizada así como sobre los Rx. El efecto del tamaño de fibras solo es notable

en el experimento con fibras superiores a 10 mesh donde el nivel de biomasa sintetizada es inferior a los demás experimentos. Se hubiera necesitado seguir muy de cerca las cinéticas de biomasa y consumo de azúcares para comprobar los fenómenos observados con los  $VO_2$  (Fig.16).

Tabla 5 : Efecto del tamaño de fibras del bagazo sobre la cinética de *A. niger* ( glucosa = 250 g/l, relación agua/bagazo= 2.7, Inoculo=  $2 \times 10^7$  esporas /g de soporte)

| Tamaño de fibras (mesh) | Inc. de proteínas (% psi) | Consumo azúcares (% psi) | Rx  | $VO_2$ max * | Tiempo de Act. resp. maxima (h) | $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-----|--------------|---------------------------------|--------------------------|
| < 10                    | 6.85                      | 37.74                    | .18 | 26.0         | 22                              | .129                     |
| 10<X<20                 | 8.46                      | 39.23                    | .21 | 39.3         | 23                              | .139                     |
| 20<X<30                 | 8.00                      | 43.11                    | .18 | 40.2         | 22                              | .136                     |
| 30<X<50                 | 8.77                      | 37.82                    | .23 | 47.5         | 22                              | .152                     |
| X>150                   | 8.04                      | 36.32                    | .22 | 45.6         | 22                              | .148                     |

\* : ml  $O_2$ / h por 1 g de glucosa

#### II. 3. 1. 4. Concentración de inoculo

Fijando una relación agua/bagazo de 2.7 y una concentración de glucosa de 168 g/l en la solución de impregnación, se corrieron cinco experimentos con diferentes concentraciones de inoculo desde  $8 \times 10^6$  hasta  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de soporte. En la Fig.17 estan representadas las velocidades de consumo de  $O_2$  y se puede observar que conforme aumenta el tamaño de inoculo, las cinéticas tienden a ser mas rapidas. Un aumento del tamaño de inoculo tiene influencia sobre el  $\mu$  pero el efecto es mas claro sobre el tiempo de fermentación, existiendo una relación lineal entre el numero de esporas y el tiempo de maxima actividad respiratoria (Fig. 18). Esta relación sigue con inoculos superiores a  $1 \times 10^6$ / g, tamaños de inoculo por los cuales Raimbault et col. (1960) pusieron en evidencia un efecto de inhibición sobre almidón de yuca. La existencia de un inhibidor de germinación de *A.niger* esta conocida de muchos años (Krishnan et col. (1954)) y datos recientes (Barrios et col. 1986) muestran que el efecto de inhibición es menos pronunciado cuando se usa glucosa como fuente de carbono que en el caso del almidón. Esos autores piensan que el inhibidor tiene alguna efecto sobre la síntesis de las glucosaminasas o su acción.

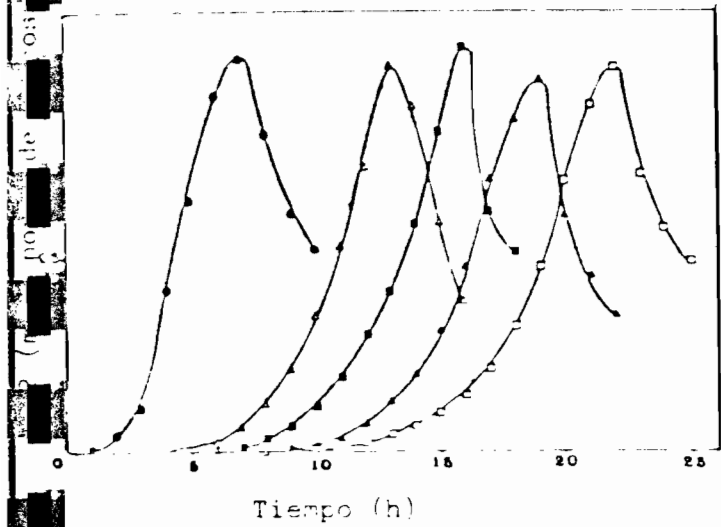


Fig. 17: Influencia del tamaño de inoculo sobre las velocidades de consumo de  $O_2$   
 (-□-),  $8 \times 10^9$ ; (-▲-),  $4 \times 10^9$ ;  
 (-■-),  $2 \times 10^9$ ; (-△-),  $1 \times 10^9$ ;  
 (-○-),  $1 \times 10^7$ .

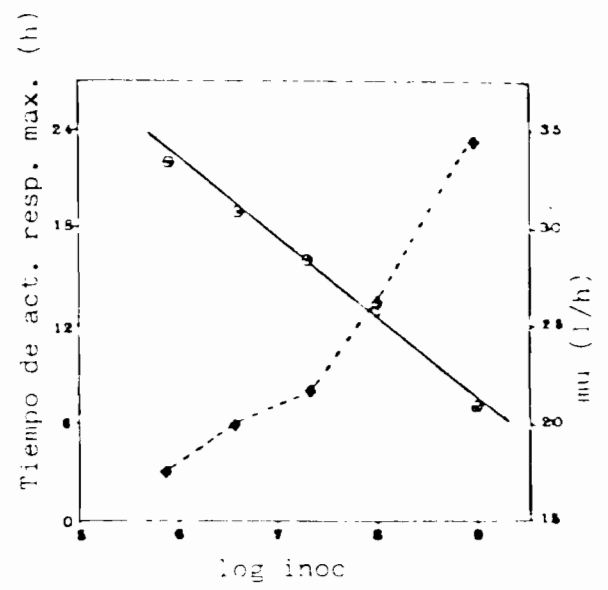


Fig. 18: Tiempo de máxima actividad respiratoria y  $\mu$  contra concentración de inoculo

. En lo que se refiere a la utilización del sustrato y al rendimiento de biomasa (Tab. 6), los resultados están muy similares entre todos los experimentos, el contenido proteínico ligeramente más alto de la muestra inoculada con  $1 \times 10^9$  pudiendo ser atribuido a las esporas germinadas y al estado de desarrollo menos avanzado del micelio.

Tab. 6: Efecto del tamaño de inoculo sobre la cinética de *A. niger* (Tamaño de fibras, 20X $\times$ 50 mesh, glucosa = 167 g/l, relación agua/bagazo = 2.7)

| Tamaño de Inc. de inoculo | Consumo proteínas (% psi) | Consumo azúcares (% psi) | Rx   | $VO_2$ max * | Tiempo de act. resp. max (h) | $\mu$ ( $h^{-1}$ ) |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------|--------------|------------------------------|--------------------|
| $8 \times 10^9$           | 5.19                      | 24.98                    | .208 | 39.3         | 22                           | .174               |
| $4 \times 10^9$           | 5.21                      | 26.81                    | .194 | 41.8         | 19                           | .199               |
| $2 \times 10^9$           | 5.32                      | 26.80                    | .199 | 42.1         | 16                           | .217               |
| $1 \times 10^9$           | 5.11                      | 31.10                    | .164 | 40.8         | 13                           | .257               |
| $1 \times 10^7$           | 6.27                      | 32.56                    | .192 | 42.7         | 7                            | .344               |

\* : ml  $O_2$ / h para 1 g de glucosa

II. 3. 1. 5. Importancia de cada factor e interrelaciones entre factores: plan de experimentos.

Con el proposito de determinar la importancia relativa de cada factor estudiado asi como de sus interacciones, se diseño un plan de experimentos factorial con cuatro factores y dos niveles por factor. Las variables estudiadas asi como sus niveles respectivos estan representados en la Tabla 7.

Tabla 7: Factores estudiados con sus diferentes niveles.

| Factor                               | Nivel -         | Nivel +         |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| A: Tamaño de inóculo (/g de soporte) | $2 \times 10^4$ | $2 \times 10^6$ |
| B: Concentración de glucosa (g/l)    | 50              | 330             |
| C: Tamaño de fibra (mesh)            | 10<X<20         | 50<X<150        |
| D: Relación agua/bagazo (P/P)        | 2               | 4               |

La matriz siguiente corresponde a la primera mitad del plan factorial:

|                       | Factor |   |   |   | Nº exp. |
|-----------------------|--------|---|---|---|---------|
|                       | A      | B | C | D |         |
| Niveles<br>estudiados | +      | + | + | + | 1       |
|                       | -      | - | - | - | 2       |
|                       | -      | - | + | + | 3       |
|                       | -      | + | - | + | 4       |
|                       | +      | - | + | - | 5       |
|                       | +      | + | - | - | 6       |
|                       | -      | + | + | - | 7       |
|                       | +      | - | - | + | 8       |

Las respuestas consideradas y reportadas en la Tabla 8 fueron: el tiempo de máxima actividad respiratoria, la velocidad máxima de consumo de  $O_2$  (ml/h por gramo de glucosa psi), la biomasa producida, cosechada 2 h después del tiempo de máxima actividad respiratoria y medida por los amino ácidos totales, el consumo de azúcares a este tiempo, la pérdida de peso seco (PPS), la velocidad específica de crecimiento promedio  $\mu$  y el rendimiento final de transformación de azúcares a biomasa (Rx).

Tabla 8: Respuestas observadas en la primera mitad del plan factorial

| EXPERIM. | Consumo azucares (%) | Inc.de proteínas (%) | V O <sub>2</sub> <sup>*</sup> | PPS (%) | RX    | Mu (h <sup>-1</sup> ) | TF (h) |
|----------|----------------------|----------------------|-------------------------------|---------|-------|-----------------------|--------|
| 1        | 39.64                | 10.70                | 23.2                          | 15.5    | .270  | .200                  | 24     |
| 2        | 7.41                 | 0.78                 | 77.8                          | 7.1     | .105  | .379                  | 15     |
| 3        | 20.68                | 3.74                 | 70.7                          | 13.0    | .181  | .319                  | 19     |
| 4        | 52.93                | 9.66                 | 25.7                          | 14.8    | .183  | .187                  | 37     |
| 5        | 7.86                 | 1.09                 | 79.0                          | 6.6     | .139  | .560                  | 8      |
| 6        | 36.90                | 8.20                 | 25.9                          | 10.1    | .223  | .213                  | 24     |
| 7        | 37.25                | 9.43                 | 31.9                          | 10.1    | .253  | .204                  | 35     |
| 8        | 16.32                | 3.39                 | 83.3                          | 4.0     | .208  | .493                  | 10     |
| SUM.     | 218.89               | 46.99                | 417.5                         | 81.2    | 1.562 | 2.560                 | 172    |
| PROM.    | 27.36                | 5.87                 | 52.2                          | 10.2    | .195  | .32                   | 21.5   |

\* Velocidad máxima de consumo de O<sub>2</sub> (ml/h por g de glucosa)

El calculo de la influencia de cada factor asi como de las interacciones entre esos diferentes factores esta reportado en la tabla 9, para tener mas claridad en la explotación de los resultados, en la Tabla 10 los mismos resultados estan siendo expresados en % de la respuesta promedio. Consideramos que un factor influye significativamente cuando la combinación de sus respuestas es superior al 20 % de la respuesta promedio (porcentajes subrayados).

Tabla 9: Combinaciones de las respuestas para cada factor y interacciones entre dos factores.

| Respuesta            | Promedio | A      | B      | C      | D      | AB     | AC     | AD     |
|----------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tf (h)               | 21.5     | - 5.0  | + 8.5  | 0.0    | + 1.0  | - 1.0  | - 0.5  | - 0.5  |
| Mu (1/h)             | .320     | +0.042 | -0.119 | -0.001 | -0.019 | -0.042 | +0.012 | 0.000  |
| Rx (%)               | .195     | +0.015 | +0.037 | +0.015 | +0.015 | 0.000  | +0.021 | +0.014 |
| Prot. (%)            | 5.87     | -0.03  | +3.62  | +3.70  | +1.00  | -0.19  | +0.22  | +0.20  |
| V O <sub>2</sub> max | 52.2     | + 0.7  | -25.5  | - 0.1  | - 1.5  | - 2.8  | - 0.8  | + 1.9  |
| PPS (%)              | 10.2     | - 1.1  | + 2.5  | + 1.1  | + 0.2  | + 1.3  | + 0.9  | - 1.0  |

Tabla 10 : Combinaciones de las respuestas para cada factor y interacciones entre dos factores expresadas en porcentaje del promedio de cada respuesta.

| Respuesta            | Promedio | A            | B            | C     | D     | AB    | AC    | AD    |
|----------------------|----------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tf (h)               | 100      | <u>-23.3</u> | <u>+39.5</u> | 0.0   | + 4.7 | - 4.7 | - 2.3 | - 2.3 |
| Mu (1/h)             | 100      | +15.0        | <u>-37.2</u> | - 0.3 | - 5.9 | -13.1 | + 3.3 | 0.0   |
| Rx (%)               | 100      | + 7.7        | +19.0        | + 7.7 | + 7.7 | 0.0   | +10.8 | + 7.1 |
| Prot. (%)            | 100      | - 0.5        | <u>+61.2</u> | + 6.3 | +17.0 | - 3.2 | + 5.5 | + 3.4 |
| V O <sub>2</sub> max | 100      | + 1.3        | <u>-48.9</u> | - 0.2 | - 2.8 | - 5.4 | - 1.5 | + 3.5 |
| PPS (%)              | 100      | -10.8        | <u>+24.4</u> | +11.1 | + 1.7 | +12.5 | + 3.5 | - 9.4 |

La lectura de estas tablas nos indica que el factor que más influencia tiene es el factor B o sea la concentración de azúcar en el medio. Un incremento de la concentración aumenta el tiempo de fermentación, disminuye el  $\mu$ , aumenta el contenido de biomasa final, disminuye la velocidad máxima de consumo de  $O_2$  por gramo de glucosa y aumenta la pérdida de peso seco. Eso confirma los resultados obtenidos en los estudios por factor (II. 3. 1. 2.)

El tamaño de inóculo evidentemente tiene influencia sobre el tiempo de cultivo y un efecto al límite de la significación pero positivo (15 %) sobre la velocidad de crecimiento.

La relación agua/bagaño tiene un efecto ligero y beneficioso (17%) sobre el nivel de biomasa final.

El tamaño de fibras del bagaño no demostró tener efecto alguno sobre las respuestas consideradas, confirmando de esta manera los resultados obtenidos durante los estudios de los factores por separado.

No se pudo poner en evidencia alguna interacción significativa de los variables de cultivo estudiadas.

### II. 3. 2. Estudios de microcalorimetría.

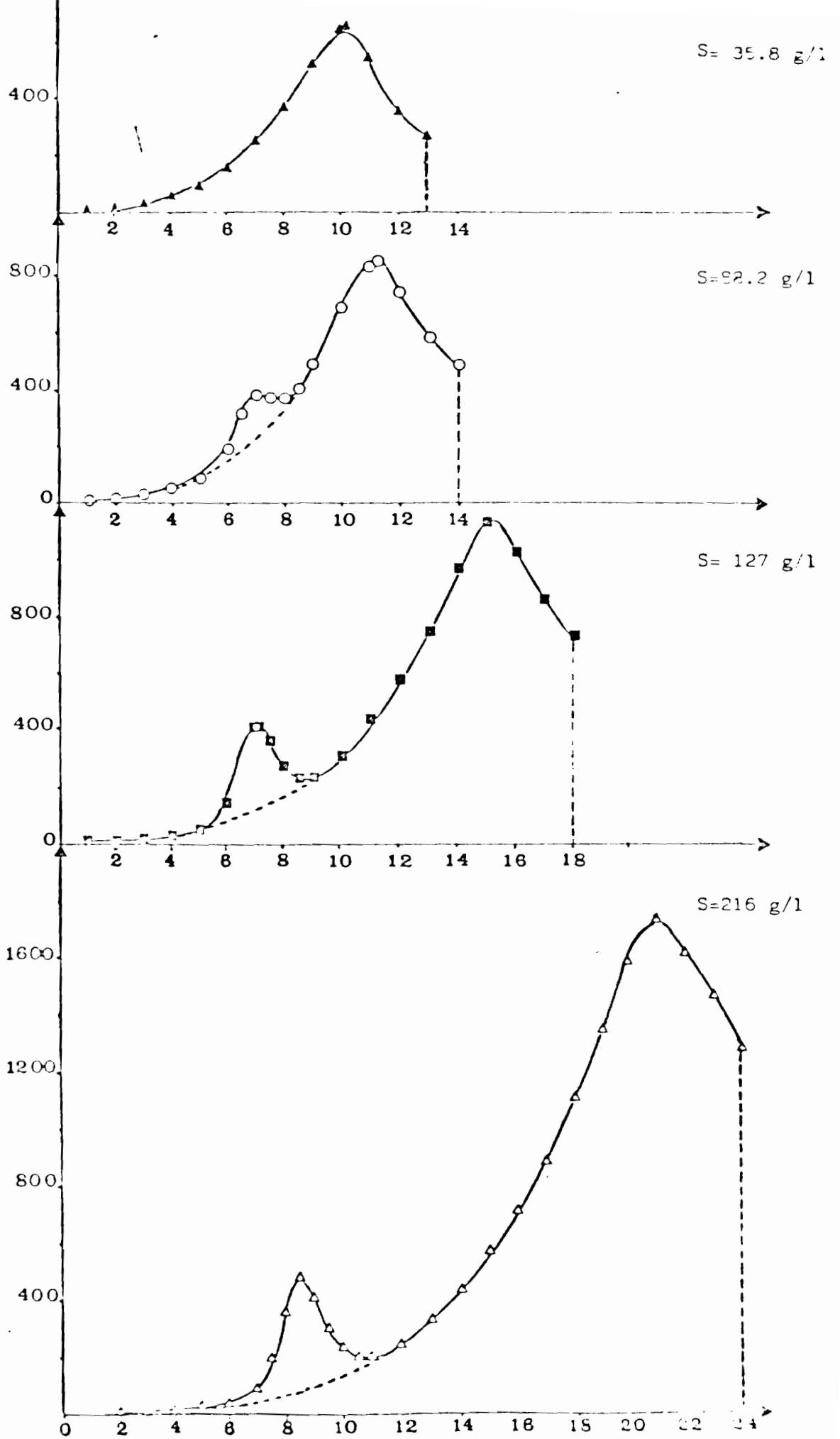
En los experimentos siguientes la cantidad de soporte utilizada fue de 15 mg y la cantidad de medio de cultivo de 40 l con diferentes concentraciones de glucosa y sales o diferentes tamaños de inóculo.

#### II. 3. 2. 1. Estudio del efecto de la concentración de glucosa en la solución de impregnación.

El inóculo fue fijado a  $3 \times 10^8$  esporas por cada ensayo y se fue variando la concentración de glucosa en la solución. Cada ensayo fue duplicado y no se registraron diferencias significativas entre las repeticiones. En la Fig. 19 están reportados los termogramas obtenidos y se puede observar en tres de los casos, el mismo fenómeno ya mencionado en el caso de la yuca de un salto energético tomando lugar entre las 6 y las 10 h. En los cultivos sobre soporte, aparece más tarde y con más intensidad conforme va aumentando la concentración de glucosa en la solución. Con la atenuación utilizada, en el experimento con una solución de impregnación de 35.8 g/l no se logró detectar ningún pico en esta zona.

Si se dibuja una curva ideal que no toma en cuenta este brinco energético (ref. Fig.19), es posible medir una área debajo del primer pico que corresponde a una cantidad de calor  $E_1$  (ref. Tab.!). Por otra parte, se puede estimar mediante la ley de Raoult una energía relacionada a la presión osmótica  $E_0$  tomando en cuenta los sales presentes. Si se representa  $E_1$  como una función de  $E_0$  (ref. Fig. 20) se puede observar una buena proporcionalidad. Esto confirma la hipótesis formulada en el capítulo referido a la yuca, sea la de un cambio metabólico que ocurre al fin de la germinación y cuya importancia está relacionada en este caso a las fuerzas osmóticas que debe vencer el hongo.

Desprendimiento  
de Energía  
( $\mu W$ )





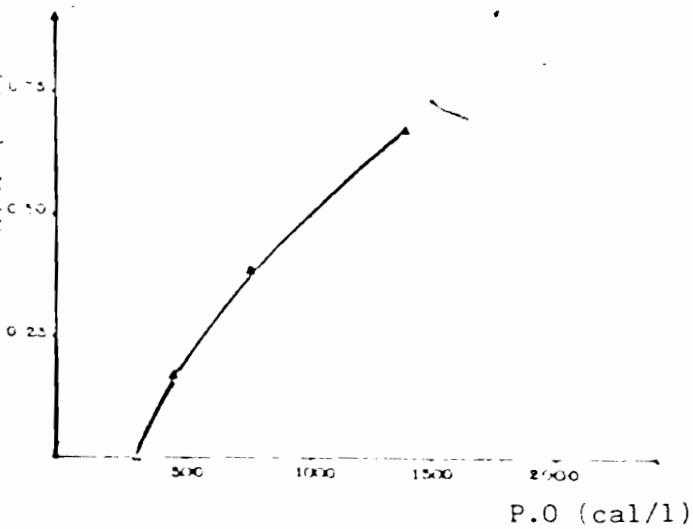


Fig. 20: Area debajo del primer pico como una función de la P.O. de la solución de impregnación

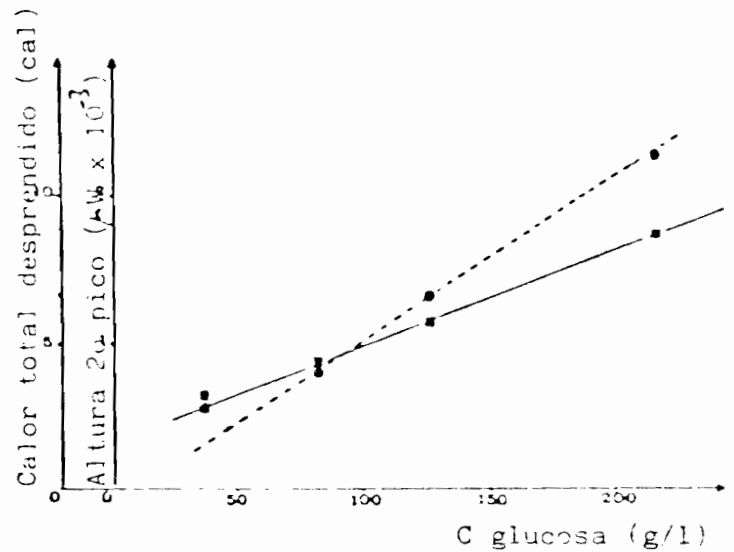


Fig. 21: Evolución de la altura del segundo pico y de la area total debajo del termograma como una función de la concentración de glucosa en la solución de impregnación.

La altura de este primer pico (ref Tab.11 ) llega a aproximadamente 25% de la altura maxima observada al fin del crecimiento pero sin embargo este fenómeno no ha podido ser detectado en gazometria (ref. Fig. 11 y 12). Esto nos plantea que el cambio no esta asociado a la respiración y entonces debe corresponder a un cambio estructural, probablemente un rearrreglo de las membranas y del sistema de permesas del hongo.

Tab. 11: Datos obtenidos a partir de los termogramas

| Concentración glucosa (g/l) | Altura 1er pico ( W) | Area bajo 1er pico (cal) | Altura 2do pico ( W) | Area total (cal) | Calor por M de gluc.* (Kcal/M) | Presión osmótica (cal/l) |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 35.8                        | 0                    | 0                        | 655                  | 2.80             | 415                            | 254                      |
| 82.2                        | 395                  | .167                     | 845                  | 3.95             | 256                            | 447                      |
| 127.0                       | 420                  | .334                     | 1140                 | 6.65             | 277                            | 709                      |
| 216.5                       | 490                  | .673                     | 1740                 | 11.35            | 278                            | 1396                     |

\* La cantidad de calor desprendida por mola de glucosa en las condiciones experimentales es calculada tomando en cuenta que 65 de la glucosa (ref. Tab 6) esta consumida en el limite superior de la area.

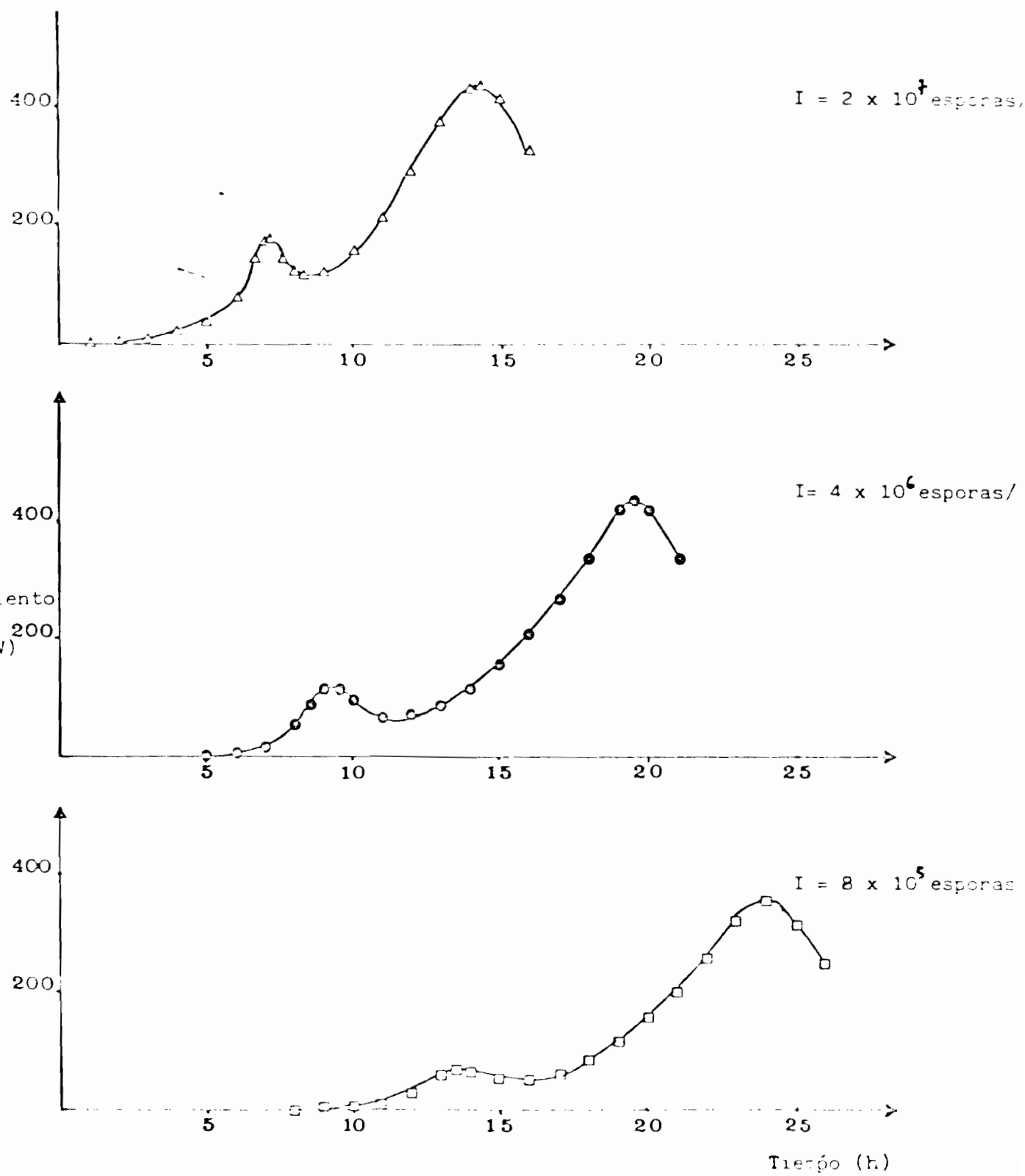


Fig. 22: Termogramas obtenidos con diferentes concentraciones de inóculo

Si se reportan la altura del segundo pico y el desprendimiento de calor total durante el crecimiento (correspondiendo a la area debajo del termograma (ref. Tab.10)) como una función de la concentración de glucosa en el medio podemos observar una evolución lineal para las tres concentraciones las mas elevadas (Fig.21). Igualmente si se calcula la energía desprendida por mola de glucosa consumida (ref. Tab.10) se puede observar que es más o menos similar para las tres ultimas concentraciones pero que en el primer caso (35.8 g/l) el rendimiento energético esta elevado. Se puede suponer que aun lavado, el bagazo contiene azucars residuales que interfieren sobre en los resultados cuando la concentración en la solución de impregnación es baja. Esto fue confirmado, practicando un ensayo con un medio minimo sin glucosa, donde pudimos observar en los termogramas un ligero crecimiento sobre bagazo impregnado pero ninguno en el mismo medio en liquido. Se puede destacar que para las tres concentraciones las mas elevadas, la cantidad de energía desprendida por mola de glucosa es parecida a aquella calculada para la yuca (ref. I. 3. 3.).

#### II. 3. 2. 2. Estudio del efecto del tamaño de inculo.

Tres experimentos fueron montados con cantidades de inculo diferentes de  $2 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^8$  y  $8 \times 10^9$  esporas por gramo de soporte, con una concentración de glucosa en la solución de impregnación fija de 39.5 g/l. Sobre los termogramas representados en la Fig.22 se puede observar que conforme aumenta la cantidad de inculo, la talla del primer pico es mas importante y aquel aparece mas temprano. Eso demuestra que en los cultivos sobre soportes, el salto energetico es proporcional al numero de esporas, lo cual confirma la hipótesis elaborada en el II.3.2.1. Este añade igualmente una explicación al retraso observado en las fermentaciones con yuca (ref. I. 3. 2. 2.) donde el tamaño de inculo era de  $2 \times 10^5$  por 10 mg de harina.

#### II. 3. 2. 3. Conclusión

La precisión de este instrumento de medición nos permitió evidenciar en los cultivos solidos de A.niger una fase de transición caracterizada por un brinco energético y correspondiendo a un cambio de metabolismo. Este fenómeno no habia sido detectado en gasometria por lo cual no parece asociado a la respiración y puede entonces ser atribuido a un cambio estructural. La intensidad de este cambio ha podido ser relacionada a la concentración de glucosa en la solución y al tamaño del inculo de esporas.

### III. Conclusion

En la primera parte de este trabajo se pudo poner en evidencia la importancia del agua en la fermentación sólida del almidón de yuca por A.niger. Un aumento de humedad mediante la introducción de fibras con alta capacidad de retención de agua permitió aumentar la tasa de crecimiento, la utilización de sustrato y la productividad del proceso. Aun si se logra una mayor utilización de azúcares, queda en todos los casos un remanente de sustrato por lo cual, otros factores limitantes del crecimiento en fase sólida no se pueden descartar.

Desde un punto de vista básico, quedaría por medir la actividad de agua (Aw) del producto durante la fermentación y ver si existen cambios de aquella relacionables con los resultados ya descritos.

En lo que se refiere al aspecto práctico, se presentan unos inconvenientes como lo son: la baja de densidad del producto resultando en un decremento de los rendimientos volumétricos y la alta cantidad de fibras del producto final, fibras no siempre bien tolerada por los animales. Sin embargo, la presencia de fibras facilita el empacamiento en reactor y aumenta la porosidad del sustrato, por lo cual el escalamiento del proceso aparece más sencillo.

En la segunda parte, se demostró la factibilidad de usar medios sintéticos líquidos absorbidos sobre un soporte en condiciones de fermentación sólida.

Se puso en evidencia un efecto marcado de la concentración de glucosa sobre la cinética de crecimiento de A.niger. Un aumento de la concentración de glucosa implica también un aumento de la presión osmótica y una disminución de la Aw por lo cual resultaría interesante en un futuro estudiar estos parámetros por separado. Con concentraciones de 417 g/l, el microorganismo logró consumir aproximadamente el 80% del sustrato en 40 horas, confirmando que las condiciones de fermentación sólida son más adecuadas que aquellas de fermentación sumergida para el desarrollo de los hongos filamentosos. Por otra parte, este método de cultivo permite definir y sobre todo cuantificar rápidamente la osmolaridad de una cepa.

El tamaño de inóculo resultó igualmente ser un factor importante en los cultivos sobre soportes impregnados, un aumento de aquello produciendo un aumento del  $\mu$  y acortando el tiempo de cultivo. Manejando concentraciones muy altas de esporas ( $2 \times 10^7$  esporas/g), no se presentó efecto de inhibición ninguno al contrario de lo que está reportado en condiciones de cultivo sumergido mostrando así otra diferencia fundamental de comportamiento de los hongos filamentosos según el tipo de cultivo. Aparentemente, el nivel de desarrollo del hongo no modificó la utilización del sustrato que fue total para los 5 tamaños de inóculo probados, lo cual nos hace pensar que la difusión de sustrato de la partícula al microorganismo es esencialmente pasiva.

En este trabajo, un aumento del tamaño de partícula solamente afectó la cinética de consumo de  $O_2$  al fin de la fermentación, lo que nos hizo suponer una difusión de sustrato más lenta del sustrato presente en el corazón de la fibra.

En conclusión, pensamos que este tipo de estudio de los parámetros principales permitiera en un futuro una optimización en función del proceso deseado.

En la tercera parte de este trabajo, la utilización de un microcalorimetro nos permitió observar un brinco energetico correspondiente al fin de la germinación, fenómeno hasta ahora no detectado por los otros metodos de analisis. Se confirma asi la hipótesis según la cual el cultivo sólido es un cultivo que cuenta etapas marcadas diferentes desde un punto de vista metabolico. El hecho de que se haya podido relacionar la intensidad del brinco energetico con la concentración de sustrato y de inculo muestra que los fenomenos metabolicos que aparecen entre la fase de germinación y de crecimiento apical son determinados por las condiciones del ambiente. Cambios estructurales como un rearrreglo del sistema de permeasas, una fortificación de la pared del hongo o la síntesis de poliols intracelulares todos destinados a luchar contra la fuerte presión osmótica externa pueden ser hipótesis para explicar los fenomenos observados. Fuese lo que sea, si la microcalorimetria levantó muchas interrogaciones, reveló ser una herramienta valiosa para estudiar el metabolismo de los microorganismos en cultivo sólido.

- Alazard, D., Rimbault, M. (1981) Comparative study of amylolytic enzymes production by Aspergillus niger in liquid and solid state cultivation. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12, 113-117.
- Boquet, G., Saucedo, G., Viniegra, G. (1986) Modelo matematico de transferencia de calor en fermentación sólida de la yuca. XVII Congreso Nacional de Microbiología, Puebla, Pue, 27 a 30 de Abril.
- Barrios-Gonzales, J., Martinez, C., Aguilera, T., Rimbault, M. (1986) Germination of high concentration of conidiospores from Aspergillus niger (Submitted for publication)
- Cruz, T., Gutierrez, M., Oriol, E. (1986) Datos non publicados.
- Gervais, P., Pazelin, C. (1986) Development of a solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnol. Letter., 8, 3, 191-196.
- Hesseltine, C. W. (1965) A millenium of fungi, food and fermentation. Mycologia, 57, 149-197.
- Hoe Kim, J., Hasebuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H., Ryu, D. D. Y. (1985) Cellulase production by a solid state culture system. Biotechnol. Bioeng., 27, 1445-1450.
- Huerta, S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y la acumulación del calor metabolico en la fermentación de cultivos solidos. Tesis maestria, C.B.I., U.A.M. Iztapalapa.
- Huerta, S., Rimbault, M., Revah, S., Viniegra, G. (1986) Evaluación de parametros fisiologicos de Aspergillus niger durante su crecimiento en medio sólido. XVII Congreso Nacional de Microbiología, Puebla, Pue, 27 a 30 de Abril.
- Krishnan, P. S., Bajaj, V., Danle, S. P. (1984) Some observations on the growth of Aspergillus niger from spore inoculum. Appl. Microbiol. 2, 303-309.
- Lakshminarayana, K., Chaudhary, K., Ethiraj, S., Tsuru, P. (1975) A solid state fermentation method for citric acid production using sugarcane bagasse. Biotechnol. Bioeng., 17, 291-293.
- Laukavics, J. J., Apsite, A. F., Viesturs, U. S., Tengerdz, R. P. (1985) Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. Biotechnol. Bioeng., 27, 1687-1691.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426-428.

- Noo-Young, N.; Moreira, A.R.; Tengardy R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation. "The Filamentous Fungi vol IV: Fungal Technology" D.E. Smith, D.R. Barry & B. Kristiansen Eds, Arnold, 117-144.
- Nakashara, H.; Koyama, Y.; Yoshida, T., Pichanghura, S., Ueda, R., Taguchi, H. (1982) Growth and enzyme production in a solid-state culture of Aspergillus oryzae. J. Ferment. Technol. 69, 4, 311-319.
- Nishio, N., Tai, K., Nagai, S. (1979) Hydrolase production by Aspergillus niger in solid-state cultivation. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9, 263-270.
- Rambault, M. (1980) Croissance de champignons filamenteux sur substrat amyloces. These de Doctorat, U.P.S. Toulouse, 291 p.
- Rambault, M., Alazard, D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol., 9, 199-209.
- Roussos, S. (1985) Croissance de Trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. These d'Etat, Universite d'Aix-Marseille I, 161 pp.
- Sakurai, S., Misawa, S., Shiota, H. (1965) Growth and respiratory activity of Aspergillus oryzae grown on solid state medium. Agric. Biol. Chem., 49, 3, 745-750.
- Sato, K., Nagatani, M., Nakamura, K., Sato, S. (1983) Growth estimation of Candida lipolytica from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 61, 6, 623-629.
- Sato, K., Nagatani, M., Sato, S. (1982) A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 60, 6, 607-610.
- Snell, Snell (1956) Colorimetric method of analysis. Vol IV, 3<sup>rd</sup> Ed Van Nostrand Co.
- Solorans, G. L., (1975) Submerged culture production of mycelial biomass. "The Filamentous Fungi, Vol I: Industrial Mycology" J. E. Smith & D. R. Barry Eds. Arnold, 249-264.
- Susman, A. S. (1965) Dormancy and spore germination. "The Fungi Vol. II: The Fungal organism" G.S. Ainsworth & A. S. Susman Eds. Academic Press, 733-764.

## COMPTE-RENDU DE MISSION

CENIC DE LA HAVANE, CUBA  
5-26 octobre 1986

Eric Oriol

### 1) Rappel des objectifs

Cette mission a été effectuée dans le cadre de l'accord ORSTOM-CECE à l'intérieur des laboratoires de microbiologie industrielle du CENIC dirigés par M. Rolando Contreras. Elle fait suite à la mission réalisée à Cuba par M. Rimbault en février de cette année (cf. compte-rendu mission Rimbault). Les buts de ce séjour étaient d'une part de transférer les méthodes de production de spores et de culture de champignons filamenteux par fermentation solide développées au sein du groupe ORSTOM-UAM pour les appliquer à l'enrichissement en protéines de la canne à sucre entière, le produit étant destiné à l'alimentation du bétail. L'autre volet de cette mission concernait l'utilisation d'un microcalorimètre LKB (TAM: Thermal Activity Monitor) pour compléter des expériences de physiologie de croissance des champignons filamenteux en milieu solide et effectuer un bilan énergétique des fermentations.

Les conditions du séjour étaient les suivantes: billet d'avion payé par l'ORSTOM (contrat CEE-ORSTOM) et prise en charge du logement et de la nourriture par le CENIC.

### 2) Déroulement de la mission

Après avoir été accueilli à l'aéroport le dimanche 5 octobre par M. Rolando Contreras, nous avons dès le lundi établi ensemble un plan de travail et préparé les conditions nécessaires au déroulement des expériences de laboratoire. Nous avons pu disposer de canne à sucre fraîche, broyée industriellement et tamisée au laboratoire. Sans aucun autre prétraitement ni stérilisation préalable, la canne à sucre a été inoculée avec une suspension saline de spores de A.niger et déposée dans des incubateurs de 20 g de capacité. Après 20 h de culture, la canne à sucre contenant 36% de saccharose et moins de 1% de protéines a été transformée en un produit fermenté contenant plus de 6 % de protéines et 7 à 8% de saccharose. Bien que le procédé ne soit pas aseptique, la microflore aérobie totale (bactéries et levures) a diminué pendant la croissance du champignon (voir détails des techniques et des résultats en annexe). Devant les bons résultats obtenus au laboratoire, deux essais ont été effectués à un niveau supérieur (2 kg poids humide) dans un fermenteur à plateaux conçu et construit sur place, ce qui a permis de montrer une bonne reproductibilité de la méthode culture. Les analyses de ces derniers échantillons n'étaient pas disponibles à l'heure de mon départ mais leur aspect laissaient présager des résultats identiques à ceux du laboratoire.

En ce qui concerne la microcalorimétrie, à partir de la seconde semaine, nous avons monté avec la précieuse collaboration de Mme Gloria Contreras diverses expériences de croissance de A.niger sur de



la farine de manioc et de la bagasse de canne à sucre imbibée d'un milieu synthétique. La grande sensibilité du système nous a permis de mettre en évidence une phase transitoire du développement du champignon située entre la phase de germination et celle de croissance exponentielle. Les moyens de mesure envisagés jusqu'alors (analyse biochimique, gazométrie) ne nous avaient pas permis de détecter cette phase métabolique mais une étude approfondie des rendements de croissance nous en avait laissé supposer l'existence. Lors des cultures sur bagasse, la concentration de substrat dans le milieu d'imprégnation influence le temps d'apparition, l'intensité et la durée de cette phase (Voir les résultats en annexe)

Au cours du séjour, deux visites ont également été programmées, la première à l'ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Cana de Azucar) le 9 octobre et la seconde au nouveau centre de Biotecnología e Ingeniería Genética le 24 octobre. Après la visite des laboratoires et du pilote de l'ICIDCA en compagnie de chercheurs de l'institut: M. Pedro Gonzales et Mlle. Maria-Antonieta Brizuela (chercheurs de l'ICIDCA ayant réalisé un stage de formation en F.S. dans le groupe ORSTOM-UAM) nous avons eu une réunion avec M. Agustin Cabello, chef du département d'alimentation animale. Celui-ci m'a fait part de l'intérêt de l'ICIDCA de développer l'enrichissement protéique du "meollo" (pointe et feuille de canne) par fermentation en milieu solide d'A. terreus. Ce travail commencé en mai 1986 avec l'aide financière de l'ONUDI au laboratoire de la UAM de Mexico en collaboration avec M. Pedro Gonzales nous a permis d'augmenter de 3 à 6% le contenu de protéines de ce résidu, ceci justifie une deuxième visite de ce chercheur à Mexico d'octobre 86 à janvier 87. L'ICIDCA envisage de passer ce procédé à un niveau pilote (1.2 m<sup>3</sup>) dans les installations de "Cuba 10" (ref. rapport de mission de M. Maurice Rimbault).

La deuxième visite a été effectuée en compagnie de M. d'Ollone, conseiller culturel et scientifique de l'ambassade de France et de M. Contreras et a été organisée par Mme Doris Simons du CECE (Comite Estatal de Cooperacion Economica). Lors d'une réunion préalable, elle a exprimé le vœu d'établir officiellement et dans les plus brefs délais possibles un accord tripartite CECE-ORSTOM-UAM concernant la fermentation en milieu solide. La visite du Centre de Biotecnología et Génie Génétique a été guidée par M. Delgado, chef d'un département. Ce centre a été inauguré au mois de juin et seuls trois étages d'un des deux bâtiments principaux sont occupés. Ce centre construit autour d'une équipe de pointe du génie génétique de l'interféron est divisé en 5 départements (cf. rapport de mission de M. Rimbault) et devrait compter une fois terminé 70.000 m<sup>2</sup> couverts et un effectif d'à peu près 300 personnes dont 150 chercheurs à temps complet. Il fonctionne actuellement en dessous de 50% de ses capacités et devrait atteindre son régime de croisière en 1989. L'installation est ultra-moderne et un grand nombre d'équipements de pointe sont en fonctionnement (spectromètre de masse, RMN, ultracentrifugeuses, chromatographes de tous types, séquenceurs et synthétiseurs automatiques de gènes etc...); ce centre contraste fortement avec les laboratoires que j'ai pu visiter dans les autres instituts.

### 3) Conclusion

Les résultats obtenus concernant l'enrichissement protéique de la canne à sucre brute sont encourageants et la simplicité du procédé non aseptique qui ne comporte aucune étape de prétraitement a paru très intéressante aux chercheurs du CENIC qui semblent désireux de poursuivre dans cette voie. L'utilisation d'une canne plus mure pouvant contenir jusqu'à 50% de saccharose élèverait la concentration de saccharose initiale et par conséquent le rendement final de protéines qui devrait approcher 9%. L'envoi d'un ingénieur du CENIC à Mexico début 87 pour étudier au sein du groupe ORSTOM-UAM les problèmes spécifiques des réacteurs et du contrôle de procédé leur permettrait d'entamer l'extrapolation de ce procédé.

En ce qui concerne la microcalorimétrie, cet appareil nous a permis de faire des observations intéressantes et de mesurer des changements métaboliques inaccessibles par d'autres méthodes. La bonne reproductibilité et la grande sensibilité de cette méthode comme l'étendue de la gamme d'expériences possibles et la simplicité d'utilisation de cet appareil en font un outil de travail extrêmement précieux pour l'étude du métabolisme fongique. Seul son prix élevé (60.000 \$) reste un obstacle à une utilisation plus étendue.

## ANNEXE 1

### RAPPORT TECHNIQUE

#### 1. Enrichissement protéique de la canne à sucre entière par Aspergillus niger.

##### 1.1. Matériel et méthodes

Nous avons travaillé avec de la canne à sucre fraîche qui a été broyée sur un moulin industriel puis tamisée pour obtenir une taille de particules homogène de 1 à 3 mm. Aucun autre prétraitement n'a été pratiqué avant l'inoculation. Cette canne contenait 66.9% d'humidité, 0.87% de protéines et 37% de saccharose poids sec. Cette proportion de saccharose est faible comparée à celle d'une canne mure (50% du poids sec).

Pour l'enrichissement, nous avons adapté le milieu salin, l'inoculum et la technique de culture de Rimbault et Alazard (1980). La composition du milieu était le suivant:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.9 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 g; Urée, 1.2 g pour 100 g de matière sèche sur la base de 50% de saccharose. L'inoculum contenait  $2 \times 10^7$  spores pour 100 g de matière sèche et le pH de la solution contenant les spores et les sels a été ajusté à 2.7 avant l'inoculation. Avec l'ajout de cette suspension, l'humidité de la canne a été portée à 76.5% et son pH est passé de 6.1 à 3.5. Une fois inoculé et homogénéisé le produit a été mis à incubation à 35°C dans des colonnes aérées à raison de 17 g de produit par colonne. Deux colonnes ont été prélevées pour chaque échantillonnage.

Pour l'analyse des échantillons de fermentation, ceux-ci ont été préalablement séchés et broyés finement. Les protéines ont été précipitées par l'acide trichloracétique durant 24h à 4°C puis dosées par la méthode de l'azote total de Kjeldahl. Une hydrolyse acide du saccharose a été pratiquée et les sucres réducteurs résultants ont été dosés par colorimétrie (méthode au DNS). Pour l'analyse microbiologique, les échantillons frais ont été homogénéisés, dilués et répandus en boîte de Petri sur deux milieux spécifiques, l'un des bactéries et l'autre des levures et champignons. Le comptage a été effectué après 48 h d'incubation.

##### 1.2. Résultats

La cinétique de croissance représentée sur la fig.1 représente la moyenne de deux expériences pratiquées à une semaine d'intervalle. On peut apprécier une augmentation de la protéine de 0.71% à un peu plus de 6% (poids sec final) en 20h. La consommation de sucres suit la même évolution passant de 36 à 9% dans le même temps, soit un taux de conversion de 75%. L'humidité du produit augmente de 76.5% à 78.6% ce qui représente une perte de poids sec de 9%. Le rendement Rx de transformation des sucres à protéines est de 17.5% par rapport au poids sec initial. Ces rendements sont inférieurs à ceux rencontrés par Rimbault (1980) sur manioc (de 20 à 25%), ceci pouvant s'expliquer par une consommation parasite de sucres par maintenance,

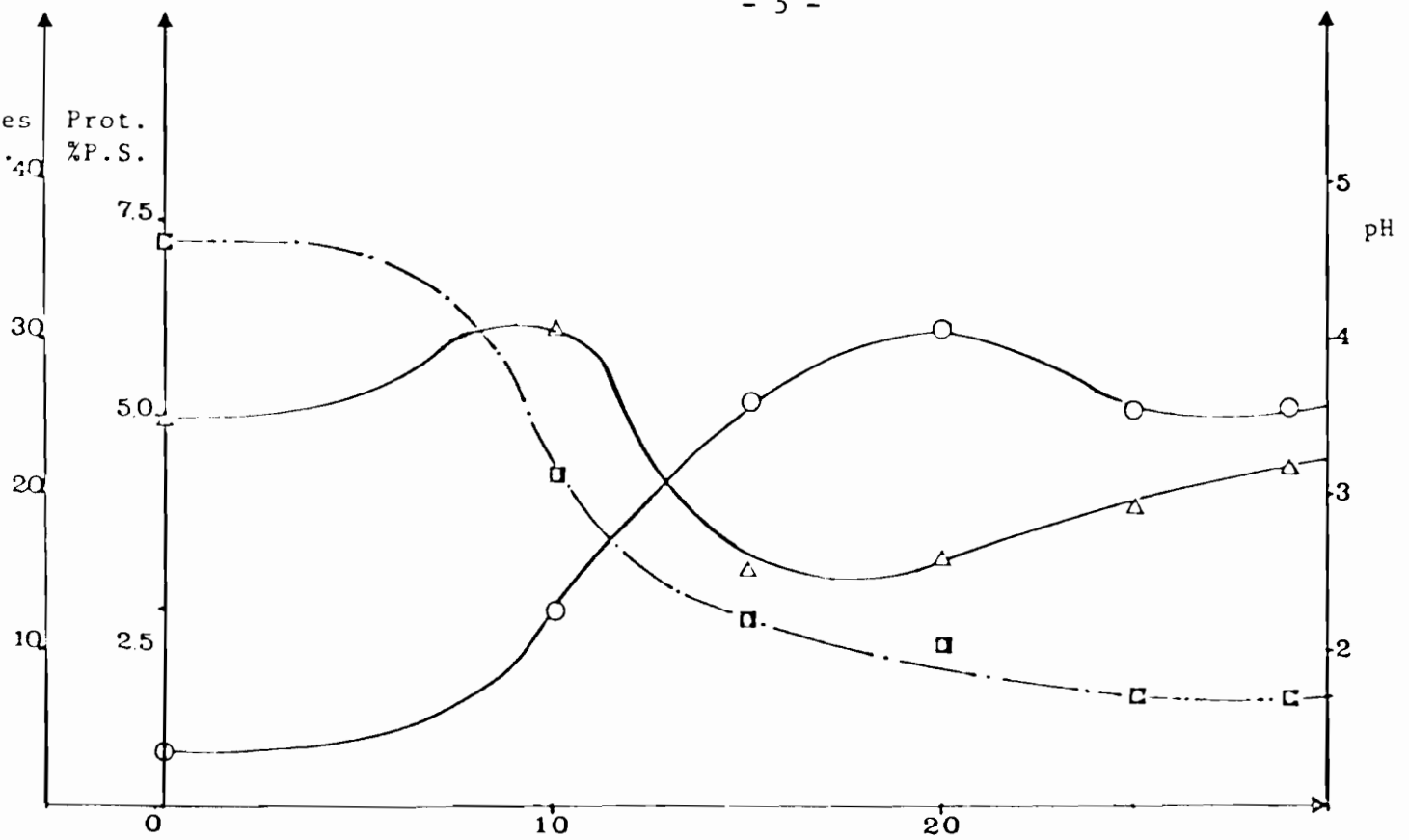


Fig.1: Cinétique de croissance de *A.niger* sur canne á sucre entière (-□-) sucres, (-○-) protéines, (-△-) pH

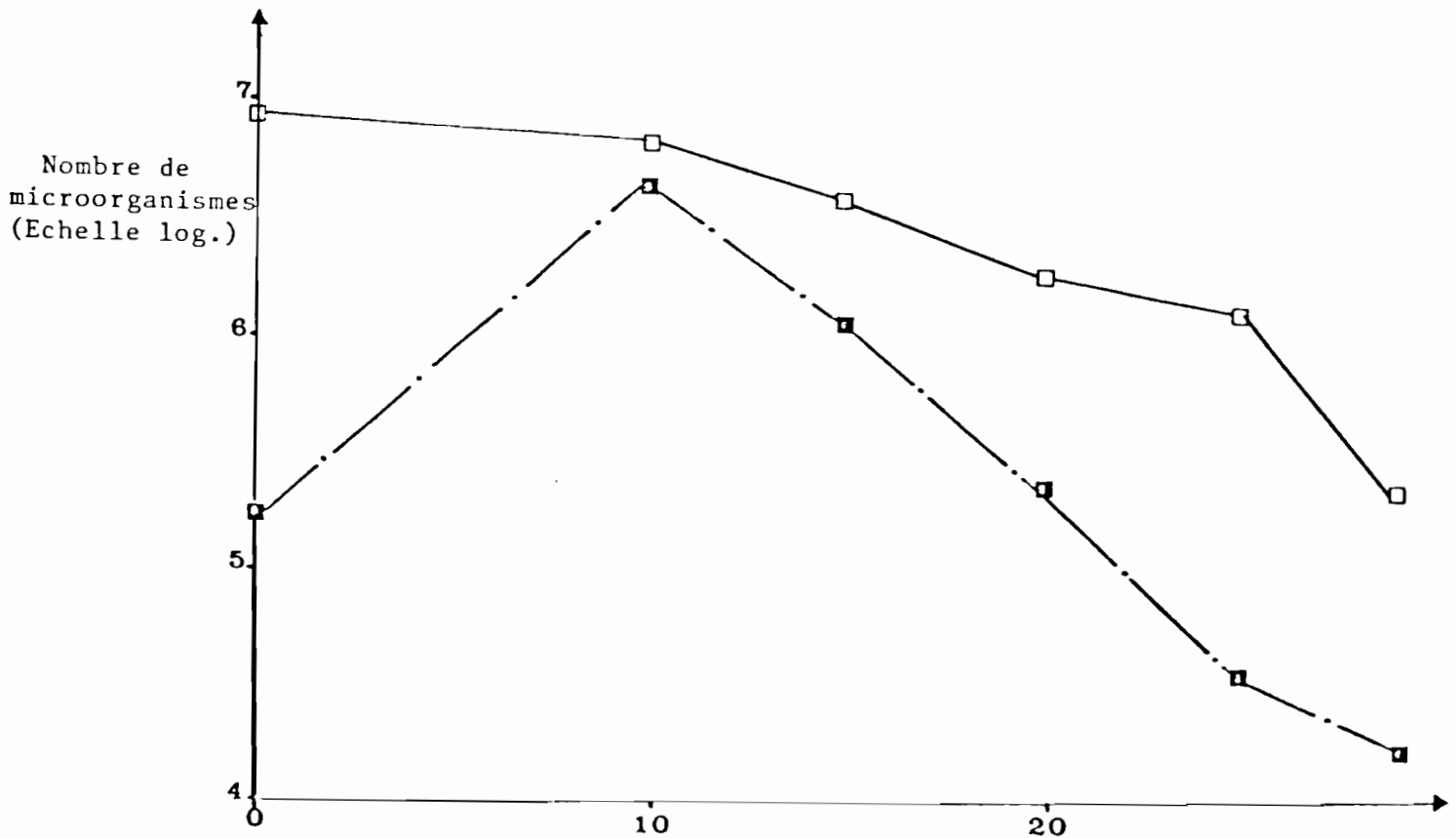


Fig.2: Evolution de la microflore aérobie lors de la croissance de *A.niger* sur canne á sucre entière. (-□-) bactéries, (-○-) levures

nécessaire pour vaincre la pression osmotique provoquée par le saccharose.

L'évolution de la microflore du produit au cours de la fermentation est représentée sur la fig.2. On peut observer une diminution constante de la quantité de bactéries qui se réduit d'un facteur 50 en 30 h. Les levures quant à elles se développent pendant la phase de germination du champignon (jusqu'à 10 h) mais leur nombre se réduit ensuite d'un facteur 270 durant les 20 dernières heures de la fermentation. Ces résultats montrent que grâce à une inoculation massive de spores et malgré la non-asepsie du procédé de fermentation, celui-ci ne conduit pas au développement de microorganismes contaminants mais réduit au contraire leur nombre dans des proportions importantes.

La méthode d'enrichissement s'étant révélée satisfaisante et reproductible au laboratoire nous avons décidé de procéder à deux essais à un niveau supérieur. Nous avons utilisé pour cela un fermenteur à plateaux en acrylique à aération verticale. Les dimensions de chaque plateau sont de 48 x 50 cm et nous avons choisi d'utiliser une épaisseur de couche de 2 cm ce qui nous permettait de disposer 1.6 kgs de produit humide par plateau. L'air entrant dans le fermenteur était préalablement soumis à une double saturation, l'une à température ambiante (30°C) et l'autre à 38°C. Le fermenteur était uniquement thermostaté par l'air humide entrant et une température de 35°C était atteinte puis maintenue 2h après l'inoculation. Après 15 h de fermentation la température au centre de la masse a commencé à augmenter pour atteindre 40°C à 18 h, signe d'une bonne croissance. Le produit fermenté recolté à t=22h se présentait comme un gâteau effritable avec peu d'humidité apparente. Les résultats des analyses n'étaient pas disponibles lorsque je suis parti mais l'aspect du produit fermenté laissait présager un taux de protéines voisin à celui obtenu au laboratoire.

### 1.3. Conclusion

L'utilisation de la fermentation solide de A.niger pour l'enrichissement de la canne à sucre entière s'est révélée satisfaisante quant à la quantité de protéines obtenues et la qualité microbiologique du produit. Le procédé est simple, ne fait appel à aucun prétraitement et du fait de la nature fibreuse du substrat, l'extrapolation à un niveau industriel ne devrait pas présenter les mêmes inconvénients que pour le manioc.

## 2. Etudes de microcalorimétrie

### 2.1. Introduction

Les buts de cette étude étaient:

- d'obtenir en se basant sur l'expérience acquise par le groupe de R. Contreras (1986), des thermogrammes de croissance de A.niger sur farine de manioc et d'observer si la grande sensibilité de la méthode permettait de séparer les différentes phases de la croissance sur substrat solide jusqu'alors uniquement accessibles par des calculs de rendements (Huerta et col., 1986).

- d'avoir une idée précise des quantités de chaleur dégagées lors de la croissance de A.niger sur farine de manioc.
- d'obtenir des thermogrammes de croissance de A.niger sur un support constitué de bagasse de canne imprégné d'une solution synthétique contenant du glucose et des sels et d'estimer l'influence de la concentration de substrat et de la taille d'inoculum.

## 2.2. Matériel et méthodes

Pour ces études nous avons pu disposer d'un microcalorimètre LKB appelé Thermal Activity Monitor (TAM) comportant 4 canaux tous doublés d'une référence (cf. notice détaillée en annexe 2). Le seuil de détection est de  $0.2 \mu W$  soit moins de  $10^{-4} ^\circ C$  avec une précision supérieure à 5%. Pour les expériences de croissance, le matériel solide a été placé dans des flacons de 3 ml (cf. notice) ensuite stérilisés puis inoculés avec une suspension de spores contenant les sels et éventuellement le glucose. Chaque expérience comportait un flacon témoin uniquement additionné de la solution sans les spores. Un courant d'oxygène était ensuite passé dans le flacon durant 1 mn pour en saturer l'atmosphère puis le flacon était scellé hermétiquement avant d'être disposé dans le microcalorimètre (cf. notice détaillée). Toutes les expériences ont eu lieu à  $37^\circ C$ , en double et les thermogrammes étaient enregistrés en continu.

Les milieux utilisés ont été les suivantes:

- pour le manioc:  $(NH_4)_2SO_4$ , 9.8 mg;  $KH_2PO_4$ , 5 mg; Urée, 2.4 mg et  $2 \times 10^6$  spores pour 100mg de farine, humidité initiale: 50%
- pour les fermentations sur bagasse imprégnée d'un milieu glucosé:  $(NH_4)_2SO_4$ , 9.8 mg;  $KH_2PO_4$ , 5 mg; Urée, 2.4 mg pour 100 mg de glucose et  $2 \times 10^6$  spores pour 100mg de bagasse, durant toutes les expériences le rapport eau/bagasse a été maintenu constant à 2.75, l'humidité variant selon la concentration de glucose.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Thermochimie de la croissance de A.niger sur farine de manioc.

Ce microcalorimètre n'est pas équipé d'une cellule à flux continu et les flacons sont scellés au début de l'expérience. Dans ces conditions, la croissance des microorganismes aérobies peut être rapidement limitée par la concentration d'oxygène à l'intérieur du flacon, ce qui oblige à utiliser de faibles quantités de substrat. Un flacon contient 3 ml soit 4.28 mg d' $O_2$  si l'on considère que la pression partielle d' $O_2$  est de 100%. Or, d'après Raimbault (1980) le  $Y_{O_2}$  de A.niger est de 1.55 g X/g  $O_2$ , cette quantité d' $O_2$  est donc suffisante pour synthétiser  $4.28 \times 1.55 = 6.64$  mg de biomasse. Sachant toujours d'après Raimbault que le rendement de transformation de substrat à biomasse  $Y_x$  est de 0.55g X/ g S, la quantité limite de substrat pouvant être présente dans le milieu est de  $6.64 / 0.55 = 12.07$  mg.

Nous avons donc pratiqué une première expérience avec 10 mg de farine de manioc, cette quantité représentant à peine quelques grains au fond du flacon. Les thermogrammes obtenus lors de deux répétitions sont représentés sur la fig.3 où le parallélisme de leurs évolutions montre

Dégagement  
d'énergie  
( $\mu W$ )

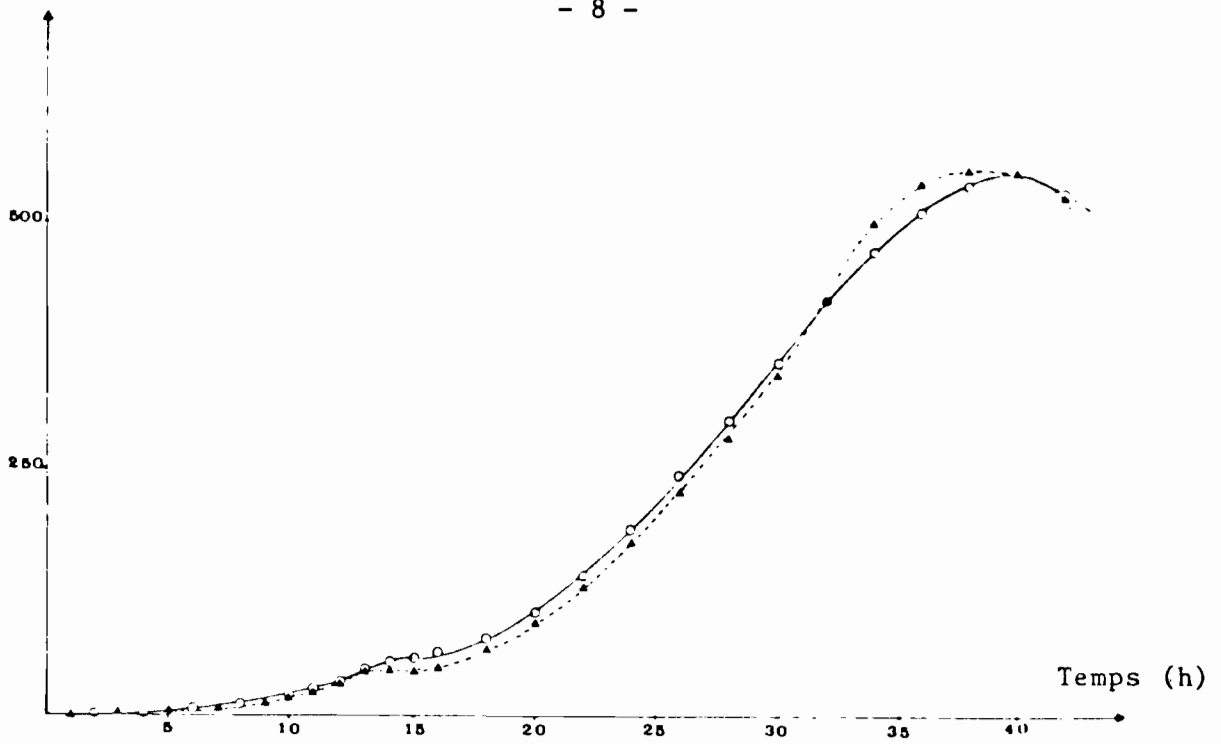


Fig.3: Thermogrammes obtenus lors de la croissance de A.niger sur farine de manioc (10 mg)

Dégagement  
d'énergie  
( $\mu W$ )

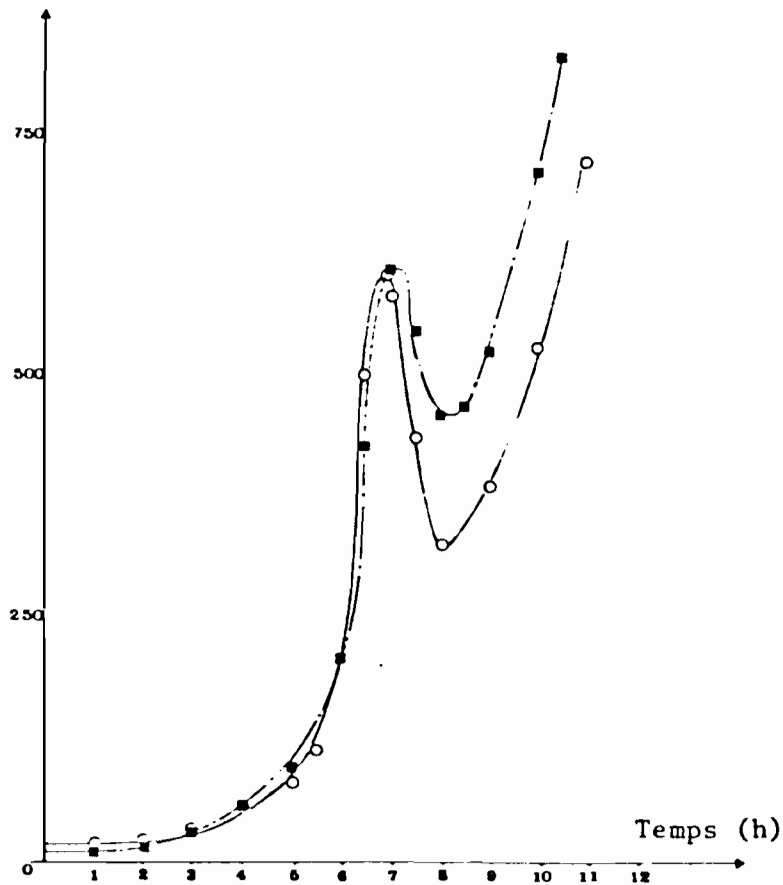


Fig.4: Reproduction partielle desthermogrammes obtenus lors de la croissance de A.niger sur farine de manioc (100 mg).

la bonne reproductibilité de la mesure. Le processus est plus lent que lors des fermentations en colonne qui suivies par gazométrie atteignent un maximum aux alentours de 25 h. On peut néanmoins observer un accident dans la courbe de croissance, accident correspondant à un léger saut énergétique et se produisant entre 11 et 15 h de fermentation. Pour mesurer ce phénomène avec plus de précision, nous avons réalisé un essai avec 100 mg de substrat, l'O<sub>2</sub> n'étant pas limitant jusqu'à 20 h dans ces conditions. Le thermogramme partiel obtenu est représenté sur la fig.4 où l'on peut observer avec beaucoup plus de netteté le saut énergétique; il a dans ce cas lieu entre 6 et 8 h contre 11 à 15 h dans l'expérience précédente. Cette différence peut s'expliquer par la très faible quantité de substrat et d'inoculum présente dans le premier cas où il semble que l'on atteigne une des limites physiques du système. Pour en revenir à la dernière expérience, une observation microscopique d'un échantillon prélevé au moment du pic montre des spores germinées, en phase homogène à 90% et possédant un tube germinatif d'à peu près 5 fois la taille de la spore. Cette période comprise entre 6 et 8 h correspond à la fin de la phase de germination et l'on assiste à un découplage métabolique déjà supposé par Huerta et col. (1986) qui avait observé une baisse brutale des rendements intrinsèques durant cette période. Il avait suggéré pour expliquer cette baisse, l'hypothèse du passage d'une phase de germination largement endogène à une phase de croissance exponentielle exogène. Ces expériences de microcalorimétrie semblent confirmer cette hypothèse et les résultats suivants obtenus sur support abondent également dans ce sens.

Si l'on s'intéresse au rendement énergétique global de la croissance au moyen du calcul de l'aire sous la courbe (cf Fig. 3), on obtient la quantité de 7.352 cal libérée en 43 h. En considérant que sur 10 mg de manioc, 8 mg sont de l'amidon et que la consommation de sucres est de 60% (Raimbault, 1980), on peut estimer la consommation réelle à 4.8 mg d'amidon soit 5.05 mg de glucose (en tenant compte de l'eau d'hydrolyse de l'amidon). La réaction de respiration du glucose fournit l'essentiel de l'énergie libérée durant la croissance et si l'on calcule la quantité d'énergie par mole de glucose on obtient la quantité de  $7.352 \times 10^3 \times 180/5.05 = 262$  Kcal/mole de glucose. Raimbault (1980), lors de l'étude de la stoechiométrie de la croissance, avait calculé que 35% du glucose était oxydé durant la respiration. Sachant que cette réaction d'oxydation produit 673 Kcal, quantité qui varie peu entre les microorganismes, une mole de glucose produira donc  $673 \times .35 = 235.5$  Kcal. La quantité d'énergie que nous avons calculé grossièrement à partir des thermogrammes (262 Kcal/M) n'est pas très éloignée de la valeur rencontrée par Raimbault.

2.3.2. Thermochimie de la croissance de A.niger sur bagasse imbibée d'une solution saline de glucose.

2.3.2.1. Effet de la concentration de glucose en solution.

Une série d'expériences a été montée utilisant 15 mg de bagasse lavée puis séchée imprégnée de 40 l d'une solution saline de glucose de concentration croissante, l'inoculum étant fixé à  $3 \times 10^9$  spores pour chaque essai. Nous n'avons pas remarqué de différences significatives



Dégagement  
d'énergie  
( $\mu W$ )

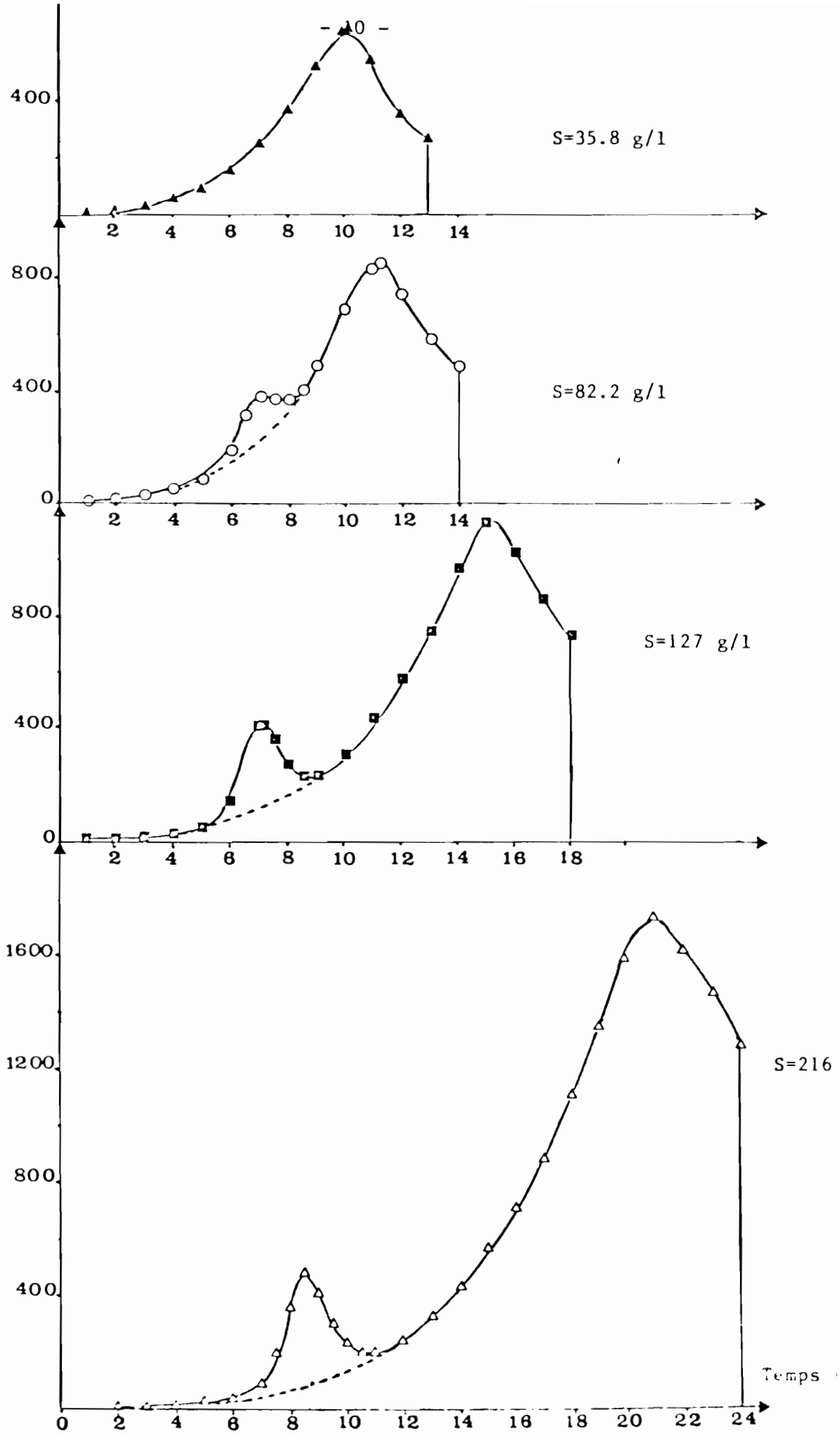


Fig. 5: Thermogrammes obtenus avec différentes concentrations

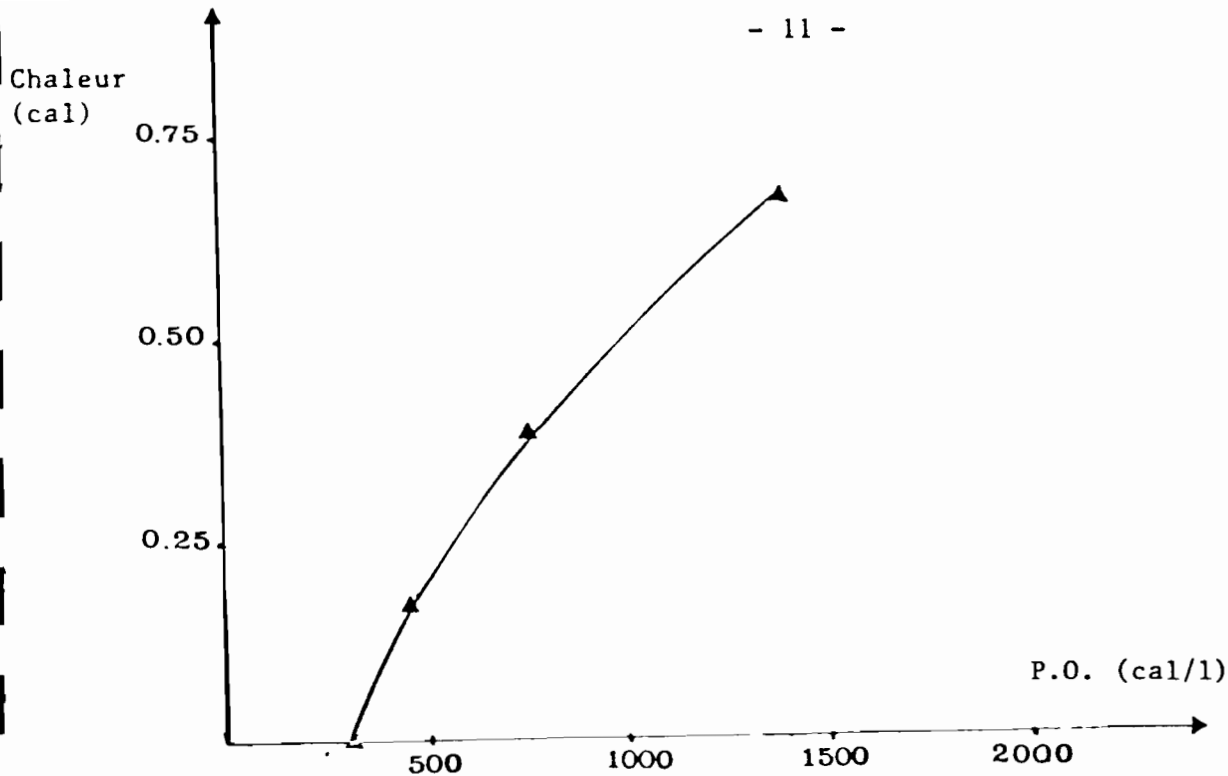


Fig.6: Représentation de la chaleur correspondante au saut énergétique (cf. Fig.5) en fonction de la pression osmotique de la solution d'imprégnation

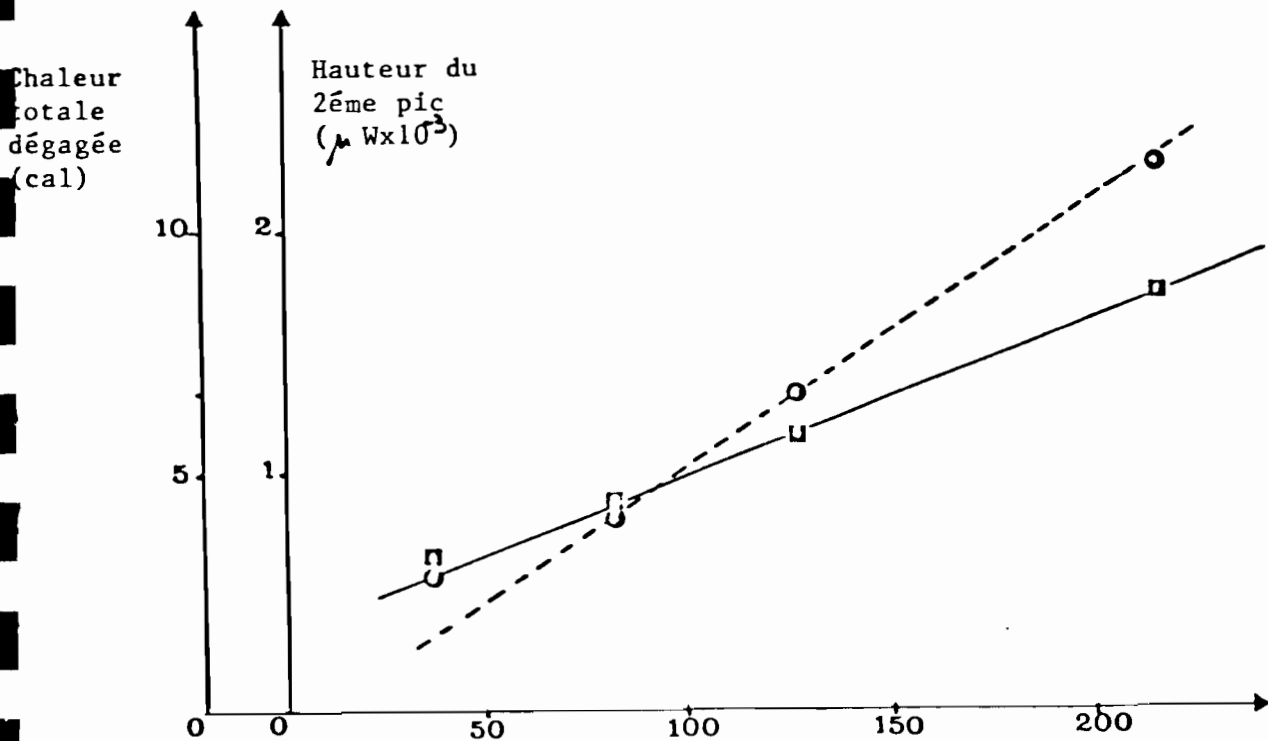


Fig.7: Représentation de la hauteur maximum du deuxième pic ( ) et de la chaleur totale dégagée ( ) en fonction de la concentration de glucose dans la solution d'imprégnation.

lors des répétitions et les thermogrammes obtenus sont reportés sur la fig.5. Dans trois des quatre thermogrammes, on peut observer le même saut énergétique que dans le cas de l'amidon de manioc mais ici, il apparaît plus tardivement et son importance augmente au fur et à mesure que le glucose en solution est plus concentré. A l'atténuation utilisée (3000  $\mu$ W) l'expérience avec la solution contenant 35.8 g/l n'a pas permis de déceler de pic dans cette zone.

Si l'on trace une courbe qui ne tient pas compte de ce saut énergétique (cf fig. 5), il est possible de mesurer une aire comprise entre le premier pic et la courbe idéale qui correspond à une énergie E1 (cf. tab.1). Si d'autre part on estime grâce la loi de Raoult la pression osmotique Eo de chaque solution en tenant compte des sels présents (cf. tab.1) et que l'on représente Es en fonction de Eo (cf. Fig.6) on peut observer une bonne proportionalité. Ceci confirme l'hypothèse formulée dans le paragraphe concernant le manioc d'un découplage métabolique, d'autant plus important dans ce cas que le champignon doit vaincre des forces osmotiques croissantes.

Tableau 1: Données obtenues à partir des thermogrammes

| Concentration de glucose en sol. (g/l) | Hauteur 1er pic ( $\mu$ W) | Aire sous 1er pic (cal) | Hauteur 2eme pic ( $\mu$ W) | Aire totale (cal) | Energie par mole de gluc* (Kcal/mole) | Pression osmotique (cal/l) |
|--|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 35.8                                   | 0                          | 0                       | 655                         | 2.80              | 415                                   | 254                        |
| 82.2                                   | 395                        | .167                    | 845                         | 3.95              | 256                                   | 447                        |
| 127.0                                  | 420                        | .384                    | 1140                        | 6.65              | 277                                   | 759                        |
| 216.5                                  | 490                        | .673                    | 1740                        | 11.35             | 278                                   | 1396                       |

\* L'énergie dégagée par mole de glucose dans les conditions expérimentales est calculée en considérant que 85% du glucose est consommé à la borne supérieure de l'aire.

Si on calcule les énergies totales dégagées durant la croissance et les hauteurs du 2eme pic d'énergie (cf. tab.1) et que l'on les reporte en fonction de la concentration de glucose dans le milieu, on peut observer une évolution linéaire (cf. Fig.7) pour les trois concentrations les plus élevées. De même si l'on calcule l'énergie dégagée par mole de glucose consommée (cf. Tab.1) on peut remarquer qu'elle est à peu près similaire pour les trois dernières concentrations mais pour la première, le rendement énergétique est élevé. On peut supposer que bien qu'elle ait été lavée, la bagasse contient toujours des sucres résiduels qui interfèrent dans les résultats quand la concentration de la solution d'imprégnation est faible. Pour les trois derniers cas la quantité d'énergie libérée par mole de glucose consommé est proche de celle calculée pour le manioc (cf. 2.3.1.)

#### 2.3.2.2. Effet de la quantité d'inoculum

Trois expériences ont été montées avec des quantités d'inoculum différentes respectivement de  $12 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  et  $3 \times 10^9$  spores pour 15 mg de bagasse avec une concentration fixe de glucose de 89.5 g/l.

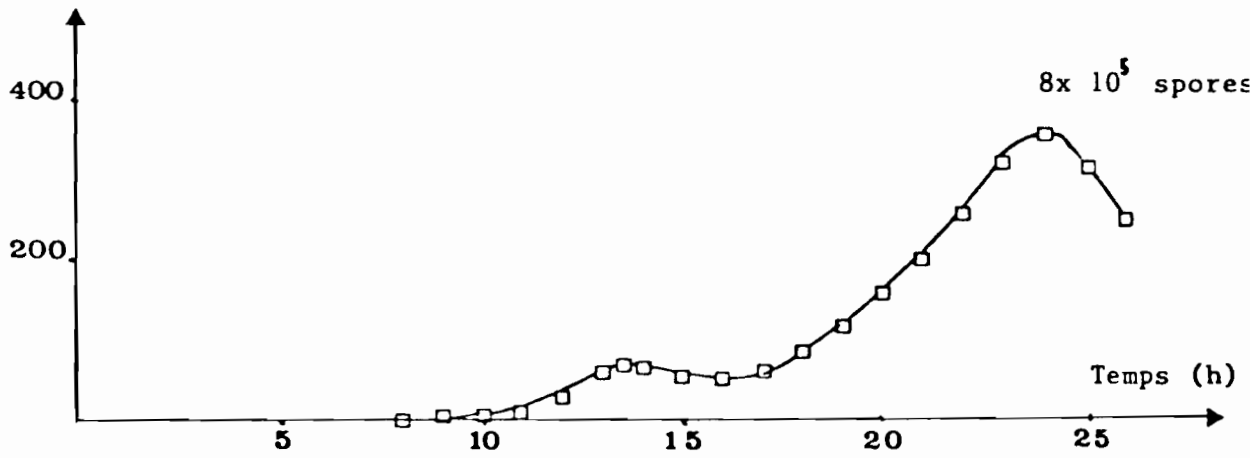
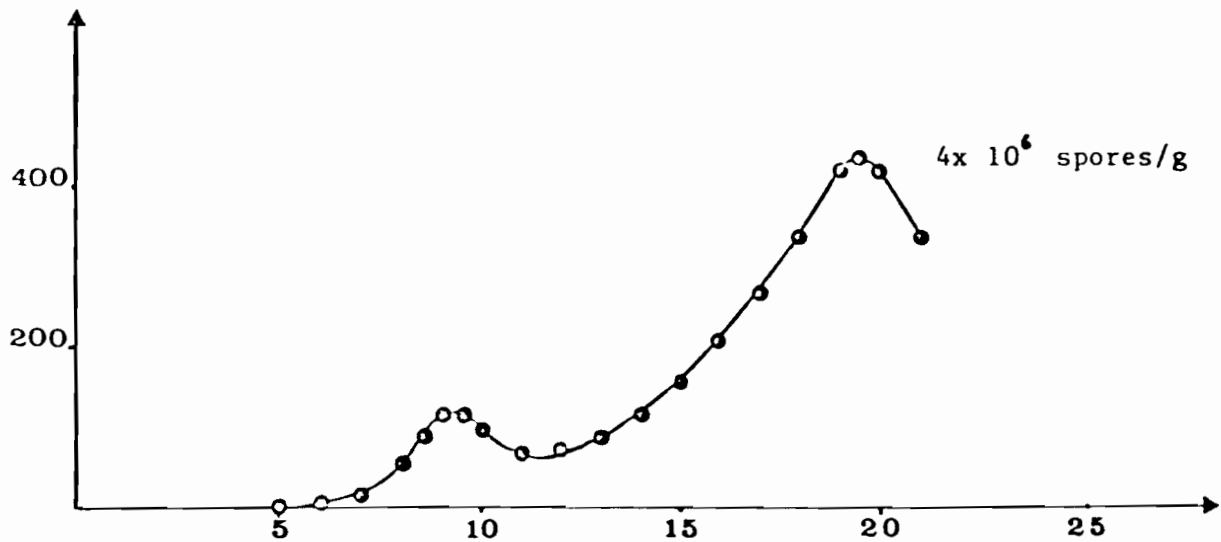


Fig.8: Thermogrammes obtenus avec différentes concentrations d'inoculum.

Sur les thermogrammes représentés fig.8, on peut observer que la quantité d'inoculum agit sur la taille du premier pic et sur son délai d'apparition. Ceci montre que lors des cultures sur support, le saut énergétique est proportionnel au nombre de spores et renforce donc l'hypothèse élaborée plus haut. Ceci ajoute également une explication au retard observé lors du premier essai sur manioc (cf. fig.3) où l'inoculum était de  $2 \times 10^8/10$  mg de substrat.

#### 2.4. Conclusion

La précision de cet instrument de mesure nous a permis de mettre en évidence lors des cultures de A. niger sur substrat ou support solide, un saut énergétique correspondant à un changement de métabolisme. Lors des cultures sur bagasse, la quantité de chaleur libérée lors de ce saut énergétique a pu être reliée à la pression osmotique de la solution d'imprégnation. Lors du calcul de la chaleur totale dégagée lors de la croissance nous avons trouvé des valeurs proches de celles établies par Raimbault (1980). L'ensemble de ces résultats montre que le microcalorimètre est un instrument précieux pour suivre la croissance et le métabolisme des champignons filamenteux en milieu solide.

#### Bibliographie

- Contreras, D. R., Johnsrud, S. C., Eriksson, K.E. (1986) Direct monitoring of bagasse biodegradation by microcalorimetry. Proceedings of "Biotechnology in the pulp and paper industry y" 3rd Int. Conf., Stockholm, June 16-19 1986, 211-213.
- Raimbault, M., Alazard, D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol., 9, 199-209.
- Raimbault, M. (1980) Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicés. Thèse de Doctorat, U.P.S. Toulouse, 291 p.
- Huerta, S., Raimbault, M., Revah, S., Viniegra, G. (1986) Evaluacion de parametros fisiologicos de Aspergillus niger durante su crecimiento en medio solido. XVII Cong. Nacion. Microbiol. Puebla, Pue. 27-30 abr. 1986.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA.  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA.

FISIOLOGIA DE UN HONGO FILAMENTOSO CELULOLITICO : Trichoderma  
harzianum .

POR:

Jorge AVILES D. y Leobardo SERRANO C.

Mexico, D.F. a 25 de Febrero de 1987.

## CONTENIDO.

|  | Página |
|--|--------|
| I. Resumen.  | 1      |
| II. Introduccion.  | 2      |
| 2.1) Las Celulasas.                                      | 4      |
| III. Objetivos.  | 6      |
| 3.1) Caracteres Fisiologicos.                            | 6      |
| 3.2) Caracteres Nutricionales y Bioquimicos.             | 6      |
| IV. Material y Metodos.                                  | 7      |
| 4.1) Microorganismo.                                     | 7      |
| 4.2) Medios y Condiciones de Cultivo.                    | 7      |
| 4.3) Proceso de Tratamiento.                             | 7      |
| 4.4) Metodos de Analisis.                                | 7      |
| V. Resultados y Discusiones.                             | 11     |
| 5.1) Germinacion de Conidiosporas.                       | 11     |
| 5.2) Prototrofia.  | 14     |
| 5.3) Tolerancia a la Salinidad.                          | 14     |
| 5.4) Tolerancia al pH.                                   | 16     |
| 5.5) Bioquimica y Nutricion.                             | 16     |
| 5.6) Fuente de Nitrogeno.                                | 16     |
| 5.7) Fuente de Carbono.                                  | 19     |
| 5.8) Influencia del ph sobre la produccion de Celulasas. | 21     |
| VI. Conclusion.  | 22     |
| VII. Referencias.  | 24     |
| VIII. Indice de Tablas y Figuras.                        | 26     |

## I. RESUMEN.

Debido a la cada vez mayor participacion de los hongos filamentosos en la biotecnologia, siendo utilizados particularmente en la lucha contra los problemas de polucion, alimentacion, y en el desarrollo de la microbiologia industrial, es interesante hacer estudios sobre los caracteres fisiologicos bioquimicos y nutricionales de este tipo de microorganismos.

*Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso celulolitico que ha sido utilizado anteriormente en la produccion de alimentos fermentados enriquecidos. (Muindi y Hanssen, 1981 a y b).

Fue seleccionado *T. harzianum* para realizar su estudio bioquimico, fisiologico y nutricional.

Las principales etapas fisiologicas de los hongos filamentosos celuloliticos son la germinacion de las conidiosporas y la multiplicacion vegetativa del micelio. Estas etapas fueron estudiadas en *T. harzianum* utilizando medios de cultivo sinteticos y diferentes fuentes de carbono. Se presentan tambien los resultados del efecto del pH, temperatura y NaCl.

No se encuentran muchas diferencias en las cineticas de germinacion de las esporas cuando se utilizo la Glucosa, Fructosa, Galactosa, Sacarosa y el Almidon como fuente de carbono. Despues de 14 horas la tasa de germinacion fue cerca del 100%. La velocidad de germinacion disminuyo rapidamente cuando las fuentes de carbono fueron Lactosa, Carboxymetil Celulosa y Celulosa, indicando que los enlaces glucosidicos B-1,4 influyen fuertemente en la germinacion.

*T. harzianum* es una cepa prototrofa que crece a temperaturas bajas entre 15 y 35°C. Esta cepa es muy tolerante con respecto al pH (2 a 9) y a las sales minerales (0 a 80 g/l de NaCl). Ademas puede utilizar una amplia gama de azucares como fuente de carbono y energia.



## FISIOLOGIA DE UN HONGO FILAMENTOSO CELULOLITICO: *Trichoderma harzianum* .

### II. INTRODUCCION.

La celulosa es el mayor constituyente de todos los vegetales y representa un recurso natural potencial de azucres bien conocida. Su descomposicion biologica en elementos simples por medio de las celulasas permite principalmente el aligeramiento parcial de algunos graves problemas tales como : la alimentacion, la energia y la polucion del medio ambiente.

La produccion de alimentos fermentados enriquecidos en proteina por cultivo de hongos filamentosos es un ejemplo de desarrollo que se muestra como una perspectiva interesante.

A partir de la crisis energetica de 1973 retorno el interes publico hacia los recursos renovables. En este caso, la celulosa fue naturalmente el centro de desarrollo para la produccion de carburantes de substitution (metano, alcoholes), asi mismo para el estudio de produccion de moleculas quimicas a partir de la celulosa, la celuloquimia o carboquimia estan presentes como una alternativa a la petroquimica para la fabricacion de nuevos biopolimeros, biosolventes, y biodetergentes.

De esta manera el desarrollo de los hongos filamentosos sobre sustratos solidos juega un papel importante en numerosas areas como son : el medio ambiente, la alimentacion y la microbiologia industrial. Su importancia se acrecenta con la intensificacion de las investigaciones con respecto a las bioconversiones, y a la valorizacion de los subproductos agricolas lignocelulosicos.

Entre los hongos celuloliticos ( *Alternaria* , *Aspergillus* , *Chaetomium* , *Eusarium* , *Myrothecium* , *Penicillium* , *Trichoderma* , *Sporotrichum* .) las especies del genero *Trichoderma* son las mas frecuentemente utilizadas para la hidrolisis de la celulosa y de los productos lignocelulosicos. Durante el curso de su crecimiento, estas especies producen cantidades importantes de exoenzimas capaces de hidrolizar completamente la celulosa en glucosa.

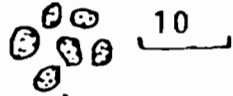
Las especies siguientes : *L. reesei* , *T. viride* ,

## Etapas

## Fisiológicas.

CONSERVACION

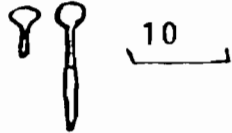
Morfología



Descripción:

Esporas: forma de conservación a largo plazo. Sirven de inóculo para fermentaciones en medio sólido.

GERMINACION

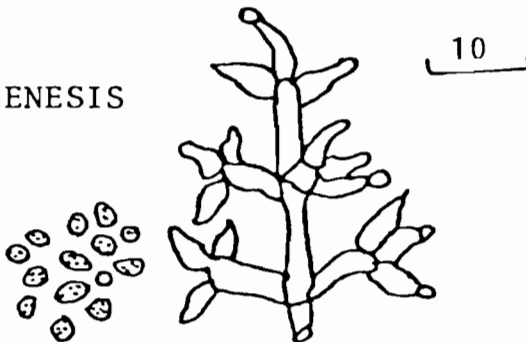


Aparición del tubo germinativo después de 11 hrs. de cultivo en óptimas condiciones de crecimiento.

MULTIPLICACION  
VEGETATIVA

Multiplicación activa del micelio desarrollando numerosas ramificaciones. El micelio es ceptado. La duración de ésta etapa en es función de las condiciones y también de la composición del medio de cultivo. Por lo general dura 40 horas.

CONIDIOGENESIS



Formación de conidioforos, filides y liberación de conidias, esporas. Esta etapa es estrechamente controlada genéticamente por los efectos inducción-inhibición manifestados principalmente por los componentes del medio de cultivo. Su duración puede ser de algunas semanas.

FIGURA 1 : Principales etapas fisiológicas de T. harzianum en función del aspecto morfológico de su desarrollo sobre sustratos sólidos en condiciones de cultivos óptimos.

*I. pseudo-koningii* , *I. longibranchiatum* , así como *I. harzianum* son las especies más utilizadas para el estudio del mecanismo del complejo enzimático así como para la producción de celulasas (Roussos, 1985).

Los diferentes mutantes obtenidos a partir de *I. viride* QM6a... producen importantes cantidades de celulasas, mas las composiciones así como las propiedades del complejo enzimático acerca de los sustratos celulosicos son similares. De la misma manera las proporciones relativas de endo y exoglucanasas no cambian mucho. Todas las especies de *I. reesei* producen cantidades pequeñas de celulasas constitutivas. Sin embargo, para todas las especies de *Trichoderma* , la biosíntesis de celulasas esta regulada por un mecanismo de inducción-represión.

Las celulasas de *I. harzianum* son sintetizadas durante las primeras horas del crecimiento, estas enzimas son entonces excretadas al medio de cultivo y la concentración aumenta en función del tiempo. Esta especie se adapta perfectamente para la producción de celulasas por fermentación en medio sólido.

## 2.1) Las celulasas.

No existe una enzima única capaz de degradar completamente la celulosa en bruto hasta llegar a sus componentes más simples, celobiosa y glucosa. De hecho, la más simple identificación de las celulasas consiste en ser un complejo polienzimático que ataca a los polisacáridos transformándolos en azúcares simples capaces de atravesar la pared celular. Según esta definición, el sistema enzimático completo no existe de igual manera en todos los organismos.

Para *I. viride* el complejo celulasico fue fraccionado en cuatro componentes por Pettersson en 1975, que utilizó diferentes métodos de cromatografía. Dos de esos componentes son endoglucanasas; los otros son una exoglucanasa y una B-glucosidasa.

Más recientemente, otros autores haciendo uso de tamices moleculares y resinas de intercambio iónico, o por electroforesis, han obtenido solamente tres componentes enzimáticos para *I. reesei* :

- 1) Endo-B-1,4 Glucanasa = Carboximetilcelulasa (ACMC) (Cx).
- 2) Exo-B-1,4 Glucanasa = Celobiohidrolasa (C1).

### 3) B-Glucosidasa o Celobiasa.

Un estudio bibliografico preeliminar, nos permitio seleccionar entre diferentes cepas de hongos filamentosos celuloliticos a L.harzianum para llevar a cabo nuestro estudio ya que presenta caracterizticas satisfactorias en miras de una produccion de celulasas. Esta cepa produce cantidades importantes de celulasas, y posee un crecimiento apical elevado (1.2 mm/h), permitiendole invadir los sustratos rapidamente y produce cantidades muy elevadas de conidiosporas en la superficie. (Roussos, 1985)

De hecho una especie de L.harzianum ha sido utilizada para enriquecer proteicamente la harina de yuca por fermentacion en medio liquido. Despues de 60 horas de fermentacion en medio liquido, la biomasa recolectada contiene 38% de proteinas brutas. (Muindi y Hansse, 1981 b)

El valor nutritivo de la biomasa de L.harzianum fue evaluado. El coeficiente de digestibilidad para las proteinas brutas es de un 66% a un 81% para los aminoacidos. Por otra parte el producto fermentado a sido utilizado en raciones alimenticias de aves y animales diversos. (Muindi y Hanssen, 1981 a y b).

Ademas, L.harzianum es un antagonista poderoso con respecto a un cierto numero de hongos fitopatogenos. Recientemente, se descubrio una serie de peptidos nuevos, presentes en las conidiosporas de L.harzianum y, por lo tanto, el poder antibiotico puede ser verificado. (Dubos y Col, 1983).

Debido a todo lo anterior, es pues interesante hacer un estudio sobre la caracterizacion bioquimica, fisiologica y nutricional de este prometedor microorganismo para lograr asi un mayor aprovechamiento de sus caracteristicas, y desarrollar de esta manera una tecnologia apropiada a las condiciones actuales.

### III. OBJETIVOS.

Aplicar un metodo experimental para la caracterizacion e identificacion confiable de cualquier hongo filamentoso celulolitico mediante su estudio bioquimico, fisiologico y nutricional. De tal manera que estos datos sean utiles para un estudio posterior de desarrollo biotecnologico dentro de areas como el medio ambiente, alimentacion o microbiologia industrial. .

Dentro de este estudio se contemplan los siguientes puntos :

#### 3.1) Caracteres fisiologicos.

3.1.a) Crecimiento como funcion del pH.

3.1.b) Crecimiento como funcion de la temperatura.

3.1.c) Efectos del NaCl sobre el crecimiento.

3.1.d) Germinacion sobre azucares simples.

3.1.e) Germinacion sobre disacaridos.

3.1.f) Germinacion sobre polisacaridos.

3.1.g) Germinacion sobre substratos celulosicos naturales.

#### 3.2) Caracteres Nutricionales y Bioquimicos.

3.2.a) Crecimiento como una funcion de la Fuente de Carbono.

3.2.b) Crecimiento y produccion de Celulasas en funcion del pH.

#### IV. MATERIAL Y METODOS.

##### 4.1) Microorganismo.

Para el estudio se ha utilizado el hongo *I.harzianum* que proviene de la Coleccion Checoslovaca de Microorganismos (CCM) No.F-470.

##### 4.2) Medios y Condiciones de Cultivo.

Se conservo la cepa en medio solido, para hongos, Papa Dextrosa Agar (PDA) a 4 °C, efectuandose las resiembras cada 4 meses en el medio de cultivo e incubada a 29 C durante 7 dias para posteriormente ser conservada nuevamente.

Para los estudios de germinacion, asi como para observar la utilizacion de diferentes fuentes de carbono y nitrogeno se utilizo el Medio Mineral de Base (MMB) (Tabla I) el cual, en algunos casos se preparo sin contener la fuente de carbono y se distribuyo en matraces de 250 ml. en un volumen total de 50 ml. por matraz, se esterilizo a 110 C durante 30 min. y posteriormente se adiciono la fuente de carbono esterilizada aparte a 100 C durante 15 min. y la solucion de vitaminas esterilizada mediante filtro millipore (0.45  $\mu$ ). Los medios fueron incubados con  $3 \times 10^7$  esporas de *I.harzianum* por gramo de fuente de carbono e incubados en bano maria agitado a 29 C durante 3 dias.

##### 4.3) Proceso de Tratamiento.

Terminado el periodo de incubacion se sometio a cada una de las muestras a una homogenizacion con un macerador de tejidos (potter) y se tomaron 10 ml. de cada uno de los macerados, sometiendolos a centrifugacion a 6000 rpm durante 15 min. En seguida se separo el sobrenadante del sedimento y a este ultimo se le sometio a tres lavados con agua destilada con igual numero de centrifugaciones para que el micelio estuviera finalmente libre del sobrenadante, el sedimento tratado de esta manera fue utilizado para cuantificar las proteinas correspondientes al crecimiento micelial. El sobrenadante obtenido fue sometido por su parte a medicion de pH, azucares reductores, actividad amilasica y celulasica, asi como a cuantificacion de azucares totales en los casos convenientes (Roussos, 1982) (Fig. 2).

##### 4.4) Metodos de Analisis.

Las proteinas fueron cuantificadas mediante el metodo de Lowry y Coll (1951) utilizando Sero Albumina Bovina como patron. Los resultados se presentan en mg/l.

TABLA I : Composición del Medio Mineral de Base utilizado para la descripción fisiológica y nutricional de Trichoderma.

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  | 1.00 g     |
| Uréa                           | 0.30 g     |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$       | 1.30 g     |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$      | 0.12 g     |
| $\text{MgSO}_4$                | 0.30 g     |
| $\text{CaCl}_2$                | 0.30 g     |
| Fuente de Carbono              | 2.00 g     |
| Solución de Oligoelementos (*) | 1.00 ml    |
| Solución de Vitaminas (**)     | 1.00 ml    |
| Agua Destilada QSP             | 1000.00 ml |
| pH                             | 5.6        |

(\*) Solución de Oligoelementos

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 5.00 g     |
| $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$  | 1.60 g     |
| $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.40 g     |
| $\text{CaCl}_2$                      | 2.00 g     |
| Agua Destilada                       | 1000.00 ml |

(\*\*) Solución de Vitaminas

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Biotina             | 20 mg   |
| Ac. Fólico          | 20 mg   |
| Pyridoxina HCl      | 100 mg  |
| Thiamina HCl        | 50 mg   |
| Riboflavina         | 50 mg   |
| B-12                | 1 mg    |
| Ac. p-aminobenzóico | 50 mg   |
| Ac. Lipóico         | 50 mg   |
| Agua Destilada      | 1000 ml |

Los azucares reductores fueron cuantificados con DNS segun Miller (1959). Los datos se reportan en mg/l de glucosa.

Las actividades enzimaticas (Amilasas y Celulasas) se han estimado segun Roussos (1982) y los azucares reductores liberados se han medido con DNS segun Miller (1959). Los datos presentados estan dados en mg/l de azucares reductores liberados en la reaccion enzimatica.

Los azucares totales han sido cuantificados mediante el metodo de Antrona segun Scott (1953). Los datos estan presentados en mg/l.

Para medir la germinacion se ha tomado como base un aspecto morfologico considerandose que una espora ha germinado cuando la longitud del tubo germinativo es igual o superior al diametro de esta. Frossard y Oertli (1982).



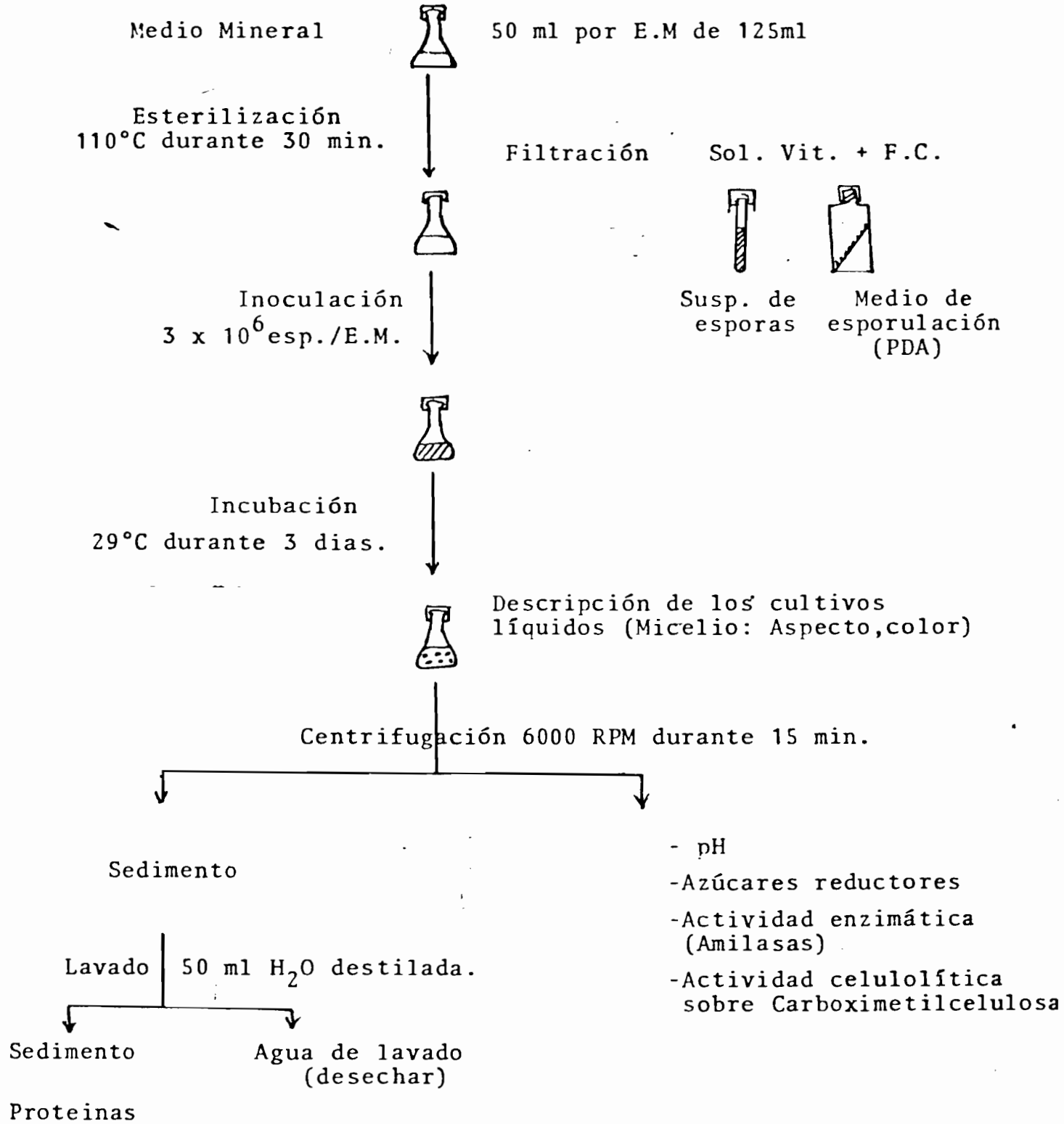


FIGURA 2 : Esquema del tratamiento de la muestra.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

### 5.1) Germinacion de Conidiosporas.

La germinacion es la suma de los procesos y de los cambios que llegan cuando el desarrollo vuelve a tomar la forma en conservacion y su transformacion, en una estructura diferente (Allen, 1965). Es tambien el primer estadio irreversible que es observable siendo diferente del organismo en conservacion; el juicio puede hacerse sobre criterios morfologicos, citologicos, fisiologicos o bioquimicos (Sussman, 1965).

Para el estudio de germinacion de las conidiosporas de *I.harzianum* hemos utilizado un Medio Mineral de Base (MMB) y diferentes fuentes de carbono (2 gr/l). Los cultivos fueron agitados e incubados a 29 C. La cinetica de germinacion de las conidiosporas fue seguida de la observacion directa en microscopio sobre las partes representativas tomadas cada 2 horas. Los resultados fueron dados en porcentajes de conidiosporas germinadas. La germinacion de las conidiosporas fue medida basandose sobre un criterio morfologico : una conidiospora germino cuando el tubo germinativo alcanza una longitud igual al mas largo diametro de la conidiospora (Frossard y Oertli, 1982).

En dichas condiciones, la germinacion de *I.harzianum* sobre azucares simples (Glucosa, Fructosa y Galactosa) comienza despues de 9 horas de cultivo para dar termino despues de 14 horas. Despues de este periodo, todas las conidiosporas presentan un tubo germinativo de longitud variable pero superior al diametro de la espora. Para algunas, el micelio presenta ya celulas septadas.

Para los cultivos sobre disacaridos (Sacarosa, Lactosa, Celobiosa, Maltosa) la germinacion comienza tambien despues de 9 horas. Sin embargo, se observa una disminucion de la germinacion despues de 14 horas, esta disminucion parece depender del tipo de enlace ( A-1,4 o B-1,4) glucosidico. Despues de 14 horas de cultivo sobre Sacarosa , enlace A-1,4, la tasa de germinacion es de 90% cuando sobre la Lactosa y Celobiosa (enlace B-1,4) es solamente del 70%.

Este fenomeno de aminoramiento de la tasa de germinacion de las conidiosporas por los enlaces glucosidicos de tipo B-1,4 es acentuado en el caso de los cultivos sobre polisacaridos. Cuando se utiliza el almidon (polimero de glucosa con enlaces A-1,6) la cinetica de germinacion de esporas es mas rapida y similar a la obtenida sobre glucosa. La germinacion sobre

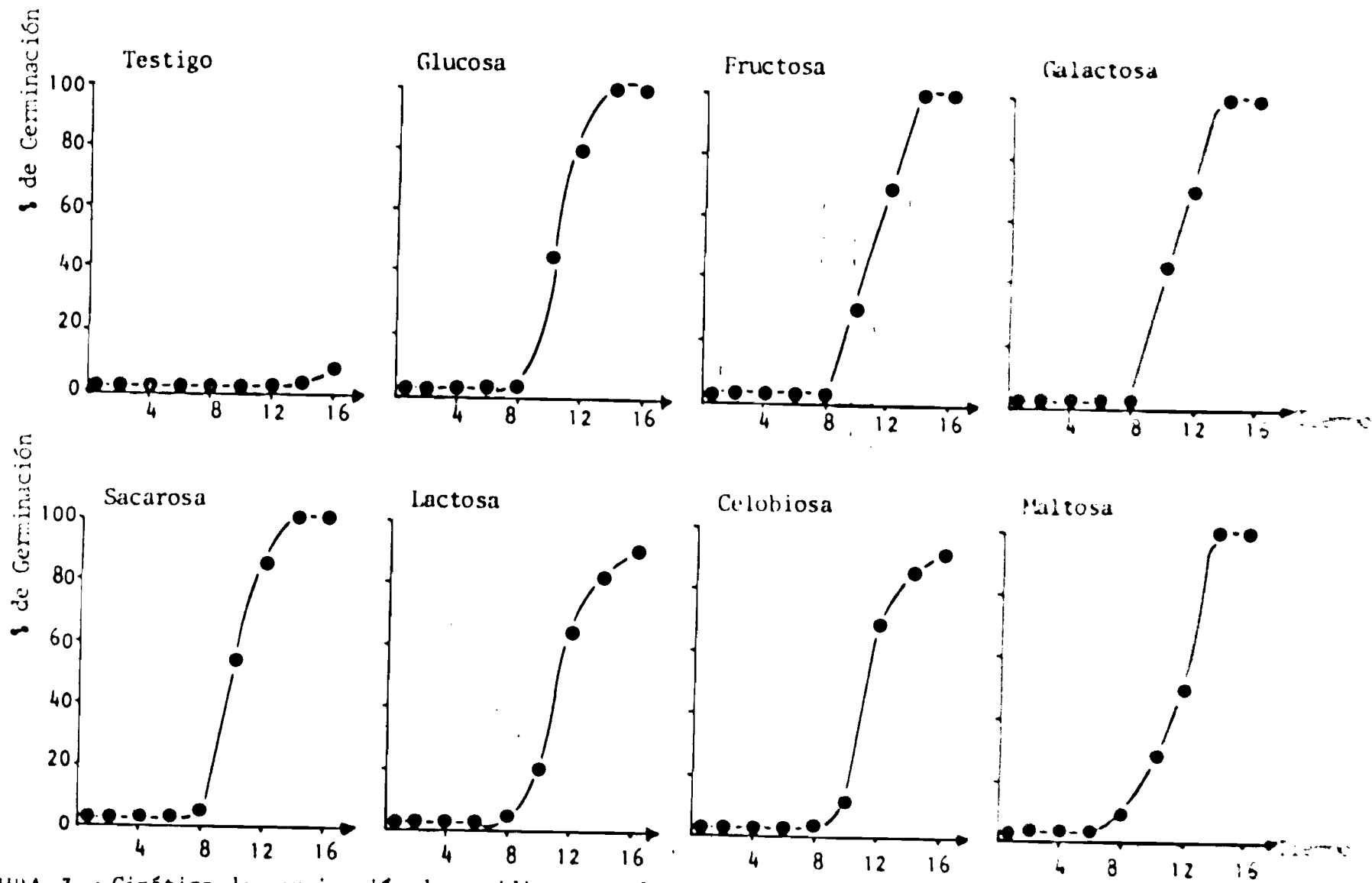


FIGURA 3 : Cinética de germinación de conidiosporas de *T. harzianum* cultivado sobre M.M.B. con diversos azúcares simples y disacáridos, en matraces erlen Meyer. En medio líquido agitado a 29°C

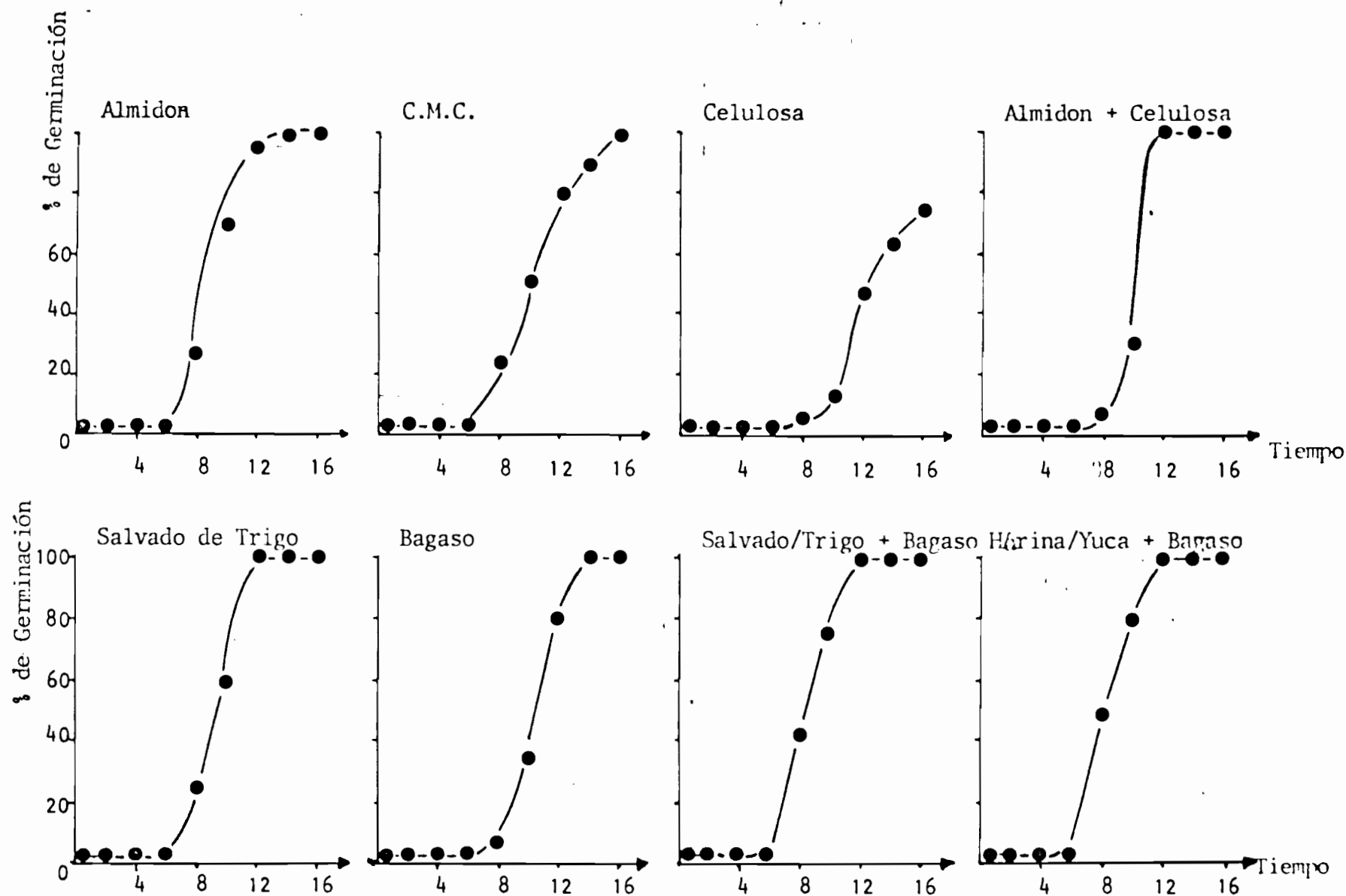


FIGURA 4 : Cinetica de germinación de conidiosporas de *T. harzianum* cultivado sobre M.M.B. conteniendo polisacaridos o sustratos celulósicos naturales, en medio líquido agitado a 29°C.

Carboximetil Celulosa (CMC) y tambien sobre Celulosa microcristalina (polimero de glucosa con enlace B-1,4) es considerablemente retardada. La tasa de germinacion es dos veces mas rapida sobre CMC que sobre Celulosa. Despues de 14 horas de cultivo sobre Almidon, la tasa de germinacion es de 100% cuando en realidad es de 45 % sobre CMC y solamente de 20% para los cultivos de Celulosa microcristalina, insoluble en el medio de cultivo.

Este estudio demostro claramente que la germinacion de conidiosporas de *I.harzianum* se inicia, por regla general, despues de 9 horas de cultivo que es el tiempo necesario para levantar la conservacion. La rapidez de la germinacion depende de la naturaleza del sustrato carbonado. Las conidiosporas contienen enzimas (Amilasas, Glucosidasas, Endo y Exo-Celulasas) que permiten la hidrolisis del sustrato en azucares simples y asegura la germinacion. Esto se verifica con la experiencia llevada a cabo posteriormente (Fig.3).

Sobre los sustratos celulosicos naturales (Bagazo, Salvado de Trigo o mezcla de estos dos) la germinacion es mucho mas rapida que la observada sobre los productos celulosicos purificados CMC y Celulosa.(Fig. 4.). En particular sobre el Salvado de Trigo, sobre la mezcla del Salvado de Trigo y Bagazo; y tambien sobre la mezcla de Harina de Yuca con Bagazo, despues de 12 horas de cultivo todas las conidiosporas han germinado. Se observo que la curva de germinacion de conidiosporas germinadas sobre Bagazo era identica a las obtenidas sobre Sacarosa, debido a cierta cantidad de Sacarosa residual del Bagazo que podria favorecer la germinacion. Por lo tanto utilizamos una mezcla de Salvado de Trigo y de un producto celulosico estudiado en un reporte con una relacion 2 a 8. (Roussos 1985.)

5.2) Prototrofia.

*I.harzianum* cultivado en medios sinteticos sin vitaminas (MMB), utiliza la totalidad de la glucosa despues de 66 horas de cultivo agitado a 29 C.(Tabla V.). Es pues una cepa prototrofa que no exige factores de crecimiento para su desarrollo.

5.3) Tolerancia a la Salinidad.

El crecimiento de *I.harzianum* sobre el MMB que contiene glucosa y concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 y 100 g/l, fue seguida durante 66 horas de cultivo en medio liquido a 29 C. Se puede constatar que esta cepa tolera concentraciones elevadas hasta de 80 g/l de NaCl. La totalidad del sustrato es consumido para concentraciones inferiores a 50 g/l de NaCl. Se notara que los valores de pH despues de 66 horas de cultivo son inferiores a 3 para los cultivos conteniendo entre 20 y 40 g/l de NaCl. (Tabla

TABLA II : Crecimiento de T. harzianum en función de la concentración de NaCl en un medio de cultivoconteniendo glucosa como fuente de carbono.

| (NaCl)<br>g/l | Crecimiento | pH<br>Final | Utilización<br>del Sustrato(%) |
|---------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| 0             | + + +       | 6.27        | 100                            |
| 1             | + + +       | 6.14        | 97                             |
| 5             | + + +       | 5.87        | 97                             |
| 10            | + + +       | 5.38        | 97                             |
| 20            | + + +       | 2.70        | 97                             |
| 30            | + + +       | 2.58        | 97                             |
| 40            | + + +       | 2.19        | 97                             |
| 50            | + + +       | 3.53        | 84                             |
| 60            | + + +       | 5.10        | 79                             |
| 70            | + +         | 5.22        | 79                             |
| 80            | +           | 5.15        | 59                             |
| 90            | -           | 5.09        | 0                              |
| 100           | -           | 5.00        | 0                              |

II). Se trata aquí de un fenómeno muy peculiar que parece estar ligado a la concentración de NaCl. A estas concentraciones el NaCl ejerce probablemente un poder mutagenico en el microorganismo en particular sobre la conidiogenesis de *I.harzianum*. A partir de estas concentraciones de NaCl hay una formación de blancos mutantes en la superficie de las cajas de petri acompañada de una caída del rendimiento en la esporulación. Esto puede ser debido también a una variación del metabolismo ligado a la esporulación. De todas maneras la explicación no parece clara y necesitaría desarrollarse estudios específicos para explicar este fenómeno.

#### 5.4) Tolerancia al pH.

Hemos visto que la cepa de *I.harzianum* es capaz de desarrollarse sobre medios muy ácidos. Para los valores iniciales de pH de 1.5 se observa un crecimiento sobre la utilización de 84% de glucosa. Para estos valores de pH superior a 2 e inferior a 9.5 el desarrollo normal de *I.harzianum* nos lleva a la utilización completa de la fuente de carbono (Tabla III). Los valores limitados de pH inicial para la germinación y multiplicación vegetativa de *I.harzianum* comprende entre 1.5 para los medios ácidos y 9.5 para los alcalinos. De una manera general se observa que el metabolismo del crecimiento de *I.harzianum* conduce a una alcalinización del medio, lo que no es siempre el caso en particular con *Aspergillus niger* que conduce a una acidificación del medio (Raimbault, 1980).

#### 5.5) Bioquímica y Nutrición.

El medio mineral que fue utilizado para los estudios de crecimiento de *I.harzianum* en presencia de 2 g/l de glucosa, puede también servir de MMB para el estudio de la asimilación de las diferentes fuentes de carbono. En un estudio anterior, sin embargo, se agregó una solución de vitaminas que es un aporte para los microorganismos autotróficos, este mismo MMB se le sustituyó el sulfato de amonio y la urea por otra fuente de nitrógeno a lo largo del crecimiento de *I.harzianum*.

#### 5.6) Fuente de Nitrógeno.

Estudios hechos anteriormente utilizaron un medio de cultivo enteramente sintético con las fuentes de nitrógeno siguientes: Nitrato, Nitrito, Amoniaco, Urea, al igual que una muestra de Urea con Sulfato de Amonio. Los mejores cultivos fueron obtenidos sobre la mezcla de Urea y Sulfato de Amonio. Las sales de Amonio al igual que el Amoniaco y Urea son muy bien utilizados por *I.harzianum* (Tabla IV). Hay que notar que el pH final es cercano a la neutralidad cuando la única fuente de

TABLA III : Crecimiento de T. harzianum en función del pH en un medio de cultivo conteniendo glucosa. El cultivo es agitado en erlemeyer a 29°C durante 66 hrs.

| pH inicial | Crecimiento | Diametro de pellet ( mm ) | pH Final | Proteínas precipitado (mg/l) | Utilización de sustrato ( % ) |
|------------|-------------|---------------------------|----------|------------------------------|-------------------------------|
| 1          | -           | -                         | 1.26     | 0                            | 0                             |
| 1.5        | +           | -                         | N D      | 9                            | 84                            |
| 2          | +           | -                         | 3.31     | 101                          | 99                            |
| 3          | +           | 2.4                       | 6.14     | 83                           | 98                            |
| 4          | +           | 2.4                       | 6.27     | 79                           | 99                            |
| 5          | +           | 5.9                       | 6.31     | 83                           | 99                            |
| 6          | +           | 4.6                       | 6.38     | 74                           | 99                            |
| 7          | +           | 2.5                       | 6.41     | 66                           | 99                            |
| 8          | +           | 6.10                      | 6.49     | 94                           | 99                            |
| 9          | +           | 1.3                       | 7.18     | 65                           | 99                            |
| 9.5        | +           | 1.3                       | 7.58     | 10                           | 82                            |
| 10         | -           | -                         | 8.71     | 0                            | 0                             |



TABLA IV : Utilización de diferentes fuentes de Nitrogeno por T.harzianum en cultivos agitados con glucosa a 29°C durante 66 horas.

| Fuente de Nitrogeno    | pH   | Proteinas<br>mm/l | Actividades<br>Amilasicas<br>mg gluc/l |
|------------------------|------|-------------------|--|
| Nitrato                | 6.85 | 141               | 0                                      |
| Nitrito                | 6.30 | 104               | 0                                      |
| Urea                   | 6.30 | 211               | 145                                    |
| Urea+Sulfato de Amonio | 6.60 | 217               | 107                                    |
| Amoniaco               | 2.70 | 186               | 100                                    |
| Cloruro de Amonio      | 2.70 | 175               | 145                                    |
| Fosfato de Amonio      | 2.90 | 191               | 60                                     |
| Sulfato de Amonio      | 2.70 | 185               | 95                                     |

nitrogeno presente esta en forma de Nitrato, Nitrito, Urea o de otra mezcla de Urea con Sulfato de Amonio. Al contrario se nota una fuerte acidez (pH 2.7) cuando la fuente de nitrogeno es el amoniaco o una sal de amonio.

La asimilacion de Nitrato por *I.harzianum* se hace gracias a la biosintesis de Nitrato Reductasa. Asi mismo el Nitrito es tambien asimilado, esta cepa sintetiza una Nitrito Reductasa. Hay que notar que el cultivo sobre el Nitrito es ciertamente mas lento, pero el nitrito a la concentracion utilizada no inhibe el crecimiento de *I.harzianum*.

#### 5.7) Fuente de Carbono.

*I.harzianum* se desarrolla bien sobre los azuceres siguientes : Glucosa, D-Fucosa, L-Fucosa, Lactosa, D-Ribosa, Xilosa, Celobiosa, Galactosa, Sacarosa, Almidon, Manitol y Celulosa. Sin embargo, no se utilizan los siguientes azuceres : D-Arabinosa, D-Fructosa y Maltosa (Tabla V).

Los rendimientos de produccion de proteina fueron diferentes segun la naturaleza de los azuceres utilizados. En particular sobre la Lactosa, Sacarosa y Galactosa se han obtenido rendimientos relativamente elevados cuando sobre la Celulosa y Xilosa los rendimientos de produccion fueron mas pequenos.

Las actividades amilasicas presentes fueron importantes para los cultivos sobre Almidon. Sin embargo se descubrio una actividad amilastica mediana sobre los sustratos siguientes : Celobiosa, Manitol, D-Ribosa y Sacarosa. De este hecho el mejor inductor de Amilasas es ciertamente el Almidon pero la Celobiosa, el Manitol, la D-Ribosa al igual que la Sacarosa puede tambien provocar la biosintesis de esta enzima.

Las Celulasas fueron producidas esencialmente a partir de cultivos sobre Celulosa. Sin embargo una actividad Celulasica sensible fue detectada sobre la Lactosa, el Almidon y la Celobiosa.

Utilizando el metodo anterior (Roussos, 1982) para la descripcion de hongos imperfectos, hemos estimado cuantitativamente la utilizacion de azuceres como unica fuente de carbono y de energia y medido la tasa de asimilacion de diferentes fuentes de nitrogeno para *I.harzianum*. Para hacerse, hemos dosificado los azuceres residuales al igual que las actividades enzimaticas en el sobrenadante y las proteinas en el precipitado del cultivo.

TABLA IV : Utilización de azúcares por *T.harzianum* en cultivos agitados a 29°C durante 66 horas, en un medio mineral de base con 2 g/l de sustrato.

| Fuente de Carbono | pH   | Azúcares Residuales mg/l | Proteínas del micelio mg/l | Actividades Celulasicas mg gluc/l | Actividades Amilasicas mg gluc/l |
|-------------------|------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Prototrofia       | 6.40 | 0                        | 212                        | 73                                | 114                              |
| Glucosa + Vitam   | 6.60 | 0                        | 217                        | 70                                | 107                              |
| D-Arabinosa       | 5.45 | 1.642                    | 34                         | 0                                 | 0                                |
| D-Fucosa          | 4.55 | 385                      | 235                        | 75                                | 325                              |
| D-Fucosa          | 6.00 | 0                        | 250                        | 70                                | 350                              |
| Lactosa           | 6.40 | 0                        | 318                        | 330                               | 112                              |
| D-Ribosa          | 6.60 | 0                        | 215                        | 90                                | 510                              |
| Xylosa            | 6.65 | 0                        | 181                        | 63                                | 112                              |
| B-D-Fructosa      | 5.85 | 1049                     | 0                          | 0                                 | 0                                |
| Celobiosa         | 5.40 | 0                        | 230                        | 100                               | 850                              |
| Galactosa         | 6.40 | 0                        | 270                        | 90                                | 300                              |
| Maltosa           | 5.80 | 905                      | 17                         | 90                                | 375                              |
| Sacarosa          | 6.60 | 0                        | 276                        | 68                                | 496                              |
| Almidon           | 6.40 | 0                        | 251                        | 149                               | 1480                             |
| Celulosa          | 5.45 | 500                      | 119                        | 675                               | 44                               |
| Manitol           | 6.40 | 0                        | 265                        | 0                                 | 680                              |

### 5.8) Influencia del pH. sobre la Produccion de Celulasas.

El MMB que contiene Celulosa (2 g/l) fue utilizado en este estudio; el pH inicial fue ajustado a valores entre 2 y 9 antes de la esterilizacion.

En todos los casos un crecimiento positivo fue observado en los pH inciales variando de 2 a 9. La produccion de Celulasas es mas elevada cuando el pH es acido con un maximo para pH 5. Para pH inciales superiores a 6, la cantidad de Celulasas decae fuertemente al igual que la utilizacion de los sustratos. Estos resultados indican que *L.harzianum* se desarrolla bien en medios muy acidos y que las Celulasas son producidas preferentemente en medio acido (Tabla VI).

TABLA VI : Crecimiento y producción de celulasas de T. harzianum en función del pH inicial del medio de cultivo con celulosa. Cultivos agitados a 29°C duranre 84 hrs.

| pH Inicial | Crecimiento | pH Final | Utilización de sustrato (%) | Producción de Celulasas UI ACMC/1 |
|------------|-------------|----------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 2          | +           | 5.7      | 93.5                        | 194                               |
| 3          | ++          | 5.7      | 98.5                        | 192                               |
| 4          | ++          | 5.8      | 99.0                        | 192                               |
| 5          | ++          | 5.7      | 98.0                        | 248                               |
| 6          | ++          | 5.9      | 98.0                        | 70                                |
| 7          | ++          | 6.7      | 89.0                        | 37                                |
| 8          | ++          | 6.9      | 78.0                        | 28                                |
| 9          | +           | 7.6      | N D                         | 0                                 |

## VI. CONCLUSION.

Este estudio demostro la importancia que tiene el conocimiento de la fisiologia de los hongos filamentosos celuloliticos, particularmente y en este caso, de *I.harzianum* ya que como hemos expresado anteriormente el uso que la biotecnologia hace de estas especies es cada vez mayor.

*I.harzianum* resulto ser una cepa muy atractiva en cuanto posibilidades de uso, confirmando asi las referencias que de el teniamos. este microorganismo es capaz de desarrollarse aceptablemente en una gran cantidad de fuentes de carbono, ya sean azucares simples, disacaridos, polisacaridos o substratos lignocelulosicos variados, utilizandolos en su mayoria tanto para su proceso de germinacion o reproduccion vegetativa. Es aparente que los enlaces glucosidicos B-1,4 influyen fuertemente en la cinetica de germinacion.

Utiliza tambien una variedad de fuentes de nitrogeno incluyendo nitratos y nitritos. Es interesante hacer notar que *I.harzianum* es una cepa prototrofa que no necesita de factores de crecimiento para desarrollarse perfectamente, ademas es capaz de desarrollarse en condiciones extremas, tanto de salinidad (0 a 80 g/l) como de acides (hasta un pH 2) y tambien alcalinidad (hasta pH 9). El rango de temperatura que soporta para su desarrollo es de 10 a 30°C.

Finalmente, este estudio confirma las referencias que teniamos de *I.harzianum* en cuanto a la degradacion de la celulosa y la produccion de celulasas.

## VII. REFERENCIAS.

Dubos, B., Roudet, J., Bulit, J., Bugaret, Y. (1983). L'utilisation du *Trichoderma harzianum* dans la pratique viticole, pour lutter contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Les antagonismes microbiens, 24eme colloque SFP, Bordeaux 26-28 Mai 1983, Ed. INRA (Les colloques de l'INRA No. 18 : 289-296).

Frossard, R., Oertli, J.J. (1982). Growth and germination of fungal spores in guttation fluids of Barley grown with different nitrogen sources. Trans. Br. Mycol. Soc. 78 : 239-245.

Hassid W. Z. & E. Neufeld. 1964. Quantitative determination of starch in plant tissues. In Methods Carbohydrate Chem. R. W. Whistler Ed. pag 33-36

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Miller, G. L. (1959). Use of diitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytic Chemistry 31 : 426-428.

Muindi, P. J., Hanssen, J. F. (1981 a). Nutritive value of cassava root meal enriched by *Trichoderma harzianum* for chickens. J. Sci. Food Agric. 32 : 647-654.

Muindi, P. J., Hanssen, J. F. (1981 b). Protein enrichment of cassava root meal by *Trichoderma harzianum* for animal feed. J. Sci. Food Agric. 32 : 655-661.

Pettersson, L. G. (1975). The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose by *Trichoderma viride*. In "Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose" (Bailey, M., Enarai, T. M. et Linko M. eds)., Sitra, Helsinki, 12-14 mars 1975.

Raimbault, M. (1980). Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylic. These d'Etat. Univ. Paul Sabatier, Toulouse, 291 p.

Roussos, S. (1982). Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. Cah. ORSTOM Ser. Biol. 45 : 25-34.

Roussos, S. (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, Sporulation et Production de Cellulases. Thèse d'Etat. Université de Provence. 163 p.

Scott, Troy A.; Melvin, Eugene H. (1953). Determination of Dextran with Anthrone. Analytical Chemistry Volume 25, No. 11.



## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Pagina

## 1. TABLAS.

|  |    |
|--|----|
| I) Composicion del medio de Cultivo.                       | 8  |
| II) Efecto del NaCl sobre el crecimiento.                  | 15 |
| III) Crecimiento de <i>I. harzianum</i> en funcion del pH. | 17 |
| IV) Utilizacion de diferentes fuentes de Nitrogeno.        | 18 |
| V) Utilizacion de diferentes Fuentes de Carbono.           | 20 |
| VI) Produccion de Celulasas en funcion del pH. inicial.    | 22 |

## 2. Figuras.

|  |    |
|--|----|
| 1) Principales etapas fisiologicas de <i>I. harzianum</i> .                        | 3  |
| 2) Diagrama de Tratamiento de las Muestras.  | 10 |
| 3) CINETICAS de germinacion sobre mono y disacaridos.                              | 12 |
| 4) CINETICAS de germinacion sobre polisacaridos y sustratos celulosicos naturales. | 13 |

EVALUACIÓN TÉCNICO-ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE  
PECTINASAS POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO  
-EN MÉXICO.

Reseña efectuada por:

ISAIAS RAMOS AGUILAR.

México D. F. abril de 1987.

## EVALUACIÓN TÉCNICO ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO EN MÉXICO.

### SÍNTESIS.

En este trabajo se presenta una investigación de mercado, un estudio técnico y una evaluación financiera para la producción de pectinasas por fermentación en medio sólido en México. Estas enzimas se importan para abastecer la demanda nacional, por lo que sería importante producirlas para evitar la fuga de divisas.

La F.S.S tiene muchas ventajas de carácter económico respecto a la fermentación en cultivo sumergido.

Las pectinasas se consumen en la industria de jugos de uva y de manzana y en la vinícola.

La capacidad de la planta se fijó con base a limitaciones de tipo tecnológico para procesar 1500 Kg de materia prima húmeda al día, produciendo 82 Kg de pectinasas de 1300 UI/g.

Se decidió localizar la planta en Veracruz, Ver., trabajar 340 días/año, 3 turnos/día.

En el estudio técnico se seleccionaron equipo y tecnología para un proceso viable, utilizando un fermentador tipo zymotis; para la recuperación de enzimas producidas por A. niger se optó por un prensado, evaporación al vacío del jugo y secado por aspersión.

La inversión fija requerida es de 1217 y la total de 1244 millones de pesos (jul 1987). El precio de venta es de 2108 pesos y el de costos fijos unitarios 8697 pesos si se trabaja al 100 % de capacidad.

Dadas las condiciones actuales la planta no es rentable. Los esfuerzos de investigación deben dirigirse a la optimización del proceso y a la reducción de los costos.

**OBJETIVOS:**

Efectuar un análisis de mercado en México; realizar un estudio técnico y financiero de la producción de pectinasas por fermentación en sustrato sólido (F.S.S.) en un reactor estático.

**INTRODUCCION:**

Las enzimas como biocatalizadores proteicos se utilizan a nivel industrial para mejorar o transformar ciertas materias primas, debido a su alta especificidad y funcionamiento en condiciones de operación moderadas; una limitante para su utilización es su alto costo de producción. De las 2000 enzimas caracterizadas se comercializan a escala industrial aproximadamente 30, entre las cuales destacan: proteasas, amilasas, renina y glucosa-isomerasa.

Comúnmente la fuente de obtención de enzimas comerciales es microbiológica y a través de uno de los dos métodos básicos siguientes:

- a) Cultivo en medio líquido
- b) Cultivo en medio sólido

Entre las ventajas que ofrece este último método (respecto a enzimas fúngicas extracelulares) destacan: menor capacidad de inversión, tecnología más sencilla, bajos requerimientos de agua y energía, mínimo tratamiento de efluentes, obtención de enzimas más concentradas. Sin embargo el proceso presenta dificultades para su escalamiento; entre las limitantes más severas están la remoción de calor metabólico y el control de la humedad del producto.

Existen enzimas pécticas que despolimerizan las moléculas de pectina sin afectar su grado de esterificación (glucosidasas) y aquellas cuya acción es desesterificar pectinas sin afectar su grado de polimerización (liasas y estererasas); se emplean en la extracción de jugos de frutas porque disminuyen el tiempo de filtración y aumentan el rendimiento, en la clarificación de vinos y jugos, en la estabilización de néctares y mejoramiento del prensado de fruta, en el enraido de fibras textiles, en el curado de café y tabaco y en la extracción del aceite de coco.

Pueden obtenerse mezclas de pectinasas con alta actividad mediante el uso de hongos.

JUSTIFICACIÓN:

Un grupo de investigación del Departamento de Biotecnología de la UAM - Iztapalapa y ORSTOM (Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación) desarrollan una tecnología, que se encuentra a nivel semipiloto, para usar sustratos sólidos en la producción de biomasa, enzimas y metabolitos de alto valor agregado.

En este punto se requiere una estimación de las posibilidades de los productos en el mercado mexicano con relación a la competencia, para lo cual es necesario calcular los costos de producción, productividad e inversión a nivel industrial, mediante un escalamiento determinado por la capacidad de la planta, misma que puede establecerse mediante un análisis de mercado.

La producción de pectinasas en México tendría efectos deseables en cuanto a: la reducción de la dependencia tecnológica y consecuentemente del pago de divisas, la creación de fuentes de trabajo, el mejoramiento de la alimentación animal, la disminución de desechos agroindustriales.

INVESTIGACIÓN DE MERCADO:

- a) **MATERIA PRIMA.** Las materias primas esenciales para la producción de pectinasas son básicamente las utilizadas en el medio de cultivo.

**Bagazo de Caña:** es, en volumen, la materia prima más importante y proviene como desecho de la industrialización de la caña de azúcar; su composición promedio es: 38 % celulosa, 34 % hemicelulosa, 11 % lignina (Roussos, 1985).

En México hay 72 ingenios azucareros, de los cuales 23 tienen un excedente de bagazo a pesar de los usos diversos que éste tiene: combustible, soporte de melazas y/o granos para alimentos balanceados, fabricación de papel y de conglomerados de madera. (en 1985 se obtuvo una producción de bagazo de 12, 492, 610 ton y un excedente de 2, 498, 521 ton).

Los posibles vendedores de bagazo son los ingenios con excedente, entre los cuales se halla el más importante del país, San Cristóbal, ubicado en Veracruz; en ellos se clasifica el bagazo en seco, fibra seca y fibra apata; el primero es la materia prima de interés para la producción de pectinasas por F. S. S. Su costo es de 11 686 pesos por tonelada (dic 1986) y varía en función directa del precio del combustible. Se necesitan inventarios altos de bagazo porque durante 4 meses no se produce; si además se considera su alto costo de transporte debido a su baja densidad, se sugiere la localización de la planta cerca de algunos ingenios con excedentes.

**Urea y Sales Minerales:** El sulfato de amonio, el sulfato ácido de potasio y la urea son producidos en México en cantidades in-

industriales. Sus precios por kilogramo en septiembre de 1985 fueron: 72.45 pesos, 776.25 pesos y 120.55 pesos, respectivamente. Algunos proveedores son: ABAQUIM (urea), MCLINA FONT (sulfato ácido de potasio), MARDUFOL, S. A. y PROVEQUIM (sulfato de amonio).

**Melaza:** La melaza es un subproducto de la industrialización de la caña de azúcar; puede adquirirse en cualquiera de los ingenios azucareros del país durante todo el año, lo cual le da cierta independencia al proceso. Por su alta viscosidad es un material difícil de manejar.

Se utiliza como fuente alterna de carbono, por ser más barata que la sacarosa, en razón de 0.53 ton/ton de bagazo; la producción de enzimas puede variar por esta sustitución en el abastecimiento de carbono, por lo cual se requiere la optimización del cultivo a nivel industrial.

Para su venta se tienen dos tipos:

- melaza agropecuaria: cuyo costo es de \$22 750 pesos más 15 % de IVA.
- melaza industrial: tiene un precio de 54 600 pesos más 15 % de IVA.

En 1985 su producción total fue de 1 299 231 toneladas.

**Harina de Yuca:** se requiere en pequeña cantidad como sustrato en la producción de inóculo (1 Kg yuca/ton de bagazo). Sólo se produce en Huemanguillo, Tabasco y en Veracruz. Su costo era de 30 pesos/ Kg en febrero de 1986.

**Desecho de Manzanas:** Se utiliza como inductor en la fermentación. Es una fuente natural de pectinas, requeridas para que el hongo produzca pectinasas. Se obtiene en grandes cantidades en compañías sidreras, la mayoría de éstas se localiza en Cholula, Pue.; su costo es de 8000 pesos/ton (diciembre 1986) y se encuentra disponible en el período junio-octubre.

El desecho de manzanas contiene 10 % de pectinas en base húmeda; para su almacenamiento, debe secarse con el fin de mantener la producción durante todo el año, ya que sólo se encuentra disponible en un lapso de 4 meses.

b) **COMPETENCIA:** En México no existe empresa alguna que produzca pectinasas, la demanda nacional se satisface a través de la importación; las empresas importadoras son filiales de grandes transnacionales dentro del campo de las enzimas.

Actualmente dominan el mercado:

**ENMEX, S. A.:** filial de Miles Laboratories; importa el producto CLAREX L, un complejo de pectinasas con 1500 AJDU (apple juice despectinization unit) para la clarificación de jugos de manzana. Negocia con Estados Unidos.

**QUIMORGAN:** representante de Gist Brocades Fermentation Industries; distribuye el producto KLERZYME 200, que importa de Francia.

**ROHM and HASS:** importa de Alemania Federal.

**PROBST:** importa ROHAPECT D, complejo pectolítico con 20 FAU (pectinolytic activity unit).

El precio se fija con base en la actividad del producto, su pureza y contenido de enzima. La mayoría de los productos comerciales son una mezcla de enzimas, aunque los más específicos contienen sólo un tipo de ellas.

Para 1985 el valor de las importaciones de pectinasas fue de 346, 439 dólares por concepto de 23, 149 Kg. Se observa que la competencia es fuerte: se trata de grandes transnacionales que cuentan con amplia diversidad de productos, el mercado es reducido y probablemente de difícil penetración.

- c) MERCADO: El principal mercado de las pectinasas está constituido por las industrias alimentarias que elaboran jugos y las vitivinícolas. A continuación se presentan las principales empresas que compran a ROHM (R), ENMEX (E) y QUIMORGAN (Q):
- Productos de Uva de Aguascalientes, S. A. de R. L. - E, Q, R.
  - Jugos de Frutas Mundet (D. F., Coahuila, Durango) - Q, R.
  - Sidrera Pelayo, S. A. (Tlaxcala) - Q
  - Productos Gerber, S. A. de C. V. (Querétaro) - Q
  - Cavas de San Juan (Querétaro) - E.
  - Industrias Vinícolas Domecq, S. A. (Sonora, Coahuila) - E, Q, R.

d) TENDENCIA DEL MERCADO.

d.1. NACIONAL.

Basándose en datos de importación de pectinasas durante el período 1981 - 1983 y una correlación exponencial se obtiene una tendencia que indica que el mercado está creciendo. En 1985 el mercado fue de aproximadamente 25 ton de pectinasas tomando como base la actividad del producto CLAREX L o de 15 ton con referencia a la actividad del ROHAPECT D.

d.2. INTERNACIONAL.

En 1985 se estimó el mercado internacional en 75 000 ton. de enzimas con un valor de 600 millones de dólares; seis industrias dominan el mercado en cantidad y valor (Novo Industries 50 %, Gist Brocades 20 %, Miles Laboratories y otras 12%, por citar algunas).

El 3 % del mercado total de enzimas corresponde a las pectinasas (45 millones de dólares).

CAPACIDAD DE LA PLANTA:

La capacidad de la planta depende de la demanda del producto y de las limitaciones de tipo tecnológico.

Para obtener los balances de materiales necesarios para evaluar el proyecto se supuso el porcentaje máximo de sólidos igual al obtenido por Roussos en la producción de celulasas (4.7 %). Tal porcentaje depende en buena medida del rendimiento de la fermentación, peso molecular promedio de la mezcla enzimática, la naturaleza de los metabolitos extracelulares presentes en el jugo, etc.

Esta base de cálculo determina la cantidad de producto obtenido, así como las características y dimensiones de los equipos utilizados en la recuperación de enzimas, pero no influye en la

actividad enzimática total que puede producir la planta. El producto que se obtiene utilizando un reactor estático tipo zymotis posee 1304 UI/g; la demanda nacional de enzimas en el año de 1985 fue de:

$$25\ 000\ \text{Kg} \times 5,370,000\ \text{UI/Kg} = 1.35 \times 10^{11}\ \text{UI de actividad enzimática.}$$

por lo que se hubiesen requerido:

$$1.35 \times 10^{11} \times 1,304,000\ \text{UI/Kg} = \underline{103,528\ \text{Kg}}$$

lo cual equivaldría a tener 224 reactores estáticos utilizándose 340 días al año. La planta descrita contaría con 60 zymotis y procesaría 1500 Kg húmedos al día (\*) produciendo 77.7 Kg diarios de una mezcla de pectinasas en polvo.

Con tales condiciones sólo se abarcaría una pequeña porción del mercado nacional (el 25 % en 1985), con lo cual se concluye que la capacidad de la planta no puede establecerse con base en un criterio de penetración en el mercado pues existe una limitante de tipo tecnológico.

#### LOCALIZACIÓN DE LA PLANTA:

La localización de la planta se basa en la disponibilidad de materias primas, insumos, así como de infraestructura social (comunicaciones, accesos y transportes) y en incentivos fiscales. Las materias primas esenciales (bagazo y melaza) provienen de ingenios azucareros, por lo que la planta se ubica en el estado de Veracruz, donde se encuentran 6 ingenios que podrían vender sus derivados de producción.

Para determinar la microlocalización se eligió como base una infraestructura de parque industrial; se analizaron cuatro alternativas: Veracruz, Tuxtepec, Coatzacoalcos y Orizaba. Se decide por Veracruz, Ver. como resultado de un análisis de costos por concepto de transporte y de incentivos fiscales (el gobierno mexicano otorga en esta zona estímulos del 30 % sobre los impuestos. Esta elección permite contar con: 3 proveedores potenciales de materia prima (ingenios: Gloria, el Modelo y San Pedro), una disminución en los costos de transporte, estímulos fiscales, mano de obra disponible. Las limitantes significativas de esta localización son el clima cálido, que interfiere en forma negativa sobre el proceso de fermentación, y la humedad del ambiente.

#### SELECCIÓN DE EQUIPO Y TECNOLOGÍA.

a) TIPOS DE PROCESO: La fermentación en sustrato sólido se caracteriza por la actividad de microorganismos en ausencia de agua libre, con niveles de humedad que varían entre el 40 y 75 %. La fermentación en cultivo sumergido o líquido (F.C.S.) se desarrolla en medios diluidos con aproximadamente 90 % de agua o más. La mayoría de los productos de fermentación se obtienen con

(\*) Los 1500 Kg corresponden a los 15 Kg procesados actualmente en la UAF-Iztapalapa con un escalamiento de 1:100.



esta tecnología; en cuanto a la F.S.S., actualmente produce a nivel comercial: ácido cítrico, ácido gálico, enzimas y alimentos fermentados enriquecidos en proteínas (Raimbault, 1981).

b) SELECCION DEL PROCESO: para seleccionar la tecnología más apropiada se realizó una ponderación de ventajas y desventajas de cada proceso, utilizando criterios tecnológicos y económicos. La F.S.S. posee varias ventajas, como son: requerimiento de un medio de cultivo relativamente simple, condiciones asépticas no muy estrictas, el volumen de los equipos es menor que para la F.C.S. (el sustrato y el producto son muy concentrados), desperdicia poca agua, el tratamiento de efluentes es mínimo, no hay formación de espuma y los requerimientos de energía son bajos (para el caso de aereación). Las principales limitantes que posee la F.S.S. incluyen: la producción de inóculo, la remoción del calor metabólico y control de la humedad son difíciles, el acondicionamiento del sustrato, el proceso tecnológico no está desarrollado completamente, etc.

Debido a que las inversiones para la F.S.S. son menores y a que la UAM-I y CRSTCM están desarrollando este tipo de tecnología, se optó por la producción de pectinasas en sustrato sólido.

c) DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS PRINCIPALES DEL PROCESO A NIVEL SEMIFILOTICO:

c.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Consiste en la producción de un inóculo de Aspergillus niger de  $3 \times 10^7$  esporas/gramo de sustrato en peso seco,  $40'$  a  $110^\circ \text{C}$  de esterilización en autoclave, incubación a temperatura ambiente con aireación de  $60 \text{ l/hora}$  y duración de 6 días; con un rendimiento de  $6.03 \times 10^9$  esporas/g sustrato (PS).

Se analizan dos alternativas de equipo: la primera consiste en elegir un esporulador de acero inoxidable con accesorios (mallas, flecha, motor, etc.), cuyo costo es de un millón de pesos (nov 1986) y presenta problemas de escalamiento. La otra, presenta la posibilidad de usar botellas de pyrex que son más económicas que el esporulador de discos pues tienen un costo de 35 000 pesos (dic 1986); su manejo es complicado y requiere relativamente de más mano de obra; no obstante se decidió producir el inóculo en tales botellas.

c.2. FERMENTACIÓN.

Se realiza en un reactor estático tipo zymotis de 50 Kg de capacidad, se inocula con  $2 \times 10^7$  esporas/g sustrato (BH) con un tiempo de incubación de 45 hr y con un flujo de aire de 300 a 600 l/hr/Kg a  $35^\circ \text{C}$ .

c.3. RECUPERACIÓN DE ENZIMAS.

Después de 45 horas de fermentación el producto se prensa, obteniéndose dos fracciones: una de 3 l con actividad de 100 UI/ml y otra de 4 l con 50 UI/ml, para 10 Kg de medio de cultivo húmedo. Los jugos que se obtienen se centrifugan a 500 rpm durante 30 min a  $4^\circ \text{C}$ , en esta operación se eliminan los sólidos suspendidos y se obtiene un jugo con actividad de 97.9 UI/ml; que es sometido a ultrafiltración, la cual proporciona 1400 ml con actividad de 143 UI/ml.

#### c.4. LISTA DE EQUIPO.

El equipo mínimo necesario para la producción de pectinasas con este proceso es el siguiente:

- c.4.1. Tanque Agitado con Hélice: Útil para disolver las sales en agua y mezclarlas con la melaza.
- c.4.2. Mezcladora de Sólidos Tipo Amasadora de Brazo Doble: Útil para mezclar el bagazo, el desecho de manzana y sales disueltas junto con la melaza en agua; también se ocupa para inocular la suspensión de esporas.
- c.4.3. Autoclave: requerido para esterilizar las botellas de esporulación y sus filtros y para dar tratamiento térmico al medio de cultivo.
- c.4.4. Reactor Estático tipo Zymotis: Es la unidad central del proceso, tiene una capacidad para 50 Kg de sustrato húmedo. Está constituido por una cuba paralelepípeda dividida en 9 compartimientos separados por 10 placas de refrigeración; se llena manualmente. En cada compartimiento se coloca el sustrato preparado y acondicionado hasta una altura máx. de 48 cm. El reactor ocupa un volumen de 100 litros.
- c.4.5. Compresora de Etapas Múltiples con Enfriamiento entre Etapas: Útil para satisfacer la demanda de oxígeno de 60 zymotis con A. niger durante la fermentación.
- c.4.6. Secador de Charolas: requerido para secar el desecho de manzana y el producto fermentado; diseñado para procesar 2 lotes diarios de 875 Kg en 5 horas/lote.
- c.4.7. Bombas: Una centrífuga de 1.25 Hp para zymotis; otra para el tanque de almacenamiento centrífuga de 0.5 Hp.
- c.4.8. Prensa Hidráulica: requerida para extraer el jugo concentrado que se obtiene al finalizar la fermentación, ya que en el producto de la fermentación se encuentra la mezcla de enzimas pécticas; tiene una capacidad de 250 Kg y potencia de 11 Hp con una presión de operación de 240 psi.
- c.4.9. Evaporador al Vacío de Tubos Verticales con Accesorios (eyector y condensador barométrico): utilizado para concentrar el jugo que contiene la mezcla enzimática; presenta una capacidad de evaporación de 376 lb/hr, presión de vacío de 13.1 lb/in<sup>2</sup>, eficiencia de evaporación de 0.78 lb agua/lb vapor.
- c.4.10. Secador por Aspersión con Accesorios (ventilador, ciclón, filtro para sólidos finos, esprea con motor centrífugo y tanque colector de sólidos): requerido para secar la mezcla concentrada que sale del evaporador al vacío de tubos verticales, presenta una capacidad de secado de 39.49 lb agua/hr; la potencia del motor centrífugo es de 0.3 Hp nominales.
- c.4.11. Caldera: Suministra el vapor necesario para el autoclave, el flujo de vapor saturado liberado es de 1500 lb/hr, utiliza gas natural como combustible, consume 59.16 m<sup>3</sup> de combustible/hr.

### ANÁLISIS ECONÓMICO:

Para una planta que procese 1500 Kg de materia prima/día (BH) la inversión total es de 1244.41 millones de pesos, correspondiendo el 97.79 % a la inversión fija y el resto al capital de trabajo.

#### RENTABILIDAD DEL PROYECTO.

El estado de resultados basado en proyecciones del primero y último años de operación indican que los egresos superan en gran medida a los ingresos (E = 293.21 millones de pesos, I = 66.5 millones de pesos para el primer año; E = 625.82 e I = 145.6 millones de pesos para el último año); por lo tanto, en ningún momento existen utilidades, es decir, el proyecto no es rentable. Otro indicador que apoya esta conclusión es el punto de equilibrio, que demuestra el requerimiento de 933 ton de producto para mantener el equilibrio entre ingresos y egresos, esto significa que se debería ampliar la capacidad instalada de la planta para producir esta cantidad. Aún teniendo la capacidad, se producirían  $1.2 \times 10^{12}$  UI/año y la máxima cantidad de unidades vendidas en los últimos 5 años ha sido de  $1.35 \times 10^{11}$  UI/año; lo cual corresponde a 8.9 veces más de unidades que tendría que aceptar el mercado, es decir, se rebasaría por completo la demanda nacional. Por estas razones el proyecto no es rentable.

#### CONCLUSIONES.

- La investigación de mercado no es suficiente para tener confianza en los datos obtenidos y, por ende, en las proyecciones.
- Se requiere mayor investigación a nivel piloto para optimizar el proceso (permitiendo disminuir costos al incrementar los rendimientos del producto).
- Es necesario optimizar los medios de cultivo.
- Se requiere analizar otras alternativas del equipo principal de proceso (fermentador zymotis) y/o analizar otros criterios de escalamiento (no escalar en forma modular).
- Debe optimizarse el uso de los equipos de mayor costo: zymotis, secador por aspersión, evaporador al vacío.
- Se debe desarrollar con más profundidad la ingeniería básica, ya que los datos no son suficientes para evaluar el proyecto.
- Los índices utilizados para la estimación del costo de equipo no se adaptan bien a una realidad en continuo cambio.
- Los altos costos se deben principalmente a la inversión requerida.
- En las condiciones actuales el proceso no es rentable.

RESUMEN.

En este trabajo se presenta una investigación de mercado, un estudio técnico y una evaluación financiera para la producción de pectinasas por fermentación en medio sólido.

Actualmente estas enzimas se importan para abastecer la demanda nacional, por lo que sería importante producirlas en nuestro país para evitar la fuga de divisas.

Se escogió la tecnología de fermentación en medio sólido pues en la UAM-I, en colaboración con CRSTOM, se desarrollan investigaciones en este sentido. Además la F.S.S. tiene muchas ventajas de carácter económico sobre la F.C.S.

La investigación de mercados se encaminó a identificar a los proveedores de materia prima (y sus precios), a la competencia y a estimar la demanda nacional. Las pectinasas se consumen en la industria jguera de uva y manzana y en vinícola. El valor del mercado alcanzó su máximo en 1985 (346 000 dólares). Las proyecciones muestran que la demanda aumentará en el futuro. Las empresas competidoras (Enmex, Quimorgan, Rohm) son filiales de importantes transnacionales.

La capacidad de la planta se fijó en base a limitaciones de tipo tecnológico, para procesar 1500 Kg de materia prima húmeda al día. Esto equivale a una producción diaria de 82 Kg de una mezcla de pectinasas en polvo, con actividad de 1300 UI/g.

Con el fin de reducir los costos de transporte de materia prima y producto terminado, se decidió localizar la planta en Veracruz, Ver. Además en esta ciudad se cuenta con estímulos fiscales.

Debido a que la manzana y la uva son frutos temporales, las pectinasas sólo se consumen entre mayo y septiembre. Se decidió trabajar 340 días/año, tres turnos/día para utilizar la inversión todo el año, a pesar de requerirse importantes inventarios de producto terminado.

En el estudio técnico se realizó una selección de equipo y tecnología con el fin de obtener un proceso industrial viable. Se decidió utilizar un fermentador estático (zymotis). Para la recuperación de enzimas producidas por A. niger se optó por un prensado. Se decidió evaporar al vacío el jugo obtenido para concentrarlo y posteriormente secarlo por aspersion.

Principalmente en base al costo del equipo se determinó la inversión fija requerida para la planta (1217 millones de pesos, jul 1987). Al mismo tiempo, se calculó el capital de trabajo, que asciende a 1244 millones de pesos.

Por otro lado se calcularon los costos fijos, al igual que los variables. Se estableció un precio de venta de 2108 pesos/Kg, julio de 1987. Con base en los resultados del análisis de mercado se hicieron proyecciones a 10 años. Se intentó obtener el punto de equilibrio, sin embargo, el precio de venta es de 2108 pesos, mientras que tan sólo los costos fijos unitarios ascienden a 8697 pesos si se trabaja al 100 % de capacidad.

Dadas las condiciones actuales, la planta no es rentable. Se requiere de mayor investigación, ya que el producto es mucho menos activo que los comerciales.

Los esfuerzos de investigación deben dirigirse hacia la optimización del proceso y a la reducción de los costos: la menor inversión y optimización del uso de la energía.

"PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS POR FERMENTACION  
EN MEDIO SOLIDO"

## I. INTRODUCCION

En la actualidad la incipiente producción de enzimas, que se suscita en nuestro país, combinada con las crecientes aplicaciones en diversas áreas de la industria, no solo alimentaria, sino farmacéutica, química y entre otras; provoca que la mayoría de estas enzimas se adquieran en mercados externos, lo cual no resulta ser una garantía, ya que el desarrollo de tecnología basado en estos productos, implica riesgos de mayor dependencia económica y constante fuga de divisas.

Considerando que existe una gran cantidad de recursos naturales y subproductos agroindustriales, los cuales deben ser aprovechados no sólo en la producción de enzimas, sino en la producción de diversidad de productos farmacéuticos, químicos, etc., es necesario acoplar tecnologías adecuadas para lograr este objetivo. Una de las alternativas de empleo, la constituye la producción de enzimas, de manera que por un lado se resuelva la necesidad en materia de productos enzimáticos y por otro lado, se implementen nuevas alternativas de industrialización de residuos agrícolas.

Aunque las principales limitaciones de los productos enzimáticos son el costo y su disponibilidad, actualmente se realizan esfuerzos para producirlos con tecnología propia, minimizando los costos de producción, mediante el uso de subproductos agroindustriales.

La fuente más común de enzimas comerciales utilizadas en alimentos son los microorganismos, aunque también se comercializan enzimas de origen vegetal. Una de las áreas importantes en la industria de alimentos en la cual las enzimas tienen un papel relevante, debido a su efecto sobre la textura de los alimentos, es la Industria de Procesamiento de Frutas (4, 26). El sustrato de interés es la pectina y las enzimas que modifican esta sustancia son conocidas como enzimas pécticas (5,10,12,13,14,15,30,31,33).

El sistema de producción convencional de las enzimas pécticas es el cultivo sumergido. En este se incluyen los componentes básicos para el crecimiento microbiano: una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, minerales traza y otras sustancias que favorezcan la producción de las enzi-

mas, en este caso el sustrato inductor es la pectina (9,28). Otra sustancia que presenta alternativas de producción de estas enzimas es la fermentación en cultivo sólido, ésta es conocida como fermentación Koji, (1,6,7,11,13,17), se refiere al crecimiento de los microorganismos sobre materiales insolubles con la humedad absorbida dentro de la matriz sólida, pero sin la presencia de una fase líquida libre, Cannel y Moo Young (6). Los materiales más comúnmente utilizados son materiales celulósicos o lignocelulósicos, como salvado de trigo, de arroz, bagazo de caña, etc. La mezcla de nutrientes, junto con el inóculo son disueltos en agua y posteriormente absorbidos en el material sólido.

El desarrollo de tecnología del cultivo sólido para la producción de enzimas, es reciente en nuestro país. En otros países como Japón esta tecnología ha sido más estudiada.

En la actualidad, se han desarrollado investigaciones sobre la utilización de la fermentación sólida como alternativa para la producción de proteína microbiana y para la producción de enzimas extracelulares. Siendo los hongos filamentosos los microorganismos más interesantes, dado que permiten la utilización de residuos agroindustriales mediante tecnología relativamente simple, así como operaciones de recuperación de metabolitos sencillas.

Considerando que existe ya información con respecto al sistema de cultivo sólido y tomando en cuenta la importancia de las enzimas pécticas, es factible desarrollar un proceso de fermentación en cultivo sólido para la producción de estas enzimas, siendo este el objetivo principal del presente trabajo.



## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Microorganismos

Se utilizaron cepas de Aspergillus niger, Penicillium sp y Rhizopus oryzae, las dos primeras cepas proporcionadas por el Dr. Carlos Huitrón del Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; fueron aisladas sobre pulpa de henequén por Susana Saval y el Dr. Carlos Huitrón (25). La tercera cepa de colección proporcionada por American Type Culture Collection (ATCC), 4858.

Las cepas anteriores se seleccionaron por su alta actividad pectinolítica. Son conservadas en un medio Extracto de Malta-Bacto-agar (difco. ref. 024) a 24°C durante 6 meses.

### 2.2 Preparación del inóculo

Las esporas se obtienen en matraces de 250 ml con 17 g de masa sólida. El medio está constituido por 20g de harina de yuca, 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5g de urea, 0.5g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 de  $\text{CaCl}_2$ , 7.5g agar en 500 ml de agua a pH=5.6.(23).

Después de esterilizar el medio de cultivo en autoclave, los matraces se inoculan con esporas de una preparación en tubo inclinado del microorganismo y posteriormente incubados a 30°C por una semana.

Preparación de la suspensión de esporas.-Al matraz con esporas se adicionan 100 ml de agua destilada y una gota de Tween 80. El matraz se deja agitar por 15 minutos. La suspensión obtenida se pasa a través de una gasa para eliminar el micelio. La concentración de esporas se estima por cuenta microscópica directa, usando una cámara de Neubauer.

Cuantificación de esporas y cantidad del inóculo.-De la suspensión de esporas anterior, se hace una dilución con agua destilada. Esta dilución debe ser perfectamente homogénea. La cámara de Neubauer se llena con esta solución usando una pipeta pasteur. La cuantificación se hace tomando 10 cuadros al azar y se observa en el microscopio con el objetivo de 40x. Se obtiene un pro-

medio de esporas por cuadro. Este promedio se multiplica por el factor de conversión  $25 \times 10^4$  y por la dilución hecha inicialmente, obteniéndose una concentración  $x$  de esporas por ml de suspensión.

Usualmente un solo matraz proporciona aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  esporas, que es suficiente para inocular 2 kg de substrato sólido. Raimbault (22).

La concentración de esporas necesaria para la fermentación se calcula considerando la cantidad de gramos de substrato peso seco en el medio. La concentración óptima de esporas por gramo de substrato es de  $2 \times 10^7$  (22).

### 2.3 Medios de Cultivo y Condiciones

#### 2.3.1 Medio líquido

El medio líquido utilizado se seleccionó en base a los máximos rendimientos reportados en la literatura para cada uno de los componentes del medio en la producción de enzimas pécticas (18,19,28,29).

El medio se preparó con 2% de sacarosa como fuente de carbono, y 2% de pectina como substrato inductor para la síntesis de pectinasas. El medio contiene además 2% de extracto de levadura, 0.5% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.02% de  $\text{NaSO}_4$  y minerales traza: 1.0 mg/1 de  $\text{FeSO}_4$ , 0.8 mg/1 de  $\text{ZnSO}_4$ , 4 mg/1 de  $\text{MgSO}_4$  y 1.0 mg/1 de  $\text{CuSO}_4$ , 5  $\text{H}_2\text{O}$ . El medio se esteriliza a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Posteriormente se ajusta el pH a 4.5. Las condiciones óptimas de la fermentación son:  $30^\circ\text{C}$  y en el inóculo de  $2 \times 10^7$  esporas/g de substrato peso seco.

Se utilizaron 12 matraces de 250 ml conteniendo 125 ml de medio de cultivo líquido e inoculado con esporas en condiciones estériles. Los matraces se taparon con gasa y algodón. La fermentación se sigue por 5 días y tomando muestras por duplicado para cada día.

En todos los casos los matraces se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  a 200 rpm en un baño con agitación y temperatura regulada.

#### 2.3.2 Medio sólido

Se realizaron estudios preliminares utilizando el medio de cultivo des-

crito para cultivo líquido. El soporte sólido que se utilizó fue bagazo de caña proporcionado por el Ingenio de Zacatepec, Mor., libre de azúcares. El bagazo fue secado, molido y tamizado para obtener la fracción 20-50.

Preparación del medio sólido.-Se prepara el medio líquido sintético para tener el contenido de humedad requerido para la fermentación, se considera para esto los constituyentes sólidos del medio y el bagazo de caña necesario.

El bagazo de caña se humedece con el 50% del medio de cultivo preparado. Se esteriliza el medio líquido restante y el medio sólido por separado a 121°C durante 15 minutos en autoclave (21).

El medio líquido se ajustó a pH 4.5 después de la adición del inóculo. La fermentación en cultivo sólido se realiza en reactores empacados. El soporte sólido es bien mezclado junto con la solución conteniendo los nutrientes y el inóculo. La humedad final del medio sólido es de 70%.

El medio sólido preparado se reparte en los incubadores a razón de 30g por columna, encontrándose cada incubador en un baño maría con termostato a 35°C. El aire húmedo entra a razón de 4-6 l/hr. El sistema de incubación se muestra en la fig. 1 (22).

El sistema de incubación consta de un humidificador que tiene una entrada de aire y una columna de vidrio con 3.6 cm de diámetro y 16.5 cm de altura la cual contendrá el medio sólido. En la parte inferior y superior se coloca algodón y papel filtro para evitar contaminación y condensación durante la fermentación.

El tiempo de fermentación es de 72 horas. Se toman muestras por duplicado (cada columna constituye una muestra). Se toma una muestra a tiempo cero como control y a partir de las 15 horas se muestrea a intervalos de 5 horas.

#### 2.4 Método de extracción de enzimas pécticas

El proceso de extracción de las enzimas y otros metabolitos solubles se

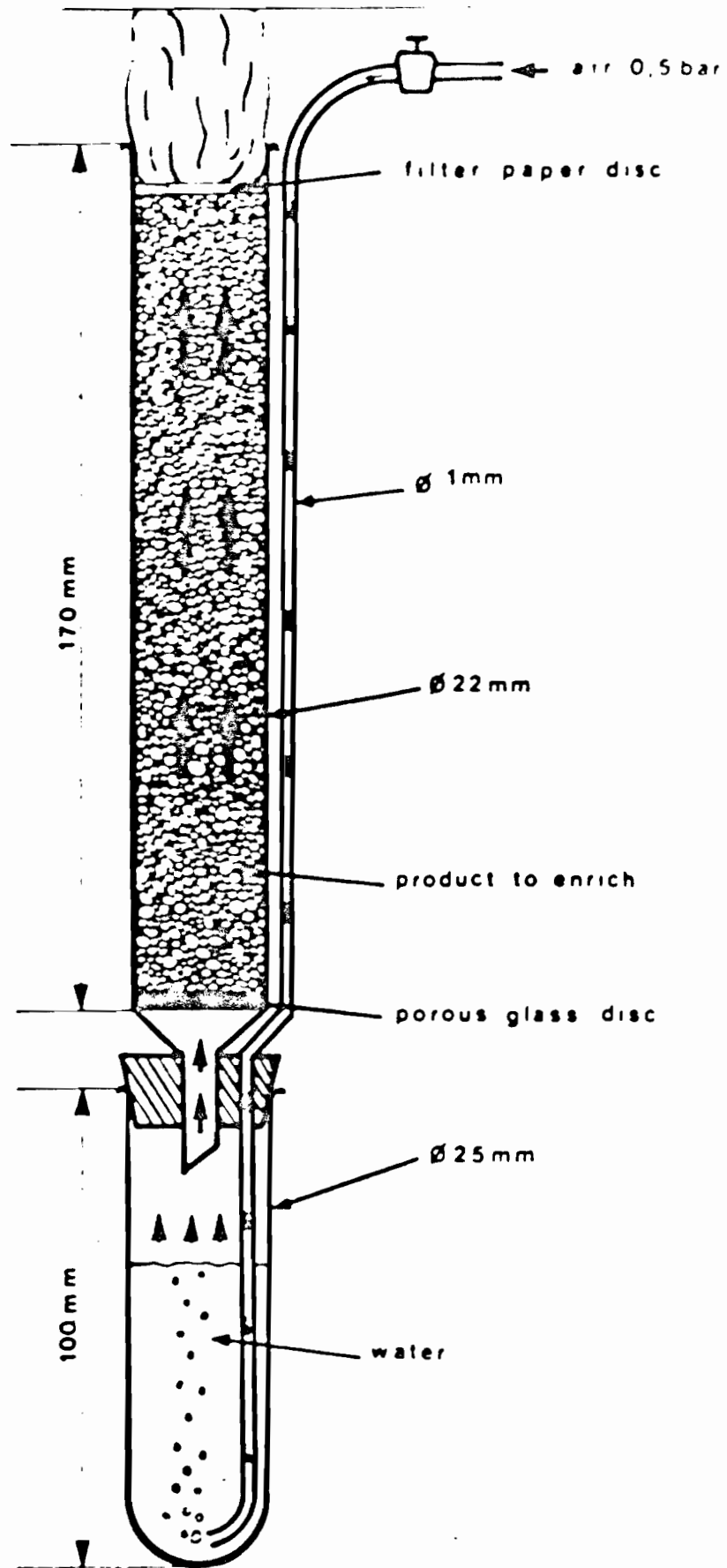


Fig. 1 Microfermentador en columna

efectúa con ayuda de una celda especialmente diseñada y adaptable a una prensa hidráulica. Este proceso consta de dos etapas una primera etapa donde se prensa el producto sin tratamiento y una segunda donde se añade agua al residuo insoluble de la primera extracción (23).

Obteniéndose una primera fracción soluble. La fracción insoluble de la primera extracción se le adicionan 20 ml de agua destilada, se mezcla perfectamente y se lleva a cabo una segunda extracción, obteniéndose la segunda fracción soluble.

## 2.5 Evaluación de los parámetros de la fermentación en cultivo sólido y en cultivo líquido.

Los parámetros evaluados para seguir el curso de la fermentación en los dos tipos de cultivo son prácticamente los mismos, pero los métodos usados son diferentes.

Para el medio líquido la determinación de la biomasa se realiza por el método de determinación de peso seco. Se toman 25 ml de muestra homogénea del caldo de fermentación, se filtran con vacío sobre papel filtro a peso constante. La biomasa obtenida se lava con agua destilada y se coloca en una caja petri, secándose a 100°C en una estufa, durante 6 a 8 horas.

El pH se mide en 25 ml del caldo de fermentación a 25°C en un potenciómetro (pH-meter E 516 Titriskop Metrohm Herisau).

Determinación de la Actividad Pectinolítica.-La actividad pectinolítica se determina por viscosimetría. Esta determinación se lleva a cabo con una solución de pectina al 1% en amortiguador de acetatos (pH 5.0) y a 30°C. Una unidad se define como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad inicial en un 25% en 20 minutos. Inicialmente se analizó una enzima comercial (Irgazime, Ciba-Geigy). Para la medición de actividad se emplearon dos metodologías:

- a) Uso del viscosímetro Brookfield Modelo HBT
- b) Uso de una pipeta graduada de 0.1 ml (28)

Para el caso de la enzima comercial, se utilizaron concentraciones de enzima de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, determinándose la viscosidad en centipoises contra el tiempo de reacción (min) o el tiempo de flujo (seg), contra el tiempo de reacción (min), dependiendo de la metodología empleada. En base a los resultados obtenidos y representados en la fig. 2 se observa un comportamiento lineal en ambos métodos a las mismas concentraciones de enzima, así como en los tiempos de reacción, por lo que se llegó a la conclusión de que se podía trabajar con el método más sencillo, considerando sólo el intervalo de concentración donde ambos son equivalentes y la linearidad entre la concentración de enzima y la velocidad de reacción, se conserva.

En el caso del cultivo líquido se emplea como solución de enzima el sobrenadante del caldo de fermentación, después de centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.

Para cultivo sólido se emplean las fracciones solubles obtenidas en la operación de prensado, después de dejar que se sedimenten partículas en suspensión.

Para el caso de la fermentación sólida, el tratamiento de las muestras se realiza según el esquema de la fig. 3.

El contenido de humedad se determina gravimétricamente en 5g de producto.

Para la medición de pH, carbohidratos residuales (azúcares totales y azúcares reductores), y determinación de ácidos nucleicos se requiere de preparar inicialmente una suspensión de 5g producto en 50 ml o 100 ml de agua destilada después de mezclar perfectamente.

La determinación de ácidos nucleicos.-En esta determinación se emplea el método de Ogur y Rosen (20) por extracción de los ácidos nucleicos en ácido perclórico. 5 ml de la suspensión se centrifugan a 3000-5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se elimina con una pipeta pasteur y a la parte insoluble se le adicionan 5 ml de ácido perclórico (0.5-0.7 M), mezclando perfectamente. La digestión de las muestras se lleva a cabo en un baño fisiológico con agitación y temperatura controlada, a 70°C durante 20 minutos. Después de la digestión, las muestras

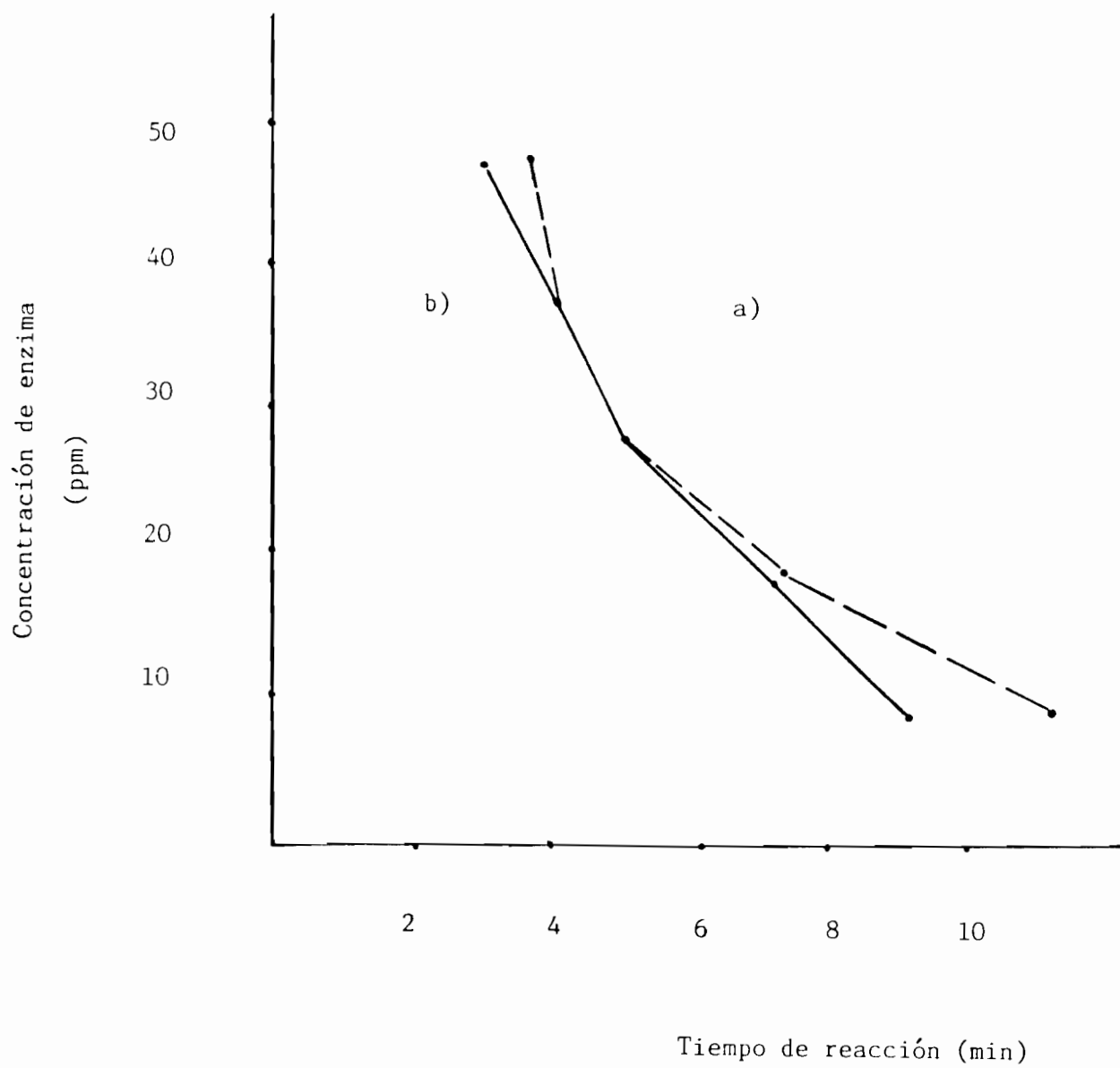


Fig. 2 Determinación de la Actividad Pectinolítica por Viscosimetría: a) uso del viscosímetro Brookfield, (- - -); b) Uso de una pipeta graduada de 0.1 ml (—).

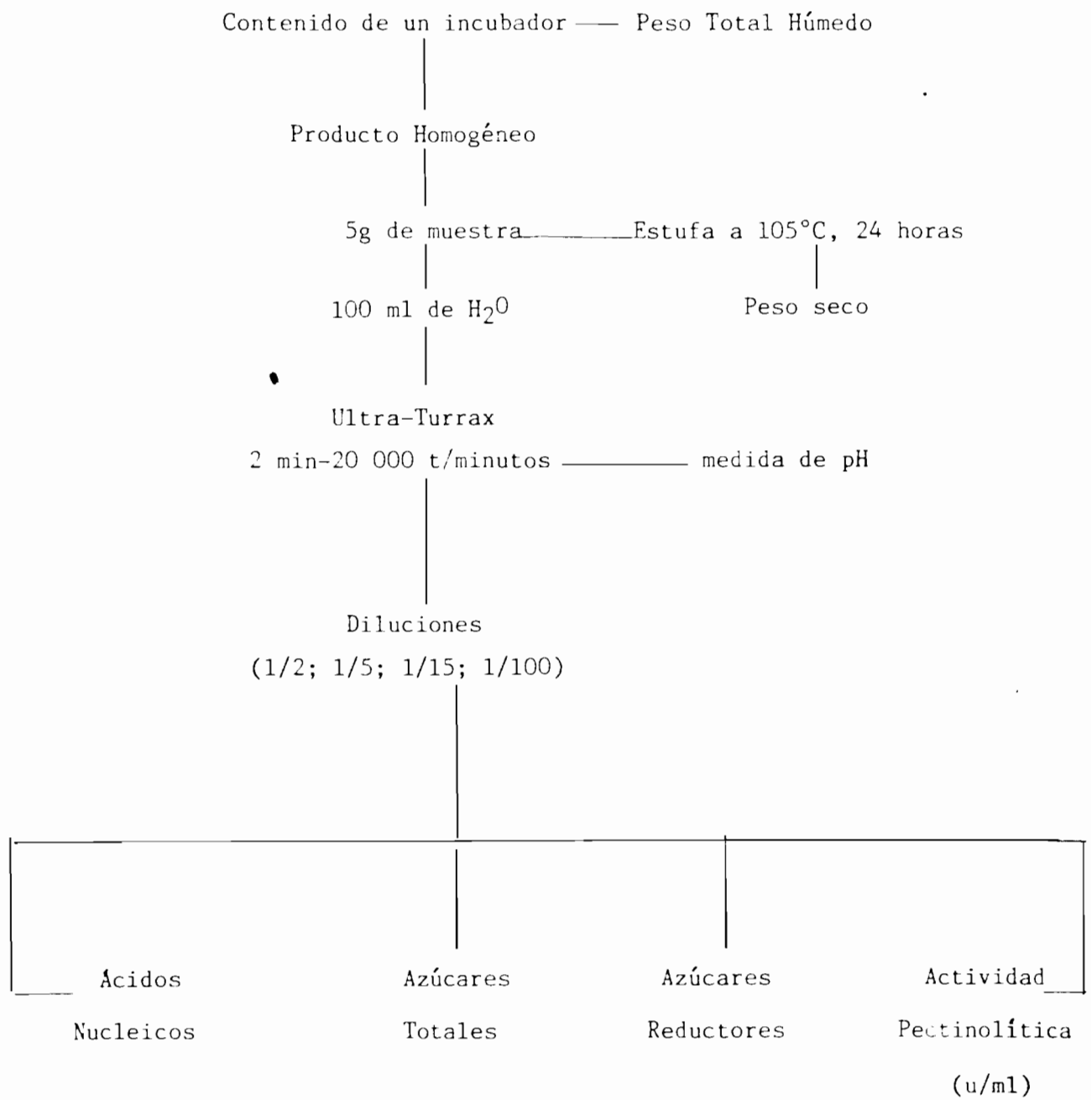


Fig. 3. Esquema de tratamiento y análisis de las de las muestras del producto en la fermentación sólida.



se centrifugan a 3000-5000 rpm durante 15 minutos. La solución debe estar cristalina para evitar interferencias. Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro Beckman Modelo 25, a 260 nm entre 0.1-0.6 de Densidad Óptica.

Determinación de Carbohidratos Residuales.-Para determinar el consumo de sacarosa se empleó el método de determinación de Azúcares Reductores por el Ácido 3-5 Dinitrosalicílico (16), después de la hidrólisis de la sacarosa residual por la enzima Invertasa (Miles de México). Se toman 9 ml de una suspensión homogénea (4g de producto en 96 ml de agua destilada) y un ml de enzima (2 mg/ml). La reacción se efectúa a 55°C por 10 minutos, para una completa hidrólisis. Por otro lado se determinan los azúcares reductores presentes en las muestras sin tratamiento enzimático. La diferencia de estas dos determinaciones es la concentración de sacarosa en las muestras. Se expresa en mg/g producto peso seco inicial. En ambos casos se utilizó glucosa como estándar.

## 2.6 Termoestabilidad de la enzima

La solución de enzima con actividad de 142.9 U/ml se incubó a una temperatura de 50°C con agitación continua. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0,10,15,30,45 y 60 minutos), determinándose la actividad pectinolítica por el método antes descrito.

## 2.7 Prueba semipiloto

De acuerdo a los resultados obtenidos a nivel laboratorio resulta factible escalar este proceso a un nivel de producción mayor, como es un nivel semipiloto en reactor estático de tipo zymotis.

El biofermentador estático Zymotis para el cultivo de hongos filamentosos en medio sólido sobre substratos amiláceos y celulósicos es descrito en la fig. 4 y 5, Roussos (23). Está constituido por una cuva paralelepípeda dividida en doce compartimientos separados por placas de refrigeración.

El llenado del Zymotis se hace colocando en cada compartimiento el medio sólido preparado y condicionado (70% de humedad). La capacidad de este fermentador es de 50 kg de medio sólido preparado.

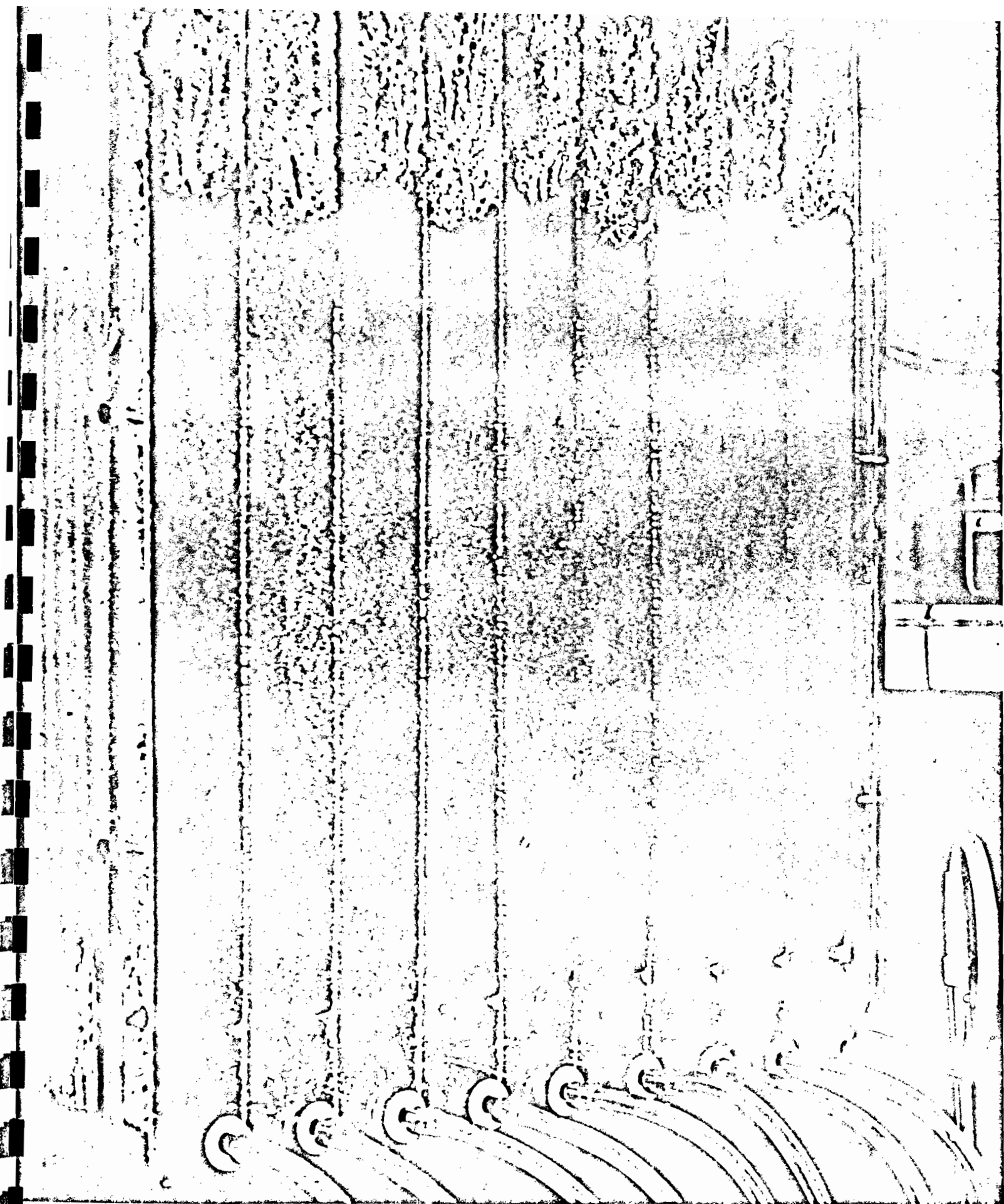


Fig. 4 Vista Lateral del Biofermentador  
Zymotis

1. reactor
2. controlador de temperatura
3. fuente caliente
4. bomba
5. electroválvula
6. electroválvula
7. recirculación de agua
8. sensor de temperatura
9. agua caliente
10. agua fría

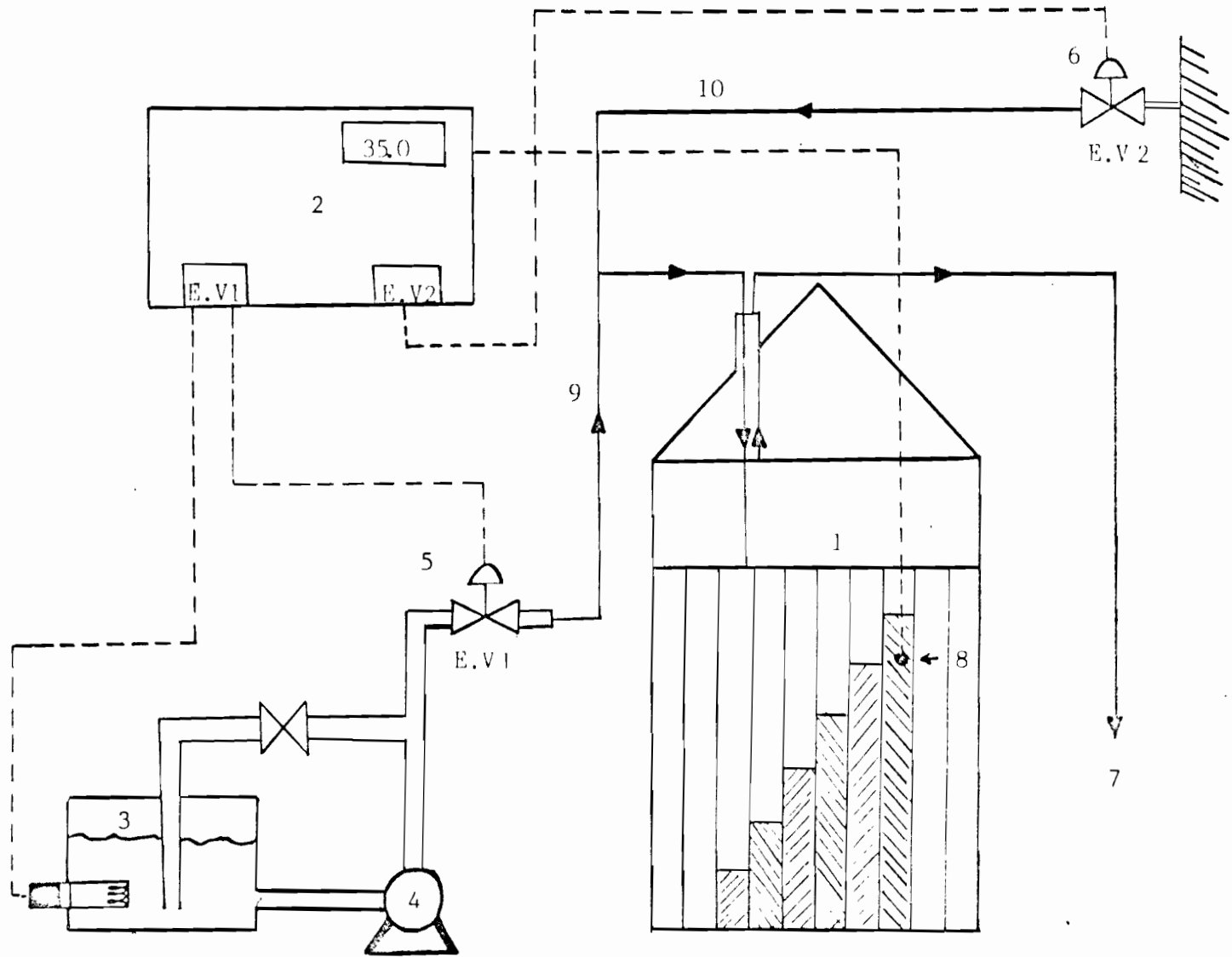


Fig. 5 Reactor estático Zymotis: esquema de instalación

La aireación del cultivo se hace por la base de la cuva, asegurando una buena oxigenación del medio sólido, el aire saturado de agua entra a razón de 300-600 l/hora/kg. La temperatura se controla a 35°C.

El fermentador se llenó a una capacidad de 10 kg de medio sólido impregnado con el medio sintético anteriormente descrito para la producción de pectinasas. El inóculo se adicionó en una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas/g de sustrato peso seco y el pH de 4.5, fue ajustado de la misma forma que en nivel laboratorio. La fermentación se siguió durante 45 horas.

### Ultrafiltración

La mezcla de las fracciones solubles obtenidas del producto prensado, con actividad de 57.9 u/ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, para evitar que las enzimas presentes en el extracto se desnaturalicen. El objeto de la centrifugación es eliminar partículas en suspensión.

El volumen de extracto obtenido es tratado por un método de separación: la ultrafiltración. Este método utiliza presión o fuerza centrífuga para obligar a pasar el medio acuoso y las moléculas de menor peso molecular a través de una membrana semipermeable o una fibra porosa que permite la retención de las moléculas de mayor peso molecular como las enzimas. Los pesos moleculares de corte son función de la membrana o fibra seleccionada. La operación de separación se llevó a cabo en un equipo de ultrafiltración Modelo RF-LAB-5RF con capacidad de 10 litros por hora, el tipo de membrana es de PM 10 Romicon, con peso molecular de corte de 10 000.

El volumen de trabajo fue de 6 litros, la presión de salida de 5 Psi, la presión de entrada de 26.3 Psi.

### 2.8 Aplicaciones del producto

Dentro de las aplicaciones más importantes de las enzimas pécticas en la industria agroalimentaria se encuentra la extracción de jugos y la clarificación

de estos mismos, los cuales se ubican en la industria de procesamiento de frutas. Una aplicación reciente es en el proceso de extracción de aceite de coco (8). Este proceso presenta grandes ventajas en la extracción del aceite por vía enzimática, destacando la mejor calidad del producto obtenido, la reducción de costos de infraestructura y de mano de obra.

Con la finalidad de probar el producto obtenido por fermentación en cultivo sólido se realizaron aplicaciones del producto en la clarificación de jugo de manzana y la extracción de aceite de coco por vía enzimática, al mismo tiempo que se comparó con una enzima comercial.

A. Aplicación de la enzima (Aspergillus niger) en la clarificación de jugo de manzana.

La despectinización del jugo de manzana es una determinación de la actividad pectinolítica relativa de la enzima péctica.

Procedimiento:

Obtención del jugo de manzana.-Se trituraron las manzanas finalmente. Después se mezcló una parte de la pulpa obtenida por una parte de solución de NaCl al 0.1%. La suspensión resultante se filtró a través de gasa o manta cielo para obtener el jugo.

Volúmenes iguales del jugo se colocaron en tubos de ensaye, a uno de los cuales se adicionó la solución de enzima comercial para obtener una concentración final de 30 ppm y al otro la solución de enzima de Aspergillus niger a una dilución final de 1:50. El sistema de reacción se incubó a 45°C durante una hora. Pasado este tiempo se inactivaron las enzimas a 90°C por 5 minutos. Un volumen igual de jugo de manzana se utilizó como control.

Esta misma prueba se realizó tomando diferentes volúmenes de enzima de Aspergillus niger, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml de la solución de enzima a las mismas condiciones y tomando un volumen igual de jugo de manzana como testigo.

B. Aplicación de la enzima de Aspergillus niger en la extracción de aceite de coco.

La aplicación de enzimas en este proceso es relativamente nueva (8). Entre las enzimas que intervienen en el proceso están las pectinasas y otras de interés industrial. Considerando interesante la aplicación de estas enzimas en la extracción de aceite de coco se procedió a realizar un experimento en el cual se comparó la enzima producida de Aspergillus niger y una enzima comercial.

Procedimiento:

Se utilizaron 600 g de carnaza de coco maduro y fresco. La carnaza se picó en una Moulinex y se dividió en dos partes iguales. Se formó una emulsión en la licuadora con la cantidad correspondiente de agua (dilución 1:4), para 300g de coco se requieren 1 200 ml.

Las emulsiones obtenidas se pasaron a 2 matraces de 2 litros, los cuales se usaron como recipientes de reacción. Las condiciones del sistema de reacción se controlaron mediante el uso de un baño de agua con control de temperatura a 40°C y un agitador de aspas con agitación de 200 rpm.

Con las condiciones de operación establecidas se adicionaron las enzimas al 0.1% (p/v). Las enzimas utilizadas fueron: Pectinasas Irgazyme (Ciba-Geigy) PG; Tanasa Amilasa (Complementos Alimenticios S. A.); (Proteasas microbianas de Enmex) Papaína y la solución de enzima producida de Aspergillus niger. Se diseñaron dos sistemas:

| Sistema I |      | Sistema II    |       |
|-----------|------|---------------|-------|
| Amilasa   | 0.1% | Amilasa       | 0.1%  |
| Papaína   | 0.1% | Papaína       | 0.1%  |
| Pectinasa | 0.1% | Pectinasa     | 10 ml |
| Comercial |      | (de A. niger) |       |

Después de 30 minutos de reacción, la emulsión tratada se decantó para eliminar sólidos. La solución de cada matraz se pasó a 1 matraz de 2 litros respectivamente y se dejó en refrigeración para que la grasa se separara formando una capa en la parte superior de cada matraz. El agua de la parte inferior se eliminó mediante un sifón, la grasa que se obtiene con la menor cantidad de agua posible. Posteriormente se recupera en vasos de precipitados y se coloca en la estufa para fundir la grasa y centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos. El contenido de grasa del coco es de 27%.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Comparación de Cepas

Para seleccionar la cepa adecuada se consideró la producción de enzima y cantidad de biomasa como parámetros fundamentales.

Primeramente se realizó la selección de cepas en medio líquido, en matraces agitados utilizando el medio de cultivo sintético. Se hicieron varias pruebas con un tiempo de fermentación de 120 horas, tiempo óptimo para el proceso en cultivo líquido. La tabla 1, muestra la actividad producida para cada cepa, medida por viscosimetría y la biomasa producida por determinación del peso seco.

De los resultados obtenidos se observa que la cepa de Aspergillus niger demuestra ser la más interesante en términos de la actividad enzimática, seguida por la de Penicillium sp. Esta última alcanza un máximo de actividad de 20 u/ml pero a largo tiempo (120h) y dada la dificultad para mantener las condiciones estériles en la fermentación sólida se optó por un proceso lo más corto posible. La cepa de Rhizopus oryzae se descartó por la dificultad de obtener esporas y el bajo nivel de producción de enzimas.

#### 3.2 Diseño del Medio de Cultivo Sólido

El método de cultivo sólido se basa principalmente en la distribución homogénea del sustrato, esporas y sales en el material sólido usado como so-

TABLA No. 1 PRODUCCION DE PECTINASAS CON DIFERENTES  
CEPAS., ENSAYOS EN MATRACES AGITADOS

| CEPA                     | TIEMPO (h) | BIOMASA (g/l) | pH  | ACT. PECT. (U/ml) |
|--------------------------|------------|---------------|-----|-------------------|
| <u>Aspergillus niger</u> | 48         | 4.84          | 3.8 | 5                 |
| <u>Penicillium sp</u>    | 48         | 0.778         | 4.4 | 0                 |
| <u>Rhizopus oryzae</u>   | 48         | 12.20         | 4.2 | 0                 |
| <u>Aspergillus niger</u> | 72         | 7.71          | 3.7 | 5                 |
| <u>Penicillium sp</u>    | 72         | 0.87          | 4.4 | 0                 |
| <u>Rhizopus oryzae</u>   | 72         | 16.55         | 4.1 | 1                 |
| <u>Aspergillus niger</u> | 120        | 6.95          | 3.5 | 11.1              |
| <u>Penicillium sp</u>    | 120        | 6.46          | 5.5 | 20                |
| <u>Rhizopus oryzae</u>   | 120        | 18.30         | 3.9 | 5                 |



porte. El contenido de humedad y el pH son esenciales para asegurar una eficiente aireación y un buen crecimiento del hongo respectivamente. Por otro lado la composición del medio de cultivo juega un papel muy importante en la síntesis de las enzimas, por esto realizaron ensayos preliminares con respecto a la composición del medio.

En primera instancia se probó la cepa de Aspergillus niger en cultivo sólido en un medio sintético de pectina, sacarosa y sales absorbido sobre bagazo de caña molido.

Diferentes concentraciones de pectina y sacarosa se probaron para observar el efecto sinérgico de ambos substratos. Se corrieron fermentaciones utilizando diferentes relaciones de pectina-sacarosa. La tabla 2, muestra la actividad producida por Aspergillus niger para cada relación. De los resultados obtenidos sobresale la relación 3:6, a la que la actividad enzimática encontrada es mayor en un tiempo de fermentación menor, en relación con el medio líquido lo que redunda en una mayor productividad. La relación 3:12 es también interesante pero tiene la desventaja de que altas concentraciones de sacarosa provocan mayor crecimiento del hongo, lo que promueve una esporulación temprana, que no es recomendable.

El medio de cultivo seleccionado fue el siguiente:

|   |                |                       |
|---|----------------|-----------------------|
| Soporte Sólido .....                                  | Bagazo de caña |                       |
| Fuente de Carbono                                     |                |                       |
| Sacarosa .....  | 6%             |                       |
| Substrato Inductor                                    |                |                       |
| Pectina .....   | 3%             |                       |
| Fuente de Nitrógeno y Fósforo                         |                |                       |
| Urea .....  | 2.4g           |                       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 9.8g           | por 100g de substrato |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                 | 5.0g           | peso seco             |

TABLA No. 2 PRODUCCION DE PECTINASAS EN MEDIO SOLIDO  
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO  
PECTINA/SACAROSA

| RELACION | TIEMPO (h) | ACTIVIDAD (U/ml) | ACTIVIDAD PECT. (U/g) |
|----------|------------|------------------|-----------------------|
| 3/3      | 24         | 120              | 83.59                 |
|          | 40         | 500              | 357.65                |
|          | 64         | 125              | 92.10                 |
| 3/6      | 24         | 250              | 176.10                |
|          | 40         | 500              | 341.80                |
|          | 64         | 1000             | 672.60                |
| 3/12     | 24         | 140              | 89.70                 |
|          | 40         | 333              | 222.00                |
|          | 64         | 666              | 477.00                |

Cepa A. niger CH<sub>4</sub>

| Minerales Traza         | mg/l |
|-------------------------|------|
| FeSO <sub>4</sub> ..... | 1.0  |
| ZnSO <sub>4</sub> ..... | 0.8  |
| MgSO <sub>4</sub> ..... | 4.0  |
| CuSO <sub>4</sub> ..... | 1.0  |

El contenido de humedad del medio sólido es de 70%.

Puesto que el pH es un factor crítico en el desarrollo de la fermentación y en reactores estáticos su control se dificulta, esto debido a que el crecimiento micelial promueve una rápida acidificación del medio. Raimbault (22), propone el uso de sales de amonio y urea, que al ser utilizadas por el microorganismo como fuente de Nitrógeno evitan variaciones fuertes del pH. Por esto el medio de cultivo óptimo incluye sulfato de amonio y urea como fuentes de Nitrógeno.

### 3.3 Pruebas en Cultivo Sólido

Con la finalidad de observar el comportamiento de la fermentación en la producción de las enzimas pécticas, se realizaron cinéticas de producción de estas enzimas.

En la fig. 6, se muestra una cinética de producción de enzimas pécticas, en la cual se puede observar una síntesis parcialmente desacoplada del crecimiento. Esto se confirma al observar el consumo de sacarosa, ya que ésta se agota y se puede suponer que se da lugar al consumo de la pectina, dado que la producción de las enzimas se incrementa notablemente. Esta etapa sucede entre las 30 y 35 horas de fermentación. La fermentación continúa hasta las 45 horas, tiempo en el que se obtiene la máxima actividad.

Con respecto a la humedad del producto, ésta se incrementa aproximadamente de un 3 a 4% durante la fermentación, debido a la respiración del hongo, por lo que se facilita la recuperación de las enzimas.

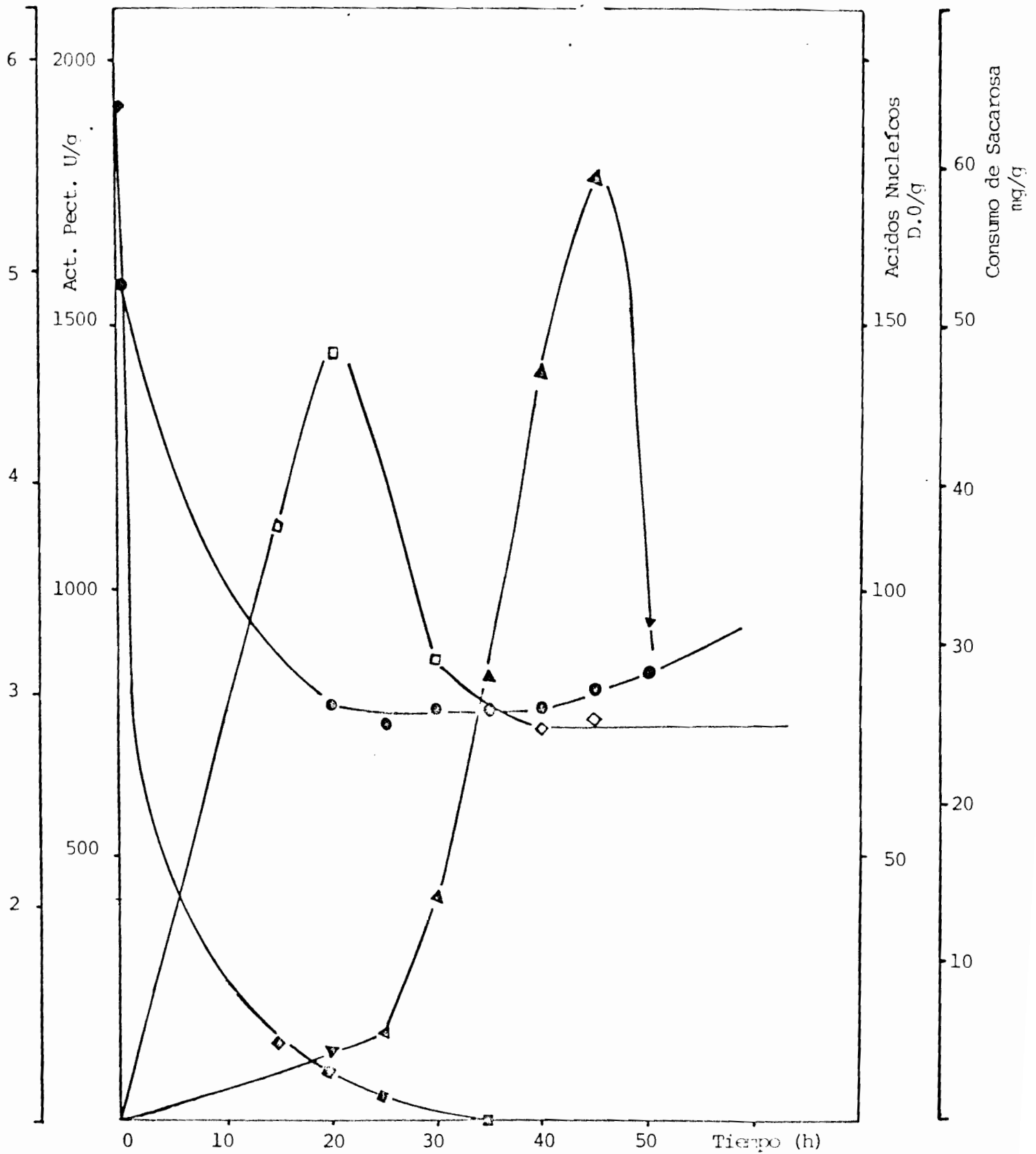


Fig. 6. Cinética de Producción de Pectinasas. Cepa *A. niger*. Actividad Pectinolítica U/g de S. Húmedo, (▲ - ▲); Evolución del pH, (● - ●); Producción Acidos Nucleicos D.O/g S.H., (□ - □); Consumo de Sacarosa mg/g - S.H., (■ - ■).

El pH, importante en la síntesis de las enzimas, baja en las primeras horas de la fermentación, durante la fase exponencial de crecimiento del hongo. Después se estabiliza y casi permanece constante hasta el final de la fermentación.

Considerando que la cepa de Penicillium sp, podría constituir otra opción para el proceso, se realizaron cinéticas de producción de enzimas pécticas obteniéndose los resultados presentados en la fig. 7. La actividad enzimática producida por esta cepa fue menor a la producida por Aspergillus niger a las mismas condiciones de cultivo sólido, observándose además un crecimiento muy lento del hongo. Por estas razones se decidió descartar esta cepa y efectuar el trabajo posterior con Aspergillus niger.

### 3.4 Extracción de Enzimas

La operación de recuperación de enzimas pécticas por prensaje es muy sencilla y consta de dos etapas: una primera etapa donde se prensa el producto sin tratamiento y una segunda donde se le añade agua al residuo insoluble de la primera extracción. La actividad volumétrica lograda en la segunda fracción soluble es mayor que en la primera, se puede pensar que las enzimas están absorbidas a la pared del hongo y que se liberan más fácilmente después de una primera alteración mecánica, Raimbault (2), reporta un fenómeno similar con glucoamilasas.

### 3.5 Termoestabilidad de la enzima (Aspergillus niger)

La disminución de la actividad con el tiempo de incubación es evidente, a los cinco minutos pierde aproximadamente el 65% de su actividad y decrece gradualmente hasta que se inactiva totalmente a un tiempo de incubación de 60 min. La tabla 3, resume estos resultados.

TABLA 3

Termoestabilidad de la enzima a 50°C

| Tiempo (min) | Actividad u/ml |
|--------------|----------------|
| 0            | 142.9          |
| 5            | 50             |
| 10           | 26.5           |
| 15           | 25.63          |
| 30           | 19.4           |
| 45           | 7.8            |
| 60           | -              |

Nota: A temperatura ambiente la actividad permanece constante por un mes.

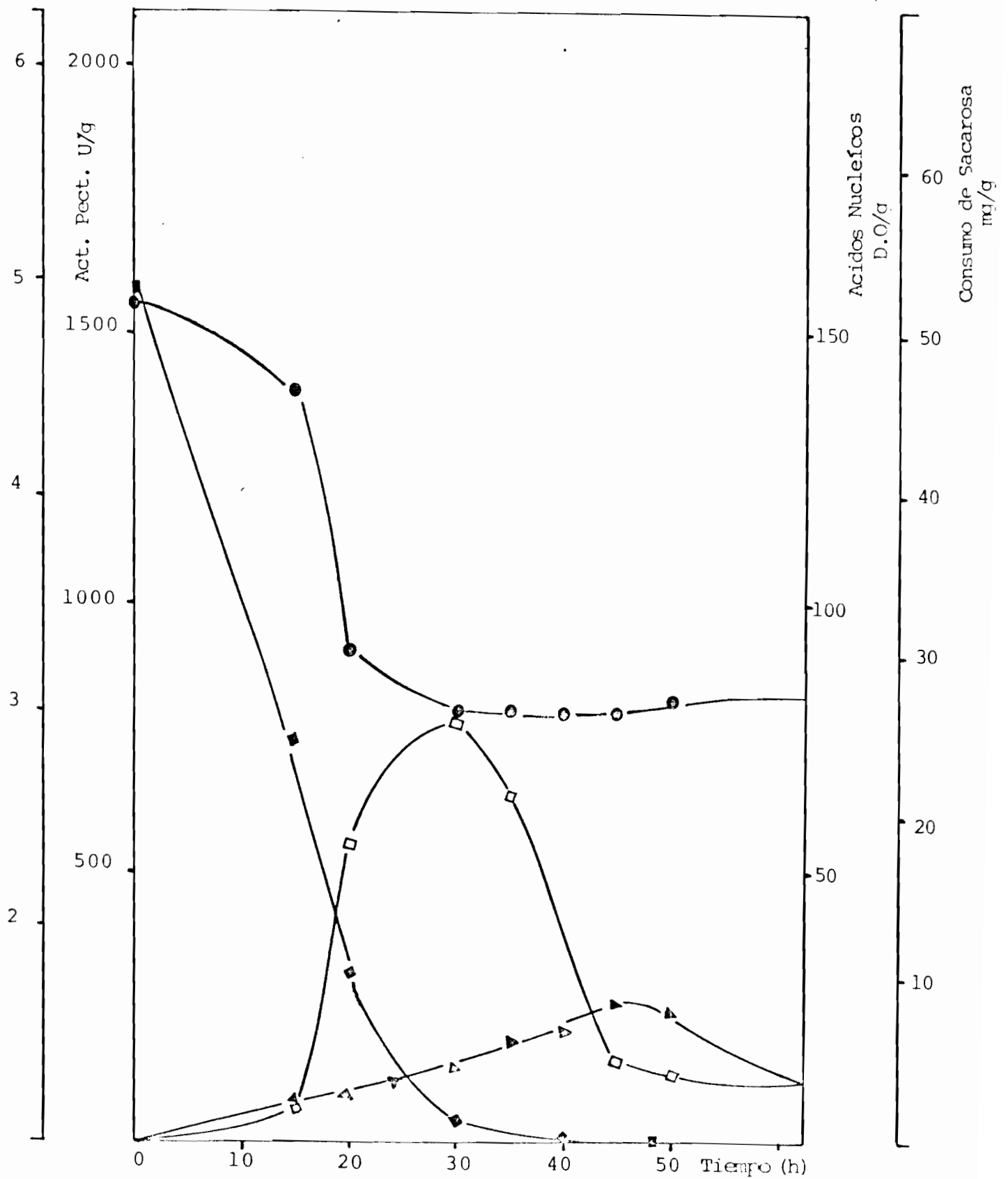


Fig 7 Cinética de Producción de Pectinasas. Cepa *Penicillium* sp. Actividad Pectinolítica U/g de S. Húmedo, ( $\blacktriangle - \blacktriangle$ ); Evolución del pH, ( $\bullet - \bullet$ ); Producción Acidos Nucleicos D.O/g S.H., ( $\square - \square$ ); Consumo de Sacarosa mg/g S.H., ( $\blacksquare - \blacksquare$ ).

Las características de termoestabilidad del extracto enzimático obtenido es semejante a las que se reporta en estudios en la literatura. Sin embargo, esta característica no infiere en su aplicación en algunos procesos en la industria agroalimentaria debido a que las condiciones de temperatura a las cuales se trabaja son menores.

De los resultados encontrados en relación a la productividad del cultivo líquido y cultivo sólido se tiene que la actividad volumétrica para el primero fue de 0.92 u/unidad de volumen/h. Se determinó considerando la actividad máxima producida por Aspergillus niger y el tiempo en que se alcanza ésta. Para el cultivo sólido la actividad volumétrica encontrada fue de 7.95 u/unidad de volumen/h, y se determinó considerando el volumen útil del reactor, la masa en gramos empacada y las unidades por g., obtenidas de la operación de recuperación.

La actividad pectinolítica producida por unidad de volumen de reactor resulta ser de mayor magnitud en cultivo sólido que en cultivo líquido lo que nos permite considerar como factible el escalar este proceso a un nivel semipiloto en reactor estático.

De esta prueba a nivel semipiloto en el Zymotis, se observan los siguientes resultados. El incremento de humedad después de 48 horas de fermentación es solamente del 1% (70.75-71.5) contra 3-4% en la columna utilizada a nivel laboratorio. Esto se debe a dos razones principales; una la dificultad de saturar de agua el aire con flujos muy elevados y la segunda la falta de homogeneidad del producto en los compartimientos, el cual tiende a humidificarse abajo y secarse arriba. Esto también puede ser resultado del incremento de temperatura provocado por el calor metabólico producido y no disipado rápidamente, lo que ocasiona un secado del producto.

En relación al proceso de recuperación de enzimas por prensado se presentaron diversos problemas principalmente ligados al tipo de prensa utilizado, fig. 6, ya que la prensa disponible resultó ser de menor potencia que la prensa usada a nivel laboratorio.

El volumen de la prensa fracción soluble fue de 3 litros con actividad de 100 u/ml y la segunda fracción fue de 4 litros con actividad de 30 u/ml.

La mayor recuperación de las enzimas se tuvo en la primera extracción a diferencia de lo que se observa a nivel laboratorio, donde la mayor actividad se encuentra en la segunda fracción soluble. No existe una explicación clara que justifique estos resultados aunque seguramente el efecto de la presión de prensado debe ser analizada con mayor detalle por ser esta la única diferencia entre los experimentos efectuados.

El volumen obtenido de la ultrafiltración es de 1400 ml de solución concentrada de enzimas con una actividad de 142.9 u/ml.

Se determinó la actividad en este permeado, pero no se detectó. Las características del proceso se resumen en la tabla 4 .

TABLA 4  
Resultados de la ultrafiltración del extracto  
enzimático obtenidos de la fermentación sólida (AP=21.3 psi)

| Ultrafiltración          | Volumen (ml) | Actividad (u/ml) | Actividad Total (u. totales) | Eficiencia (%) |
|--------------------------|--------------|------------------|------------------------------|----------------|
| Extracto de fermentación | 6 000        | 57.9             | 347, 400                     | -              |
| Volumen Retenido         | 1 400        | 142.9            | 200, 000                     | 57.6           |

En la tabla 4, puede observarse que las pérdidas de actividad durante el proceso fueron considerables, esto puede ser consecuencia de un incremento de temperatura, por cavitación dada los flujos muy importante durante el proceso

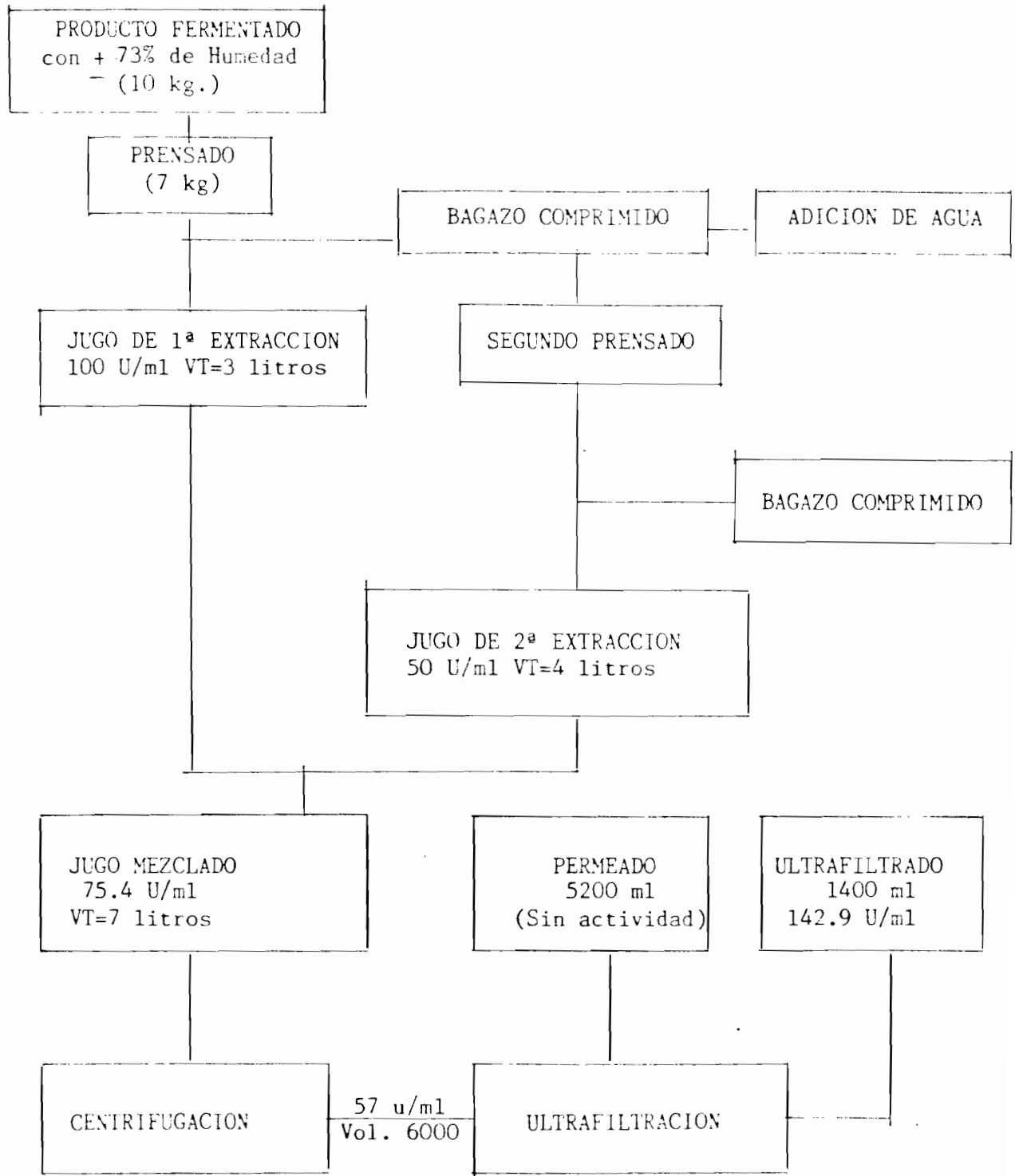


o bien al probarle atrapamiento de enzima dentro de las fibras. En realidad se seleccionó el tamaño de fibra más pequeña (PM corte 10 000), pero sería conveniente analizar el comportamiento del sistema con otro tipo de fibras (eg. PM= 50 000). En la fig. 7 se muestra el diagrama de recuperación de las enzimas pécticas.

Los resultados de las pruebas realizadas sobre la despectinización del jugo de manzana por vía enzimática se muestran en las tablas 5 y 6. La observación visual de la reacción enzimática se expresó con signos para determinar las diferencias de actividad despectinizante de ambas preparaciones. Resulta evidente que la enzima de Aspergillus niger presenta alta actividad despectinizante, la cual es comparable con la que presenta la enzima comercial. Las diferencias visuales de este experimento se muestran en la fig. 8.

En relación a la extracción de aceite de coco se encontró que la eficiencia obtenida de aceite de coco en la extracción con la enzima de Aspergillus niger y la enzima comercial fue de 73 y 75% respectivamente. La eficiencia reportada por Cintra et.al (8), es de 80%. Las principales pérdidas se tuvieron en la recuperación del matraz de reacción y después en los tubos de centrífuga. El producto obtenido es un sólido blanco y a temperatura ambiente y un líquido incoloro a 50°C, fig. 9.

DIAGRAMA DEL PROCESO DE RECUPERACION  
DE LAS PECTINASAS PRODUCIDAS POR FERMENTACION SOLIDA



NOTA: En el volumen de permeado se incluye agua de lavado, que no fue posible eliminar.

Fig. 7

TABIA No. 5 ACTIVIDAD PECTINOLITICA RELATIVA  
 POR DESPECTINIZACION DEL JUGO DE  
 MANZANA

| SISTEMA DE REACCION              | OBSERVACION VISUAL **  |
|----------------------------------|------------------------|
| ENZIMA COMERCIAL<br>(30 ppm)     | + + + + +<br>+ + + + + |
| ENZIMA CONCENTRADA *<br>(0.4 ml) | + + + + +<br>+ + + + + |
| TESTIGO                          | —                      |

\* Enzima concentrada producida por fermentación sólida

\*\* Los signos anteriores indican

+ + + + + Completa despectinización

+ + + + Buena despectinización

+ + + Regular despectinización

+ + Baja despectinización

+ Ligera despectinización

— Ausencia de actividad despectinizante

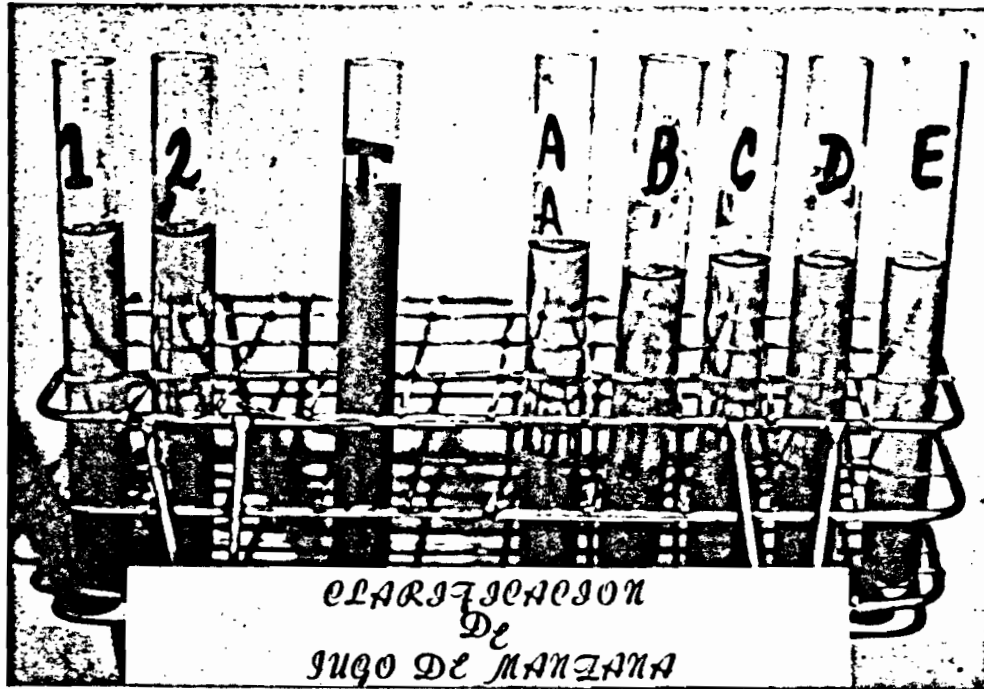


Fig. 8. Observación visual de la despectinización enzimática del jugo de manzana.

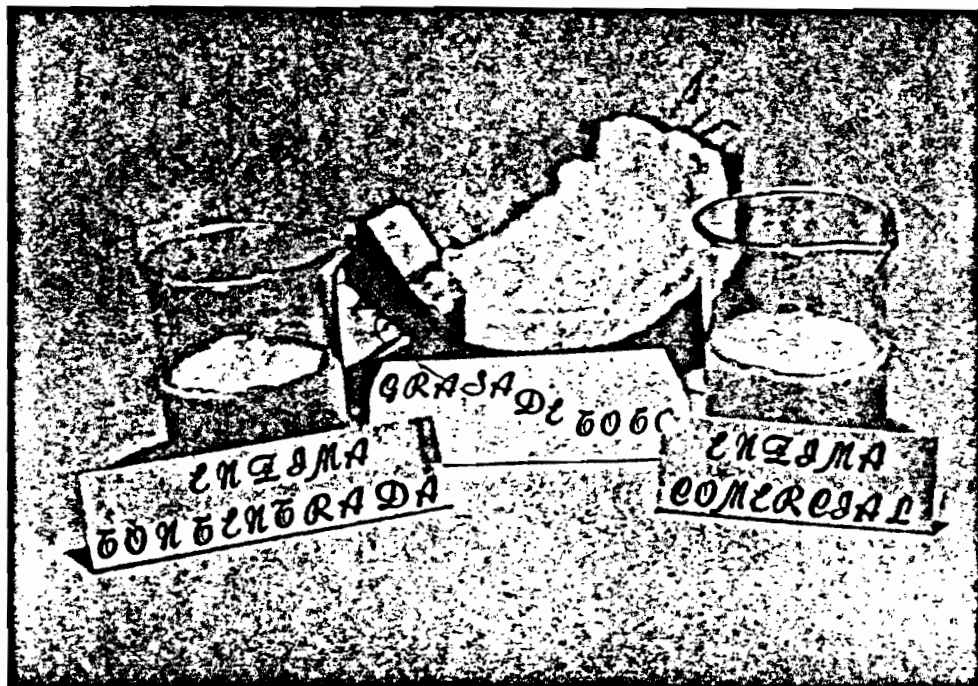


Fig. 9. Extracción de aceite de coco.

TABLA No. 6 ACTIVIDAD PECTINOLITICA RELATIVA A  
 DIFERENTES VOLUMENES DE ENZIMA CON  
 CENTRADA

| SISTEMA No. | VOL. ENZIMA CONC. (ml) | OBSERVACION VISUAL |
|-------------|------------------------|--------------------|
| A           | 0.4                    | + + + + +          |
| B           | 0.3                    | + + + +            |
| C           | 0.2                    | + + +              |
| D           | 0.1                    | + +                |
| E           | 1.0 *                  | + + +              |
| TESTIGO     | Blanco                 | —                  |

\* Enzima sin concentrar

Nota: Volumen de Reacción 20 ml

## CONCLUSIONES

La cepa de Aspergillus niger fue seleccionada por su alta actividad pectinolítica, además de presentar características adecuadas para su desarrollo en cultivo sólido. Aspergillus niger es un hongo filamentoso, capaz de crecer con un bajo contenido de humedad y sintetizar enzimas pécticas y extracelularmente, las cuales son inducidas mediante adición al medio de cultivo del substrato inductor: la pectina, además es ya una cepa aprobada por la FDA.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de Aspergillus niger en cultivo sólido resultaron ser de: pH 4.5, temperatura 35°C, humedad inicial de 70% y una concentración de inóculo de  $2 \times 10^7$  esporas/g de substrato peso seco.

El medio óptimo encontrado contiene concentraciones de pectina y sacarosa de 3% y 6% respectivamente, lo que resulta superior a lo reportado para un medio en cultivo líquido. La pectina induce notablemente la síntesis de enzimas pécticas. Las sales de amonio y urea adicionadas tienen una función amortiguadora durante la fermentación, evitando variaciones fuertes del pH.

La producción de las enzimas pécticas durante la fermentación alcanza un máximo de actividad a las 45 horas, reduciendo dos veces el tiempo de fermentación de alta producción reportada para el cultivo líquido. La síntesis de las enzimas pécticas de Aspergillus niger es parcialmente desacoplada del crecimiento.

El empleo de un soporte inerte (bagazo de caña) para la absorción del medio de cultivo resultó altamente satisfactorio al facilitar el proceso en sus diversas etapas: alta capacidad de absorción, desarrollo adecuado del microorganismo y fácil recuperación del producto mediante prensado del material al final del proceso.

La productividad encontrada en el cultivo sólido es superior a la determinada en cultivo líquido para el mismo microorganismo. Esta diferencia puede ser probablemente menor si se trabaja el proceso líquido en condiciones más

estrictas (control del pH, aereación, etc.). Sin embargo la productividad seguirá siendo alta en el cultivo sólido, dado que el tiempo en el que se alcanza la máxima actividad es menor.

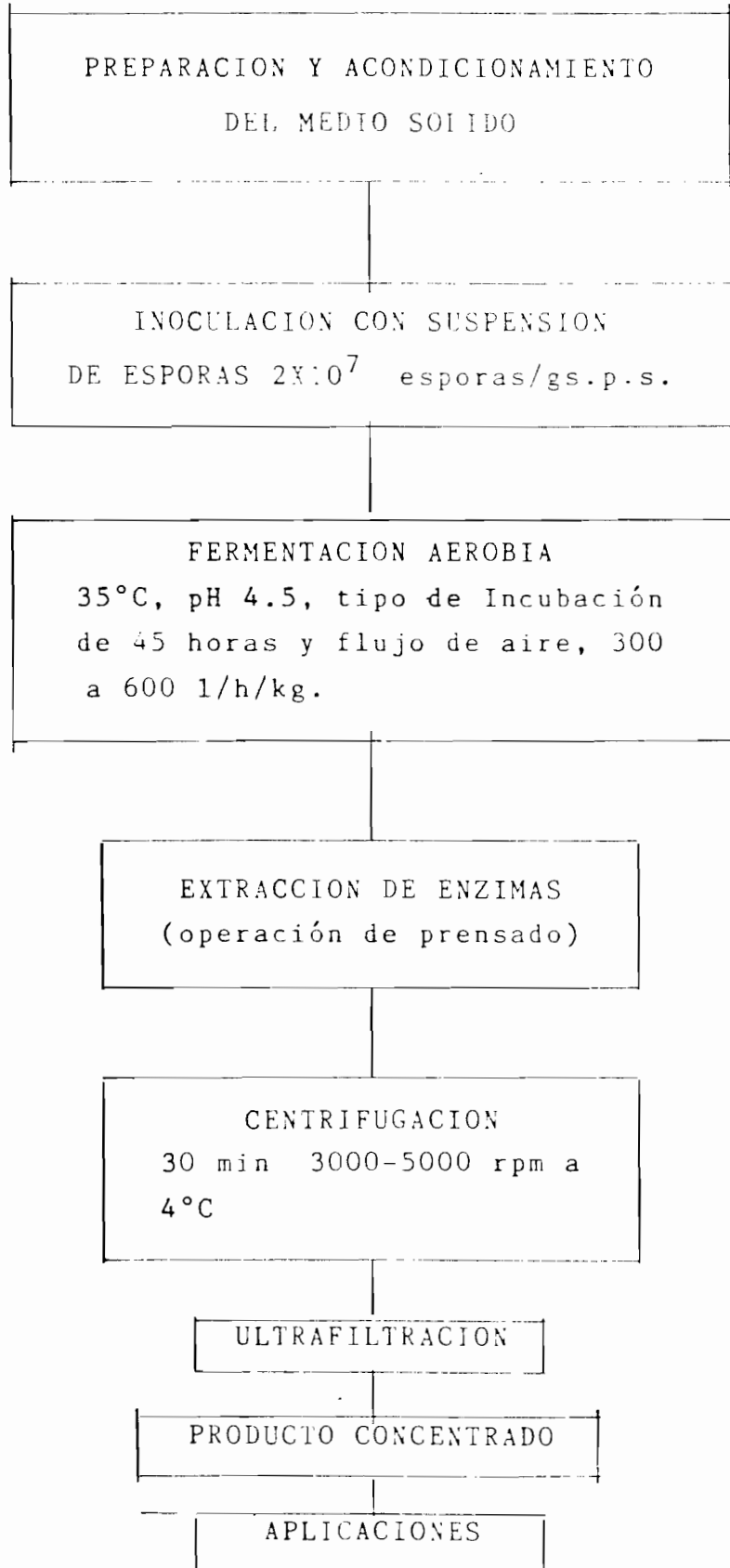
El sistema de extracción de enzimas por prensado resulta ser una operación eficiente de recuperación de enzimas producidas mediante esta técnica, en general es una alternativa más en el procesamiento de metabolitos producidos vía fermentación en cultivo sólido. La eficiencia de recuperación de las enzimas por este método depende en gran parte de la potencia de la prensa utilizada y es conveniente analizar su potencial para enzimas intracelulares.

El escalar este proceso a nivel piloto requiere de estudiar los parámetros más críticos como la pérdida de humedad, la evolución del pH, la aereación y el incremento de la temperatura, así como el de mejorar el sistema de extracción establecido, de tal forma que se optimice este proceso para la producción a gran escala no sólo de enzimas sino también de diversos metabolitos de interés industrial.

En general, este trabajo demuestra que es posible producir enzimas pécticas en cultivo sólido y paralelamente promover el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos que en su mayoría son subproductos agroindustriales.

Por otro lado la aplicación de las enzimas pécticas en la industria alimentaria es cada vez más importante por lo que es conveniente considerar la disponibilidad de la pectina para implementar su producción. La idea es emplear en el proceso residuos agroindustriales, que aporten la pectina, disminuyendo el costo del medio de producción, lo que resultaría interesante y económicamente redituable. La enzima producida en el experimento piloto fue empleada con éxito en diversas aplicaciones de pectinasas en la tecnología de alimentos, habiendo clarificado jugo de manzana y extraído aceite de coco, con eficiencias iguales a las obtenidas con los productos comerciales disponibles en México, todas ellas de importación.

DIAGRAMA DEL PROCESO





BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aidoo K. E., Hendry, R., Wood B. J. B. "Solid Substrate Fermentations" *Advances in Applied Microbiology*. 28, 201-237 (1982).
- 2.- Alazard D., Raimbault M. "Comparative Study of Amilolytic Enzymes Production by Aspergillus niger in Liquid and Solid-State Cultivation". *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 113-117 (1981).
- 3.- Anaya M.C., López Arjona J. L. "Continuous Clarification of pectin solutions in a basket reactor with immobilized commercial Pectinases. Symposium Internacional Versailles Ed. D. Dupuy Technique et Documentation Lavoisier 503-511 (1982).
- 4.- Baumann J. W. "Application of Enzymes in fruits and Food Tecnology Enzymes and Food Processing." Ed. Biuch G. G., N. Blakebrough, Parker K. J. Applied Science Published L; A. London. Cap. 7, 129-147 (1980).
- 5.- Braddock R. J., Kesterson J. W., "Use of Enzymes in Citrus Processing." *Food Technol.* 33(11), 78-83, (1979).
- 6.- Cannel E., Moo-Young M. "Solid State Fermentation Systems". *Process. Biochemistry*. 15(5), 2-7, (1980).
- 7.- Carrizales V. "Producción de Enzimas Extracelulares en Cultivos Semisólidos." *Biotecnología de Enzimas*. Ed. Carlos Huitrón, UNAM. 71-85, (1982).
- 8.- Cintra Mc Glone ., López-Munguía Canales A., Carter J. V. "Coconut Oil Extraction by a new Enzymatic Process." *J. Food Science* 51(3), 695-697, (1986).
- 9.- Fogarty W. M., Ward O. P. "Pectinases and Pectic Polysacharides." *Prog. Ind. Microbiol.* 13, 59-119 (1974).

- 10.- Gutiérrez L. G., Gutiérrez L. E., Jiménez A. A. "I. Enzimas pécticas II. Influencia de la Polygalacturonasa en las propiedades reológicas de la pulpa de papaya." Technol. Aliment. (México) 18(1), 5-9 (1983).
- 11.- Hesseltine C. W. "Solid State Fermentations". Biotechnol. Bioeng. 14, 517-532, (1972).
- 12.- Kilara A. "Enzymes and their Uses in the Processed Apple Industry." A review. Process Biochemistry July/August 35-41, (1982).
- 13.- Lambert P. W. "Industrial Enzyme production and recovery from filamentous fungi. The Filamentous Fungi. Smith J., Beni D. E. Eds. Vol. IV Chap. 9, 210-237. Edward Arnold Publishers, London. (1983).
- 14.- Luhs B. S. Leonard S. J., Phaff H. J. "Hydrolysis of pectin materials and oligouronides by tomato polygalacturonase." Food Res. 21, 448 (1956).
- 15.- Mc. Cready R. M., Seegmiller C. G. "Action of pectic enzymes on oligogalacturonic acids and some of their derivatives." Arch. Biochem. 13, 217 (1947).
- 16.- Miller G. L. "Utilitation the Acid 3, 5 DNS reagent for determination of reducing sugar." Analitical Chem. 31, 426-428 (1959).
- 17.- Moo-Young, M.; Moreira A. R., Tengerdy R. P. "Principles of solid substrate fermentation." The filamentous fungi, fungal technology. Smith D. E. Ed. 4, 119-128. (1983). Edward Arnold Publishers; London.
- 18.- Mukherjee S. K. "Effects of minerals on the production of pectinases by Aspergillus niger." Zentralbl, Bakteriol. Parasitenkd., Infektionks. Hyg. Abte. 2 (1974), 129 (5), 410-414. Citado Chemical Abstracts. No. 82699q (1975).

- 19.- Mukherjee, S. K., Majumdar, S. K. "Fermentative production of Pectinases by fungi screening of organisms and production of the enzymes by Aspergillus niger. Hakkō Kagaku Zasshi 49(9), 759-770, (1971). Citado Chemical Abstracts No. 150299s (1972).
- 20.- Ogur M., Rosen G. "Nucleic acids of plant tissues (I) extraction of deoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid." Arch. Biochem. 25, 262-276 (1950).
- 21.- Oriol E. "Introducción de partículas inertes en la fermentación sólida de la yuca." en revisión. (Comunicación personal).
- 22.- Raimbault M., Alazard D. "Culture method to study fungal in solid." European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 199-209 (1980).
- 23.- Roussos S. "Croissance de Trichoderma Harzianum par Fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases." These, Université de Provence, France, 1985. 162 págs.
- 24.- Sánchez-Vázquez J. E., Guiraud, J. P., Gelzy P. "Selección de levaduras utilizables en fermentación de cacao vía trifásica. XVII, Congreso Nacional de Microb. Puebla, Pue., 156, pág. 26 (1986). Asociación Mexicana de Microbiología.
- 25.- Saval S., Solorzano R., Alpizar I., Cea A., Huitrón C. "Producción de pectinasas microbianas a partir de pulpa de henequén." Biotecnología de Enzimas, C. Huitrón UNAM, 204-215.
- 26.- Schmitter S. "Enzyme action and plant food texture." Source Book of Food Enzymology 511-531, AVI Publishing Company, Inc. (1981).
- 27.- Schmitter S. "Roles of enzyme action in wine and fruit and vegetable juice manufacture and appearance." Source Book of Food Enzymology, 535-551, AVI Publishing Company, Inc. (1981).

- 28.- Tuttobello R., Mill P. J. "The pectic enzymes of Aspergillus niger. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes." *Biochem. j.* 79, 51-57 (1961).
- 29.- Vasu S. "Pectolytic enzymes from Aspergillus niger I. Production Polygalacturonasas in synthetics culture media." *Studie Cercetari Biochem.* 6, 71-86 (1963).
- 30.- Whitaker, J. R. "Pectic substances, Pectic enzymes and haze formation in fruit juices." *Enzyme Microb. Technol.* 6 (August), 341-349 (1984).
- 31.- Yamasaki M., Kato A., Shang-Young Ch. Arima K. "I. Pectic in the clarification." *Agr. Biol. Chem.* 31 (5), 552-560 (1967).

INTRODUCTION  
SUR LA CULTURE DU CAFE  
EN AMERIQUE LATINE  
ET AU MEXIQUE

# El cultivo del café

El café exige un clima caliente y húmedo, sin temperaturas extremas: entre 17° y 23° grados centígrados. Es, pues, un cultivo típicamente tropical. Su área de cultivo se sitúa entre los paralelos 30 norte y sur.

Las épocas de florescencia y de cosecha son muy variables según las regiones y su latitud. En el Brasil, por ejemplo, la florescencia se produce de mayo a septiembre, y el grueso de la cosecha se escalona de abril a junio del año siguiente.



El suelo donde crece el café debe ser profundo, permeable, neutro o débilmente ácido, particularmente rico en materia orgánica, azoe, ácido fosfórico y potasio. Las mejores tierras son la de las selvas y bosques recientemente limpiados.

Los métodos de plantío son muy diversos. Cada vez más se utiliza el método de plantar las semillas en almáciga, lo cual permite la utilización de granos seleccionados. Se obtienen así plantas jóvenes de 20 a 30 cm. de altura, que deben ser posteriormente replantadas en su lugar definitivo. Según las especies y las condiciones locales, la distancia entre planta y planta varía de 2 a 5 m. El café debe a veces estar protegido del viento y del sol. Es entonces plantado al abrigo de árboles; éstos últimos pueden ser, ya árboles del bosque original, ya especies de crecimiento rápido plantadas antes o al mismo tiempo que los jóvenes cafetos.

En ciertos países, se intercalan cultivos anuales entre las filas de cafetos, y esto durante los dos o tres primeros años, es decir, hasta que los cafetos empiecen a producir y cubran todo el terreno.

El cuidado de una plantación exige una atención minuciosa y constante:

- Eliminación continua de malas hierbas. En algunas regiones, se siembra entre los cafetos plantas rampantes que ahogan la vegetación dañina.
- Poda. Supresión de las ramas superfluas, limpieza que se realiza para impedir que el café crezca en altura.
- Abono del suelo, que debe ser adaptado a su fertilidad y al nivel de las cosechas.
- En algunas regiones, se recurre a la irrigación, sobre todo para paliar una falta de agua en el momento de la florescencia y hasta el comienzo de la temporada de lluvias.
- Lucha contra los insectos y enfermedades (mencionados más adelante en este mismo capítulo).

La cosecha se efectúa de ocho a diez meses después de la florescencia. En el Brasil y en la mayor parte de los países productores, una sola cosecha es posible, la cual se extiende de dos a cuatro meses. En la zona ecuatorial (Robusta) la cosecha se efectúa prácticamente durante todo el año.

La recogida se hace según dos métodos:

- Cosecha selectiva: el recolector dispone de dos recipientes; uno de ellos recibe las "cerezas" maduras y sanas, el otro los frutos que deben ser eliminados. Este método se impone cuando los granos son tratados por vía húmeda (ver capítulo 5). El suplemento de energía que este método requiere es ampliamente compensado por una calidad superior del café que se obtiene.
- La cosecha se hace de una sola pasada: todos los frutos, maduros, verdes o secos, son cogidos y llevados conjuntamente (o después de una selección muy somera) hacia el tratamiento. En el caso (extremo) del Brasil, los frutos son arrancados haciendo correr la mano a lo largo de cada rama, recogidos directamente del suelo o sobre grandes lonas, y luego tamizados.

N.B. — El cosechado mecánico ha sido experimentado en diversos países, en particular en Puerto Rico y en las Islas Hawai: un aparato agita los arbustos y hace caer las cerezas en una especie de paraguas puesto al revés, o sobre un toldo.

El rendimiento es muy variable. Muchas plantaciones no sobrepasan de 250 a 500 kg./ha.; normalmente, los cafetales bien cuidados producen de 500 a 1000 kg./ha., mientras que en las estaciones de ensayo no es excepcional obtener de 2 a 3 toneladas/ha.

## Los enemigos del café

### Los insectos

- Los principales insectos que dañan al café son:
- los nematodos o anguilulos que atacan a las raíces;
  - los estefanodores o escólitos del grano (llamado broca en el Brasil) que devoran las cerezas;
  - los insectos horadores que fabrican galerías en el tronco y en las ramas;
  - las orugas, saltamontes, hormigas y pulgones que atacan tanto a las hojas como a los frutos.

### Los hongos

Una enfermedad criptogámica amenaza en particular al café: la "hemileia vastatrix", llamada también "roya" del café, que se manifiesta por la aparición de manchas como de óxido sobre las hojas. Esta enfermedad no ataca prácticamente más que al Arábica; de donde la extensión tomada, desde principios del Siglo XX, tanto en Asia como en África, por las otras especies resistentes a la "roya".

Habiendo ignorado la "roya" hasta estos últimos años, el hemisferio occidental produce aún casi exclusivamente Arábica; pero la reciente aparición de esta enfermedad en el Brasil podría cambiar esta situación a más o menos largo plazo.

### La intemperie

El café es un árbol relativamente frágil: tanto las heladas como los tornados le son fatales, de igual manera soporta muy mal las temperaturas extremas, en particular las heladas, así como los excesos de sequía o de lluvia.

# El café en el mundo

## La producción

Evocando la historia del café, hemos visto como su cultivo, limitado durante mucho tiempo a las colinas de Etiopía o de Arabia, se había propagado, a partir de las primicias de 1700 a todas las tierras tropicales de los dos mundos.

Desde el principio del siglo XIX, el aumento de la producción ha sido constante: de 99.000 toneladas en 1825 pasó a unos 3.000.000 de toneladas (promedio anual entre 1960 y 1969). Hoy en día, el café es uno de los productos agrícolas de exportación más importantes del mundo. Se estima que su cultivo y comercio ocupan más de 20 millones de personas en el mundo entero. Sobre el plan de su valor comercial, el café se sitúa en el segundo lugar de los productos del comercio mundial, siguiendo de cerca al petróleo (antes de 1974!).

El Brasil, donde el café representa 40% de las exportaciones totales, viene a la cabeza de los países productores: 25% de la producción mundial, con una superficie de cultivo de más de 2.000.000 de hectáreas repartidas entre diversos Estados (Sao Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahía, Pernambuco, etc.).

## La comercialización

La comercialización del café obedece a reglas extremadamente complejas y variables. El equilibrio mundial entre la oferta y la demanda es muy difícil de establecer, especialmente porque en cada país la importancia de las cosechas varía muy sensiblemente de un año al otro: es suficiente, por ejemplo, un período de heladas en el Brasil para reducir la producción en este país y modificar el juego en los distintos países, tanto productores como importadores.

El comercio internacional se efectúa generalmente por medio de importadores especializados. El café se suele vender FOB ("free on board" — es decir entregado al comprador a bordo en el puerto de embarque) o CIF ("cost, insurance, freight" — en otras palabras sobre el muelle de descarga).

Las dos bolsas más importantes del café están en Nueva York (café de América del Sur y América Central) y en Londres (café africanos). Otros centros de comercio importantes son: Amberes, Amsterdam, Roterdam, El Havre, Hamburgo, Trieste, Hong-Kong, Vitoria y Santos (Brasil), Medellín y Buenaventura (Colombia).



Producción exportable de café en el mundo

Promedio de las campañas  
de 1965 a 1974  
en miles de toneladas métricas

| Africa          |     |
|-----------------|-----|
| Costa de Marfil | 235 |
| Angola          | 193 |
| Uganda          | 173 |
| Etiopía         | 83  |
| Camerún         | 69  |
| Zair            | 63  |
| Madagascar      | 57  |
| Kenia           | 55  |
| Tanzania        | 50  |
| Diversos        | 86  |
| Total 1 064     |     |

| America     |     |
|-------------|-----|
| Brasil      | 763 |
| Colombia    | 408 |
| El Salvador | 121 |
| Guatemala   | 101 |
| Méjico      | 98  |
| Costa Rica  | 69  |
| Ecuador     | 48  |
| Perú        | 43  |
| Nicaragua   | 30  |
| Diversos    | 104 |
| Total 1 785 |     |

| Asia-Oceania |    |
|--------------|----|
| Indonesia    | 94 |
| India        | 37 |
| Diversos     | 29 |
| Total 160    |    |

Total de la producción exportable mundial 3 009

## La producción de café soluble

Si la producción de café soluble respondía al principio a una necesidad económica — prolongar la conservación del café para reabsorber la superproducción — actualmente, el café soluble es consumido por sus propios méritos: como ya lo hemos visto, un éxito siempre en aumento en la mayor parte de países consumidores de café. Estos países efectúan ellos mismos, según sus propias necesidades, la transformación del café en grano en café soluble: producción y consumo son, pues, prácticamente iguales. Están, sin embargo, lejos de ser proporcionales al consumo total de café, como lo demuestra los gráficos de la derecha.

Es de notar que el café soluble ha contribuido al desarrollo del consumo del café en ciertos países tradicionalmente bebedores de té, como la Gran Bretaña y el Japón.

Estas cifras muestran igualmente que el café soluble tiene ante sí un porvenir lleno de promesas, con vastos mercados para conquistar: Italia, por ejemplo, y los Países Escandinavos donde su uso está todavía poco extendido. Su calidad, aliada a su facilidad de preparación, serán los mejores argumentos para vencer los últimos prejuicios ligados a las tradiciones y convencer a nuevas generaciones de consumidores.

## Consumo

Promedio 1967-1974 (café verde)

Kg por habitante

|                    |      |
|--------------------|------|
| Suecia             | 13,1 |
| Dinamarca          | 11,8 |
| Noruega            | 9,4  |
| Holanda            | 8,9  |
| Suiza              | 8,8  |
| Finlandia          | 7,9  |
| Bélgica/Luxemburgo | 6,9  |
| EE.UU.             | 6,3  |
| Alemania del Oeste | 5,3  |
| Francia            | 4,8  |
| Italia             | 3,1  |
| Austria            | 3,0  |
| Canadá             | 2,6  |
| España             | 2,0  |
| Portugal           | 1,9  |
| Gran Bretaña       | 1,8  |
| Yugoslavia         | 1,7  |
| Grecia             | 1,1  |
| Japón              | 0,7  |

## Consumo de café soluble en relación al café

Consumo de café soluble en % del consumo total

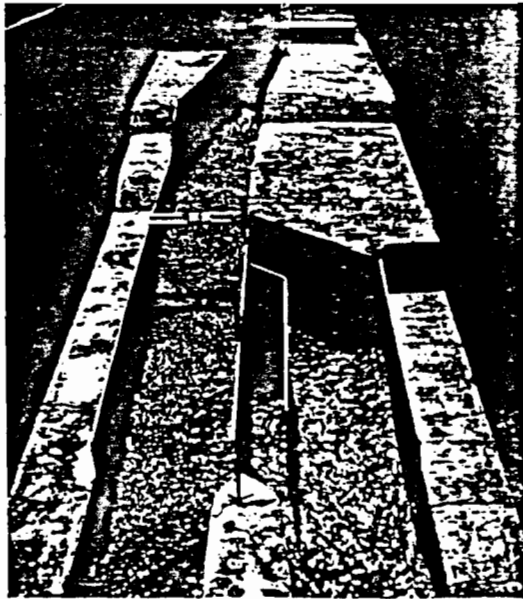
|                     |    |
|---------------------|----|
| Gran Bretaña        | 90 |
| Japón               | 75 |
| Suiza               | 50 |
| EE.UU.              | 40 |
| España              | 35 |
| Francia             | 30 |
| Méjico              | 20 |
| Alemania del Oeste  | 17 |
| Bélgica/Luxemburgo  | 15 |
| Países Escandinavos | 4  |
| Brasil              | 3  |
| Italia              | 2  |

# De la plantación a la fábrica

El tratamiento de los granos de café

## Despulpado y desparchado

Se trata en primer lugar de liberar el grano de café de las películas que lo cubren: la piel y la pulpa (exocarpio y mesocarpio), el "parche" o endocarpio. Se utilizan dos métodos: por vía seca y por vía húmeda.



Vía seca (Brasil, África Occidental)

Inmediatamente después de la cosecha, las "cerezas" son lavadas, y luego extendidas sobre las áreas de secado — llamadas "terreiros" en el Brasil — algunas de las cuales abarcan decenas de hectáreas. Se dejan al sol de dos a tres semanas, removiéndolas constantemente. En máquinas secadoras, la operación no necesita más de tres o cuatro días. Una vez secados los frutos, éstos son triturados en molinos especiales que hacen estallar a la vez la pulpa y el parche.

Vía húmeda (América Central, Colombia, Méjico, Kenia)

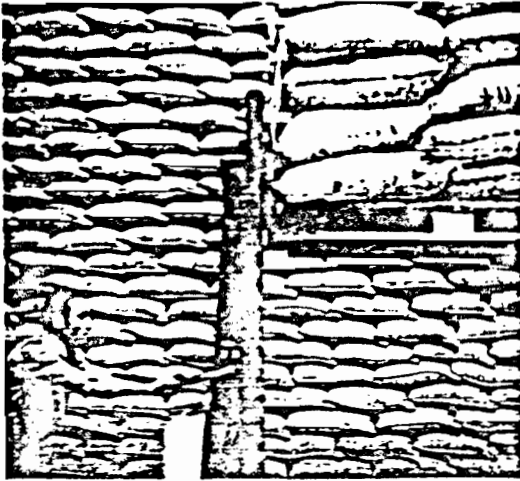
Las cerezas maduras son vertidas, después de seleccionadas, en una corriente de agua, que mientras las limpia, las lleva hacia las despulpadoras: éstas son máquinas que disponen de un dispositivo compuesto de discos o de cilindros rugosos, cuyas asperezas destrazan la pulpa. Queda entonces alrededor de los granos, un mucílago viscoso, que se elimina por una fermentación y un último lavado<sup>1</sup>. Se sigue entonces el proceso del método precedente: secado, natural o artificial, y desparchado en aparatos que actúan generalmente por fricción.

La vía seca — a menudo la única posible — es más simple, más económica que la vía húmeda; pero ésta última da cafés más finos y de mejor apariencia — (los Arábigos "lavados" se cotizan a mejor precio que los Arábigos ordinarios).

## Triado y calibrado

El triado manual, mediante tamiz, o mecánico, con aparatos que producen corrientes de aire, tiene por objeto eliminar todas las impurezas: pequeñas partes

<sup>1</sup> Desde hace algún tiempo existe un modelo de despulpadora que limpia en una sola operación las cerezas de la piel y del mucílago, resultando así superflua la fermentación ulterior. Esta máquina necesita sin embargo una fuerza motriz elevada, lo cual restringe el empleo en numerosos países.



de pulpa y de parche, piedras y otros cuerpos extraños. El calibrado de los granos permite constituir lotes homogéneos.

Ciertos cafés de calidad superior son además "cepillados", es decir pulidos para que el grano obtenga un aspecto brillante. Esta práctica tiende a ser utilizada cada vez menos.

Así preparado, el café es embalado, según el país de origen, en sacos de 45 a 90 kg. Para efectos estadísticos se calcula en sacos de 60 kg.

#### El nacimiento del aroma



#### Mezclas

Ciertos tipos de café son reputados por su fuerza, su "cuerpo", otros por la delicadeza de su aroma. La función del especialista-terrefactor es, por consecuencia, obtener las mejores mezclas, asociando lo mejor posible cafés de distintos orígenes, según los gustos de los consumidores del país que concierne. Es todo un arte, que exige un gusto muy seguro y largos años de experiencia.

#### Torrefacción

El café que proviene de las plantaciones es de un color gris-verde pálido, de ahí su nombre de café verde. Para que adquiera su bello color marrón oscuro, su aroma y su sabor, el café debe tratarse con una operación esencial: la torrefacción. Esta será más o menos fuerte según los países.

Los aparatos de torrefacción clásicos son "bolas" o cilindros que dan vueltas sobre una fuente de calor. Las empresas modernas utilizan instalaciones en las que la duración y el grado de torrefacción se regulan electrónicamente.

A 100°C los granos toman un color amarillo pálido. Hacia los 150°C empiezan a oscurecerse y a hincharse, mientras que exhalan ya un buen aroma de café.

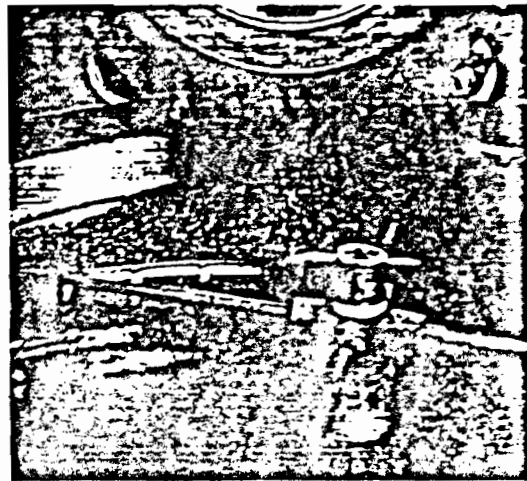
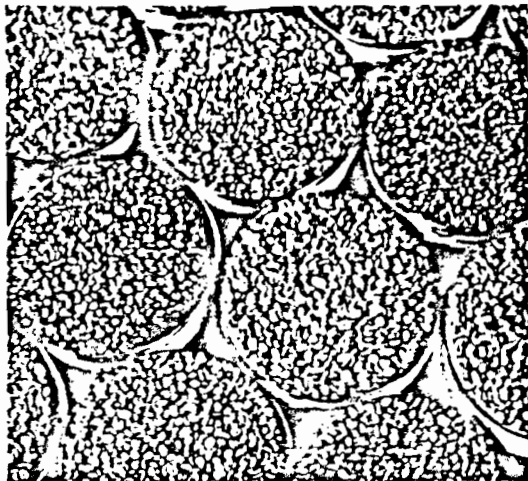
El grado de torrefacción se obtiene entre



## De la plantación a la fábrica

*Ciertos cafés cosechados son reputados por su fuerza, su cuerpo; otros por la delicadeza de su aroma.*

*En el curso de la torrefacción, cuando el café ha adquirido su bello color tostado, su aroma y su sabor, se lo hace enfriar lo más rápidamente posible.*



200°C y 250°C: los granos, ahora de marrón oscuro, han doblado casi de volumen y exhalan un intenso aroma. Los granos de café tostados son colocados entonces sobre un gran tamiz para enfriarlos lo más rápidamente posible.

### El café descafeinado

Todos los cafés, ya lo hemos visto, contienen cierta proporción de cafeína (de 0,80% a 2,5% según las variedades), que se puede eliminar para las personas que soportan mal sus efectos. La descafeinización fue estudiada por primera vez en 1906, pero esta operación no fue puesta a punto hasta 1929.

El café en grano es descafeinado antes de la torrefacción con la ayuda de un solvente (autorizado por la legislación) que actúa sobre las células vegetales que contienen la cafeína en el interior de los granos. Estos últimos, una vez terminada la operación, con sometidos a un nuevo tratamiento que elimina por destilación, prácticamente todas las trazas del solvente utilizado. Los controles impuestos por la ley aseguran la inocuidad del café descafeinado.

Actualmente, los procesos de preparación permiten suprimir la cafeína sin verdaderamente modificar las substancias aromáticas del café; así pues, el sabor del café no se modifica prácticamente.

### La conservación del café tostado

Bajo la influencia del oxígeno y de la humedad que oxidan los elementos constituyentes, el aroma del café se altera rápidamente al aire libre. Bastan veinticuatro horas para que desaparezca el gusto de "recién tostado", y basta una semana para que el aroma se atenúe y se modifique. Después de tres semanas aparece un gusto a rancio, y poco después el café ya no es consumible.

La presencia de una proporción bastante fuerte de gas carbónico en el café impide su acondicionamiento en embalajes rigurosamente herméticos — sólo y único medio efectivo de asegurar su conservación. Para remediar a este inconveniente, se adoptan dos soluciones:

- El café es embalado bajo vacío, generalmente en latas metálicas. La conservación puede así prolongarse hasta un año; se constata a pesar de todo una ligera alteración del aroma.
- Después de molido, se lleva a cabo un desgasado, y luego se acondiciona en silos metálicos. Más tarde, se introduce el café en sobre al abrigo del aire. (Este proceso se utiliza sobre todo en los países escandinavos).

## ENQUETES PRELIMINAIRES - REALISATION DES DOCUMENTAIRES VIDEO

par

SEVASTIANOS POUSSOS

Nous avons effectué un certain nombre de missions Scientifiques au principales régions productrices de café au Mexique ( Chiapas et Veracruz ) afin de nous familiariser au principaux procédés d'industrialisation de ce produit agricole.

De ces voyages nous avons profité pour filmer (video super 8) tout ce qui traite du café (agronomie, pédologie, phytopathologie, amélioration génétique et résistance aux maladies, récolte et industrialisation du café). Les documentaires que nous sommes en train de terminer sont trois et portent sur

- l'industrialisation du café à Soconusco
- l'industrialisation du café dans l'état de Veracruz
- la valorisation biotechnologique de la pulpe de café.

Au cours de ces voyages nous avons également pris un soin particulier pour collecter un certain nombre d'échantillons susceptibles de contenir une microflore naturelle tout à fait particulière capable de se développer sur la pulpe de café. Ces échantillons ( environs une soixantaine ) ont déjà été analysés au Laboratoire pour isoler de nouvelles souches de champignons filamenteux se développant sur des milieux de culture sélectifs. L'isolement et la purification de ces souches est une étape longue, nécessitant non seulement du temps mais aussi et surtout du matériel ainsi que des milieux de culture.

Nous disposons actuellement au Laboratoire environs 200 souches déjà pures de champignons filamenteux et nous sommes en train d'en isoler encore 150. Au total pour cette étude nous comptons disposer d'un peu plus de 350 souches. L'objectif de cette étude étant double

- obtenir des microorganismes nouveaux capables de se développer sur la pulpe de café et de dégrader la caféine, les tannins ou les polyphénols
- former des chercheurs aux techniques de base de purification et identification de ces souches.

Par la suite viennent les comptes rendus des missions que nous avons fait dans le Chiapas et dans l'état de Veracruz.

## COMPTE RENDU DE LA MISSION A TAPACHULA

Par

Sebastianos Roussos

### Objet :

- Filmer les différentes étapes du traitement de café dans le Chiapas,
- enquêter sur les déchets de café et
- rechercher de nouvelles souches de champignons filamenteux capables de dégrader la pulpe de café ainsi que le cascavillo.

Date : du Lundi 16 au Mercredi 18 Février 1987

Lieu : Soconusco , Partie Sud-Ouest de l'Etat de CHIAPAS , Mexique

Participants : ROUSSOS Sébastianos (CRSTOM) ; TOMASINI Anaceli (UAM-I) et VILLAREAL Philippe (CRSTOM).

### INTRODUCTION

Dans le cadre de recherches sur la détoxification des déchets de café que nous menons actuellement à l'ORSTOM en coopération avec le Département de Biotechnologies de la UAM-I, nous avons réalisé une mission Scientifique dans l'Etat de Chiapas avec les objectifs suivants :

- Enquêter sur les principaux déchets de l'industrialisation du café.
- Rechercher de nouvelles souches de champignons filamenteux capables de détoxifier les déchets de café.
- Filmer les principales étapes de la culture de café ainsi que les différents processus de son industrialisation dans la région de Soconusco.

La région de Soconusco s'étend à la partie Sud-Ouest de l'Etat de Chiapas au Mexique à la frontière avec le Guatemala. Sa superficie est de 5.827 Km<sup>2</sup> et sa population à peine dépasse un demi-million d'habitants. La plus importante ville de cette région agricole est Tapachula avec 200.000 habitants. Dans cette région se trouve le volcan Tacaná de 4.117 m de haut. Sur les pentes de ce vieux volcan prennent naissance d'innombrables ruisseaux formant des cascades, la plus importante étant celle de Muxbal.

Les principales cultures agricoles sont : café, maïs, soja, cacao, coton, banane, canne à sucre, mangue, riz, pastèques, coco, tabac, haricots, avocat et autres produits agricoles d'importance mineure.

Le produit le plus cultivé au Soconusco est le café, si l'on considère la superficie des cultures (cafetales) ainsi que le nombre de "quintales" ( quintal = 57,5 Kg de café pergamino) produits en

comparaison avec d'autres produits agricoles. En 1985 il y a eu un total de 81.000 hectares de culture de café représentant 18% de la superficie totale destinée à la culture de café au Mexique. Pour la même année la production de café a été pour cette région légèrement supérieure à 1.250.000 quintales représentant à peu près le 20% de la production nationale. Non seulement par la superficie occupée au sol mais essentiellement par l'importance de la production de café, Soconusco se confirme comme la zone caféyère occupant le premier lieu au Mexique.

Pour réaliser cette mission nous avons bénéficié de l'aide de l'Instituto Mexicano del Café ( INMECAFE ), de l'appui logistique de la mission ORSTOM-Mexique ainsi que d'un financement de la CEE.

#### PREPARATION ET DEROULEMENT DE LA MISSION

**PREPARATION** : Afin de tester le matériel Vidéo de la mission ORSTOM-Mexico, nous avons réalisé un reportage préalable au laboratoire de Biotechnologies de la UAM-I sur les champignons filamenteux isolés sur extraits de café que nous avons collecté lors d'une précédente mission dans l'Etat de Vera Cruz. Les principales conclusions de ce reportage ont été les suivantes:

- Utiliser une lumière artificielle pour les prises de vue à l'intérieur ou à l'ombre.
- Disposer de 2 - 3 batteries rechargeables pour avoir une autonomie suffisante pour les prises de vue aux champs.
- Amener une rallonge de 10 m , une multiprise volante, une multiprise normale, une prise adaptateur avec terre, cables avec fiches de lecture pour visionner sur tele à l'hotel.
- Amener le trepied pour la prise de vue fixe.
- Amener des sacs en matière plastique pour la collecte d'échantillons.
- Amener un magnétophone portatif avec microphone indépendant ainsi que de cassettes vierges pour l'enregistrement de son et la réalisation d'interviews.
- Amener les factures d'achat du matériel pour un éventuel contrôle douanier à l'aéroport.

**DEROULEMENT DE LA MISSION** : Arrivée de Aeroméxico à Tapachula Lundi 16 Février à midi. Dès notre arrivée on a été pris en charge par le Dr. Paulo TOMASINI et nous avons rendu visite à l'ing. Fidel GARCIA ONTIVEROS , agronome et responsable du Dpto de Amejoramiento y Produccion à l'INMECAFE de Chiapas. Ensemble nous avons établi le plan des visites ainsi que les lieux de tournage.

Par commodité nous avons commencé le lundi après midi par la visite d'un "beneficio seco" situé à Tapachula . Par la même occasion on a visité le Centre Regional de INMECAFE de Chiapas où le Lic. Miguel Jasinto CASTANEDO ANDRADE , delegado regional, nous a reçu. La journée du mardi a été réservée pour la visite d'un "beneficio humedo" de la "finca" Muxbal situé au flans du volcan Tacaná. Nous avons visité et filmé des "fincas" privées situées aux alentours de Tapachula le mercredi matin.



Le fruit du café (cereza) arrivé en maturité est de couleur rouge, il est cueilli manuellement, transporté à l'usine (beneficio) et par la suite traité industriellement pour sa commercialisation sous forme de grain vert (café oro). Il est principalement destiné à l'exportation. Il existe un autre type de traitement de la "cereza" par séchage direct sans passer par un "beneficio". Dans ce cas le produit obtenu s'appelle "Café naturel". Dans la région de Soconusco la presque totalité du café produit est destiné à l'exportation, de ce fait nous ne développerons ici que les principales étapes de l'industrialisation du "café oro" lesquelles sont les suivantes:

- Cueillette manuelle
- Transport au "beneficio Humedo"
- Tri manuel des fruits murs (cereza) et séparation des fruits verts
- Mesure suivant le volume des fruits rouges et des fruits verts
- Séchage direct au soleil des fruits verts (café naturel)

#### "PROCEDE HUMIDE"

- Lavage et élimination des mauvais fruits (sifon)
- Depulpage de la "cereza"
- Élimination de la pulpe (rivière ou aires de compostage)
- Fermentation du grain ( 24- 36 heures )
- Lavage et élimination du tegument
- Séchage du grain ( solaire ou industriel )
- Produit final obtenu à 12% d'humidité : "Café Pergamino"

#### "PROCEDE SEC"

- Transport du café pergamino (quintales) en camion
- Mesure du café en nombre de sacs
- Stockage du café jusqu'au traitement sec.

#### "Proceso seco"

- Nettoyage à sec du café ( élimination des débris solides)
- Broyage du grain pour éliminer les pellicules "pajilla"
- Tamisage , criblage et séparation suivant la taille et le poids
- Élimination électronique des grains tachés (desmanchado)
- Contrôle, finition manuelle du café vert
- Ensachage final pour exportation de "café oro" en quintales
- Stockage du café dans des Dépôts généralement de l'INMECAFE
- Transport des quintales de café par camions remorques jusqu'à la frontière des États Unis ou aux ports d'embarquement.

Il nous a été difficile de suivre les différentes étapes d'industrialisation du "café naturel" destiné exclusivement à la consommation nationale, étant donné que dans la région de Soconusco la période de collecte de café approchait à sa fin. Il n'y avait du café que dans les parties les plus hautes situées à plus de 1.500 m d'altitude. A partir de cette hauteur la presque totalité de café se destine à l'exportation, exception faite pour les grains verts en fin de période de collecte. Cependant nous pouvons imaginer le procédé d'industrialisation des grains de café de deuxième voir troisième catégorie qui doit être le suivant:

- collecte manuelle
- maturation des grains verts dans des bassins de stockage à l'ombre pour obtenir une couleur jaune des grains
- séchage solaire dans des aires de séchage (patios)
- Obtention du "café naturel" à 12% d'humidité
- Broyage des grains pour enlever le "cascavillo"
- Classification du café selon sa taille et sa densité

Rappelons brièvement les principales étapes ainsi que les diverses formes de présenter le café traité industriellement dans la région de Soconusco, Edo de Chiapas, Mexico :

"café naturel" : Grains de café qui n'ont pas été soumis au procédé humide et qui ont été directement séchés au soleil pour obtenir une humidité de 12%.

"café pergamino" : Grains de café traité par le procédé humide (lavage, despulpage, fermentation, élimination du tégument, séchage) et obtenus à 12% d'humidité.

"café oro" : Grains de café pergamino soumis au procédé sec (nettoyage à sec, broyage, calibrage, triage, polissage) pour obtenir un café vert destiné à l'exportation.

"cereza" : Fruit de café mur, de couleur rouge, ressemblant à la cerise d'où tient d'ailleurs son nom.

#### PERSONNES RENCONTREES ET ADRESSES

Lic. Miguel Jasinto CASTANEDO ANDRADE. Delegado Regional del INMECAFE, Tapachula, Edo de Chiapas

Ing. Fidel GARCIA ONTIVEROS. Depto de Producción y mejoramiento de Café.

INMECAFE. Tapachula, Edo de Chiapas. Tel. 50466 y 65940

Sr. Pedro SALINAS SANCHEZ. Depto de Recepción e Industrialización del café. INMECAFE. Tapachula, Edo de Chiapas

Sr. Cesar GONZALEZ GUTIERREZ. Encargado del Beneficio seco de Tapachulita

Tapachula. Edo de Chiapas

Dr. Pablo TOMASINI. Finca Quem Sabe. Tapachula, Edo de Chiapas

Sr. Amor G. Finca Quem Sabe. Tapachula, Edo de Chiapas

Sr. Juan TOMASINI. Finca Chapultepec. Tapachula, Edo de Chiapas

#### CONCLUSION

Nous avons beaucoup appris sur la culture du café (mode de sélection et de plantation de grains de café, aménagement des terrains pour la plantation de café, les arbres "chulon" utilisés pour fournir l'ombre aux cultures de café exposées au soleil, la variété de café, le champignon phytopathogène des cultures de café, etc.)

ejido...el canton etc.

Cependant notre enquête portant sur l'industrialisation du café et les sous produits obtenus ne nous a pas permis de développer davantage le volet agronomique et socioculturel de cette merveilleuse plante tropicale. Nous conseillons vivement aux intéressés de s'adresser pour plus d'information aux deux livres suivants:

**Cafeto : Cultivo y Fertilizacion**

Dr. Jose F. CARVAJAL

Instituto Internacional de la Potasa Berna / Suiza

2<sup>a</sup> Edicion 1985

Ed. Instituto Internacional de Potasa - P.O. Box 121

CH 3048 WORBLAUFEN - BERN - SUISSE

**Cafe y Sociedad en Mexico**

Dra. Margarita NOLASCO

Centro de Ecodesarollo

1<sup>a</sup> Edicion 1985

Altadena 8 - Mexico 03810 D.F.

## COMPTE RENDU DE LA MISSION A JALAPA, VER.

### Objet :

- Filmer les différentes étapes de l'industrialisation du café dans l'Etat de Veracruz
- Enquêter sur les déchets du café
- Prendre des contacts avec des chercheurs de l'INNECAFE

Date : du Jeudi 5 Mars au Vendredi 6 Mars 1987

Lieu : Jalapa, Coatepec, Etat de Veracruz ; Mexique.

Participants : Philippe VILLAREAL et Sébastianos ROUSSOS ( CRSTOM )

### INTRODUCTION

Suite à une précédente mission à Xico en décembre dernier, nous sommes retournés dans l'Etat de Veracruz pour filmer cette fois-ci les principales étapes de l'industrialisation de café. Forts d'une expérience précédente concernant la réalisation d'un documentaire sur les principales étapes de la culture du café dans la région de Soconusco ( Chiapas ), nous avons voulu cette fois-ci réaliser un documentaire sur l'industrialisation du café dans l'Etat de Veracruz.

L'état de Veracruz se situe à la partie Centre-Est de la république Mexicaine et occupe une surface de 72.000 Km<sup>2</sup> ( 4% du territoire total du pays ). La ligne moyenne mesure approximativement 780 Km de long et de largeur inégale évoluant de 36 Km à 212 Km . Cet état se divise en trois zones ( Nord , Sud et Centrale ). Les deux premières zones se distinguent par la caractéristique pétrolière ( extraction, industrie petrochimique ) alors que la zone centrale se caractérise par des activités commerciales, portuaires et agricoles. La population de l'état a triplé entre 1930 et 1980 ; elle a passé de 1.377.000 à 5.387.000 habitants, occupant de ce fait, au niveau national, la troisième place.

Dependant malgré l'importance de la production pétrolière ( Poza Rica , Coatsacoalcos ) Veracruz est essentiellement un état agricole. Avec une production de viande de 162.200 (13,5% de la production nationale), de 570 million de litres de lait (18% de la production nationale), une production de sucre de 958.000 tonnes pour 1980 ( 67% de la production nationale ). De ce fait l'état de Veracruz est le premier producteur de sucre au Mexique, le premier producteur de viande , le second producteur de café (26% de la production nationale) et le troisième producteur de lait.

D'autres produits agricoles s'additionnent à cette liste comme : maïs, haricots, riz, oranges, mangues, bananes, ananas, patates, avocats, papaye, citrons, soja, chile, tabac etc... Cette diversification au niveau de la production agricole est essentiellement due aux caractéristiques particulières de cette région à climat tropicale maïs

aussi à la nature des profils de cette région. En altitude se cultivent principalement la patate ( altiplano de Perote ) et le café et au niveau de la mer la canne à sucre, l'ananas et les bananes. Pour être complet, il faudrait ajouter à cette liste les produits de pêche 45.000 tonnes (14% de la pêche nationale).

Il nous a donc paru tout à fait intéressant de faire une mission dans cette région agricole et riche pour se documenter sur l'état de l'agro-industrialisation et plus particulièrement sur l'industrialisation du café.

Nous avons donc pris contact avec l'Instituto Mexicano del Cafe (INMECAFE) Ing. Roberto LICONA FRANCO, Directeur du Département de recherche et d'amélioration génétique du café. C'est l'INMECAFE qui a organisé notre mission et planifié toutes les visites. Pour cette mission nous avons bénéficié outre l'aide très importante et efficace de l'INMECAFE, l'appui logistique de la mission ORSTOM du Mexique ainsi que d'un financement de la CEE.

#### DEROULEMENT

La préparation de la mission a été simplifiée au maximum , étant donné que la semaine antérieure à cette mission nous avons réalisé un documentaire sur l'industrialisation du café à Soconusco. De plus nous connaissons relativement bien cette région de café vue sa proximité au DF et du nombre important de nos voyages antérieurs.

Départ de Mexico le jeudi 5 Mars à 5 du matin; arrivée à Jalapa vers 10 heures du matin. Il est important de signaler qu'au niveau de Perote il faisait un froid exceptionnel le matin à un tel point qu'il commençait de neiger.

Nous avons rencontré à l'INIREB nos collègues de l'ORSTOM Dr. Odille HOFFMANN et le Dr. Jean-Pierre ROSSIGNOL. Après une discussion fructueuse sur leurs travaux de recherche scientifiques sur le café et particulièrement sur la pédologie et l'économie rurale, nous sommes rendus à l'INMECAFE .

Il est important de mentionner que l'INMECAFE et en particulier le Dr. Roberto LICONA FRANCO Chef du Département de recherche de cet Institut ont contribué d'une manière importante au bon déroulement de notre mission aussi bien à Jalapa mais aussi à Soconusco en mettant bien volontier en notre disposition le matériel nécessaire ainsi que des ingénieurs responsables de différentes activités de l'INMECAFE.

Après une présentation de notre programme de recherche sur le café mené en coopération ( ORSTOM-UAM ) nous avons planifié le programme de mission pour les deux jours de tournage. Nous avons vu un documentaire audiovisuel sur les principales activités de l'INMECAFE. Le Dr. Roberto LICONA FRANCO nous a fourni un certain nombre de documents sur le café de l'INMECAFE ainsi qu'une copie du document audiovisuel.

Dans l'après midi nous avons parcouru les différents sites de tournage ( champs expérimentaux, beneficios ) et nous avons eu l'occasion de discuter avec des agronomes de cet Institut.

Nous avons filmé les différentes étapes de l'industrialisation du café ( procédé humide et sec ) . De même nous avons enquêté sur les principaux déchets obtenus au cours de ces procédés ( pulpe de café, pajilla ) pour le beneficio nommé Puerto Rico.

Le volet Agronomique a été traité également en visitant le champs d'expérimentation Garnica de l'INMECAFE situé à Jalapa. Nous avons filmé en particulier le mode de culture, les différentes variétés de café sélectionnées selon des critères de résistance aux attaques de la rouille, la taille de l'arbre, le contenu en caféine, la taille du grain ...

#### PERSONNES RENCONTREES ET ADRESSES

Dr. Roberto LICONA FRANCO. INMECAFE. JALAPA, VER. Tel. 878-31

Ing. Cesar GUSMANN ORTIZ. Beneficio INMECAFE. COATEPEC. VER.  
Tel.606-65

Dr. Odille HOFFMANN et

Dr. Jean-Pierre ROSSIGNOL. ORSTOM-INIREB. JALAPA, VER.

#### CONCLUSIONS

L'agriculture est très développée dans l'état de Veracruz avec une industrie agroalimentaire assez avancée. Ceci est également vrai pour la culture et l'industrialisation du café. Cependant cette agriculture est très diversifiée contrairement à celle de Chiapas qui est plus spécialisée vers le café.

## COMPTE RENDU DE LA MISSION A XICO ; Ver.

Objet : Collecte d'échantillons pour l'isolement de champignons detoxifiants la pulpe de café.

Date : Du Lundi 8 Décembre au Mardi 9 Décembre 1986  
Lieu : Jalapa , Coatepec , Xico Edo Veracruz ; Mexico.

Participants : Maria de los Angeles AQUIAHUATL , Professeur de microbiologie à la UAM-I ; Maria del Refugio TREJO, Biochimiste contractée pour le projet detoxification de la pulpe de café CEE et Sévastianos ROUSSOS , Chercheur microbiologiste de l'ORSTOM.

### INTRODUCTION

Le troisième volet du projet de recherche " fourrages tropicaux " mené actuellement au Département de Biotechnologies de la UAM-I, financé par la CEE concerne la detoxification de la pulpe de café. C'est un sujet de recherche tout à fait nouveau pour notre laboratoire et pour aborder ce sujet on a démarré à partir du zéro.

En nous fixant comme objectif la valorisation de la pulpe du café par fermentation en milieu solide nous avons voulu introduire dans notre groupe de travail une nouvelle ligne de recherche sur les microorganismes nouveaux présentant des caractéristiques intéressantes. En particulier isoler des souches de champignons filamenteux dégradant la caféine , principal composé toxique de la pulpe de café ou synthétisant des enzymes particulières comme les pectinases. L'objectif étant double :

- isoler des microorganismes intéressants
- former des chercheurs aux techniques de purification et d'identification de ses microorganismes.

Nous nous sommes rendus dans la région de Jalapa , capitale Mexicaine du café située au centre -est du Mexique et plus exactement dans l'Etat de Veracruz, pour collecter un certain nombre d'échantillons afin d'en isoler par la suite au laboratoire des champignons filamenteux sur des milieux sélectifs. Pour la réalisation de cette mission nous avons bénéficié de l'infrastructure logistique de l'ORSTOM ainsi que d'une aide financière de la CEE.

### DEROULEMENT

Une semaine avant le départ nous avons contacté les chercheurs de l'ORSTOM travaillant à l'INIREB à Jalapa pour organiser avec eux la mission. Un véhicule tout terrain a été prévu pour visiter des plantations de café (cafetales) ainsi que des "beneficios" situés à des endroits difficiles d'accès. Le Dr. Luc CAMBREZY , chercheur géographe de l'ORSTOM travaillant sur le café à Jalapa, a minutieusement préparé cette mission.

Pour la collecte des échantillons nous avons pris des sachets stériles en matière plastique. Pour chaque échantillon prélevé nous avons noté le N°, l'endroit de prélèvement ainsi que la nature de l'échantillon collecté.

Départ de Mexico en voiture le lundi 8 décembre à 6 heures, arrivée à Jalapa à 11 du matin. En fin de matinée nous avons visité un certain nombre de cafetales en cherchant des échantillons susceptibles de contenir des champignons filamenteux intéressants.

Pour la constitution d'une collection de microorganismes correspondant aux objectifs fixés nous avons recherché à collecter des échantillons présents dans l'écosystème de culture et d'industrialisation du café, selon la stratégie suivante:

Tout d'abord nous avons collecté au niveau de l'arbre (caféyer) des fruits murs présentant une attaque microbienne; de la même manière des feuilles ou des morceaux de branches ont été proprement collectés. Au niveau du sol, au pied des caféyers, nous avons recherché plus particulièrement les fruits et les feuilles en décomposition, les branches présentant une attaque ainsi que le sol lui-même.

Ensuite, nous avons visité quelques "beneficios" (usines de traitement du café). La sélection des beneficios a été essentiellement influencée par la taille, la vétusté, ainsi que l'ancienneté de ces usines. En effet on voulait isoler une microflore naturellement installée sur ses sites. Cette microflore serait, par la force des choses, spécialisée avec le temps vers la dégradation des différents composés du fruit du café (pectines, tannins, cellulose, hemicellulose, lignine, caféine).

Nous avons prélevé des grains de café en décomposition aux abords de différentes cuves de fermentation ou de stockage, de la pulpe de café provenant des tas de compostage non loin de la "despulpadora". Enfin nous avons graté la surface du sol et des murs intérieurs aux endroits où apparaissaient des projections de pulpes des récoltes antérieures. A ces endroits il y avait effectivement une microflore de champignons filamenteux bien développée avec une sporulation abondante.

Au total nous avons récolté 38 échantillons au cours de ces deux jours de mission. Nous avons profité de ce voyage pour visiter rapidement le beneficio de Puerto Rico en Coatepec et prendre une centaine de kilos de pulpe fraiche indispensable pour la préparation des milieux de culture.

#### PERSONNES RENCONTREES ET ADRESSES

Dr. Luc CAMBREZY. Chercheur ORSTOM. INIREB. JALAPA, VER.

Dr. Odile HOFFMANN. Chercheur ORSTOM. INIREB. JALAPA, VER.

Ing. Cesar ORTIZ GUTIERREZ. Directeur Beneficio Puerto Rico. COATEPEC, VER.



## CONCLUSIONS

Cette mission à Jalapa nous a permis d'amener au Laboratoire un certain nombre d'échantillons à partir desquels il est probable d'isoler des microorganismes intéressants. Nous avons nous - mêmes collecté ses échantillons et nous avons pu constaté à cette occasion que notre stratégie d'échantillonnage s'averait bonne. En effet il est fort probable que parmi les microorganismes se développant naturellement sur les fruits de café endommagés se trouvent des champignons filamenteux utilisant la pulpe de café ou un autre composé comme substrat carboné pour leur croissance.

Au Laboratoire, pour l'isolement de nouvelles souches de champignons filamenteux, nous allons suivre également une stratégie identique pour le traitement de l'ensemble des échantillons ainsi récoltés.

RAPPORT  
SUR LA SITUATION  
DU CAFE AU COSTA RICA

VICTORIA CHAN  
CITA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SAN JOSE - COSTA RICA

# INFORME SOBRE EL CAFE EN COSTA RICA

## A- INTRODUCCION

La caficultura constituye una de las actividades de mayor impacto en la economía de Costa Rica; representa una fuente de empleo para un gran sector de la población en las fases de cultivo, recolección, transporte, elaboración y comercio interno y externo.

El café es el principal producto de exportación de Costa Rica. En el año 1986 representó el 34.48% del total de exportaciones, generando divisas por un valor de 95.2 millones de dólares (cuadro # 1).

La cosecha 1984 - 1985 fue la más alta registrada en la historia cafetalera del país. La producción de café en fruta fue de 6721084.45 dobles hectolitros (D.hl), con un total de 152635.83 toneladas métricas de café oro y un rendimiento de café cereza o sea café en fruta a café oro de 22.71 kg por cada D.hl. El 89% de esa cosecha se exportó y el 11% restante fue para consumo interno.(1)

En relación con la cosecha 1983 - 1984 hubo un incremento del 28 por ciento. La última cosecha recolectada (85 - 86) presentó una disminución del 36% con respecto a la cosecha 1984 - 1985, debido principalmente a la variación cíclica que se observa en la producción del café (2). El cuadro # 2 muestra el comportamiento de la producción de café en los últimos cinco años.

### CUADRO # 2

#### PRODUCCION DE CAFE EN FRUTA (Cosechas 1980 - 1981 a 1984 - 1985)

| COSECHA   | PRODUCCION<br>EN DOBLE<br>HECTOLITROS | PRODUCCION<br>TONELADA METRICA<br>CAFE ORO | RENDIMIENTO<br>DE KG CAFE ORO<br>DOBLE HECTOLITRO |
|-----------|---------------------------------------|--|---|
| 1980-1981 | 5 290 748.03                          | 121 677.90                                 | 23.00   |
| 1981-1982 | 4 525 189.00                          | 104 581.53                                 | 23.11   |
| 1982-1983 | 5 463 334.72                          | 125 649.16                                 | 23.00   |
| 1983-1984 | 5 214 148.75                          | 117 167.14                                 | 22.47   |
| 1984-1985 | 6 719 550.78                          | 152 605.03                                 | 22.71   |

FUENTE: ICAFE

1 D.hl= 200 litros

Café oro: es el café despergaminado; corresponde al "café verde" en el mercado internacional.

El area cultivada de cafe para la cosecha 1984 - 1985 fue de 111000 hectareas; el rendimiento promedio en D.h/ por hectarea fue de 60.54. En el cuadro # 3 se presenta la produccion registrada, area cultivada, rendimiento y numero de productores de cafe para las cosechas 1981- 1982 a 1984 - 1985 (2).

### CUADRO # 3

COSTA RICA: PRODUCCION REGISTRADA, AREA CULTIVADA, RENDIMIENTO DE CAFE. COSECHAS 1980-1981 A 1984-1985

| COSECHA   | PRODUCCION<br>EN D.h/ | AREA CULTIVADA<br>EN HECTAREAS | RENDIMIENTO EN<br>D.h/ POR HECTAREA |                      |
|-----------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
|           |                       |                                | de la<br>cosecha                    | promedio<br>movil 1/ |
| 1981-1982 | 4 525 189             | 82 500                         | 54.85                               | 61.55                |
| 1982-1983 | 5 463 334             | 83 200                         | 65.67                               | 60.15                |
| 1983-1984 | 5 214 149             | 87 000                         | 59.93                               | 62.05                |
| 1984-1985 | 6 720 532             | 111 000                        | 60.54                               | 52.76                |
| 1985-1986 | 4 193 840             | 111 000                        | 37.79                               | -----                |

FUENTE: ICAFE

1/: Promedio movil: promedio del ano respectivo, ano anterior y ano posterior, para amortiguar la variacion ciclica de la produccion de cafe.

Existen 101 empresas beneficiadoras en el pais, de las cuales el 33% son cooperativas.(1)

#### B- CONDICIONES ECOLOGICAS PARA EL CULTIVO DE CAFE EN COSTA RICA.

Los elementos de clima mas importantes que influyen en la calidad del cafe son las siguientes: luminosidad, precipitacion pluvial y temperatura. Estos elementos estan relacionados a con la altitud y en conjunto determinan la calidad del producto final en la taza.

##### 1. Luminosidad:

El cafeto requiere durante los meses secos de 200 a 280 horas de brillo solar por mes y en los meses lluviosos de 100 a 150 horas por mes. El promedio optimo para las zonas cafetaleras es de 1500 a 2500 horas-luz anual.

En Costa Rica, las zonas cultivadas de cafe tienen un brillo solar anual de 1575 horas como minimo y de 2400 horas como maximo.(3)

## 2. Precipitacion pluvial:

Las precipitaciones apropiadas para el cultivo del cafe dependiendo de su distribucion durante el ano, esta comprendida entre 1500 y 2000 mm anuales.

Para Costa Rica, el cafe tiene un rango de adaptacion que oscila entre 2000 y 4200 mm y necesita una estacion seca no mayor de 4 o 5 meses de duracion, que concuerda con la epoca de reposo de la planta antes de la floracion.

En Costa Rica el minimo de dias de precipitacion es de 145 y el maximo de 245 dias. (3)

## 3. Temperatura:

Se ha determinado que la temperatura ambiente ideal para el crecimiento del cafeto es de 23 C durante el dia y de 17 C durante la noche. El cafe se adapta a una temperatura optima promedio entre 19 C y 25 C con variaciones no mayores de 5 C a 6 C. (3)

## 4. Altura:

Debido a la influencia de la altura en la calidad de la bebida, en Costa Rica se ha fijado una altitud minima de 500 metros sobre el nivel del mar (s.n.m) para la siembra de cafe. En nuestro pais las plantaciones de cafe estan en zonas cuya altitud esta comprendida entre 200 y 1700 metros s.n.m. Los lugares que producen las mejores calidades de cafe estan entre una altura de 1200 a 1700 metros s.n.m.(4)

## 5. Humedad relativa:

Para obtener una condicion fitosanitaria optima del cultivo, la humedad relativa debe oscilar entre 77 y 89 por ciento.

La zona cafetalera de menor altitud (200 a 600 metros s.n.m.) en el pais, posee la mas alta humedad relativa (89%) y el numero maximo de dias de precipitacion y es la que produce el tipo de cafe de mas baja calidad.(4)

## 6. Suelos:

En Costa Rica los suelos derivados de cenizas volcanicas y los de origen aluvial presentan condiciones excelentes para el cultivo del cafe; son suelos profundos de excelentes condiciones fisicas, altos en bases de intercambio y buen contenido de materia organica pero no son de muy amplia distribucion.(3)

En relacion con la acidez del suelo, el cafeto prefiere un suelo ligeramente acido con un pH de 6 a 6.5. En el pais el ambito de pH de los suelos esta entre 4.5 a 6.0.(4)

## C- VARIETADES O CULTIVARES

En el país se cultivan diferentes variedades de café de la especie *Coffea arabica*, siendo las más importantes:

- **Typica** (arabico o criollo): Variedad con la que se iniciaron nuestras siembras. Es una variedad de porte alto que alcanza en pocos años cuatro o más metros de altura. Los frutos son alargados de muy buen tamaño y de magnífico rendimiento cereza-oro. Aunque todavía ocupa un alto porcentaje del área cultivada del país, su cultivo no es recomendable debido a que ha sido superada ampliamente por los demás cultivares de uso comercial. (3)

- **Hibrido tico**: Originado del cruce natural entre el arabico y el Bourbon. Se adapta a las más variadas condiciones de clima y suelo, es de producción media y de maduración temprana; su fruto es más pequeño y de menor rendimiento cereza-oro que el Typica. (3)

- **Villa Sarchi**: Selección de un posible cruce natural entre el Bourbon y el San Ramon, de porte pequeño y de apariencia compacta. Presenta características definidas de precocidad y alta producción. Posee un sistema radicular fuerte y abundante, por lo que se adapta bien a condiciones variadas de clima y suelo y especialmente a zonas ventosas. Es de alta producción y su porte permite sembrarlo a cortas distancias. (3)

- **Caturra**: Variedad introducida del Brasil en la década del 50 del presente siglo. Se adapta a la mayoría de las condiciones de clima y suelos del área cafetalera nacional. Tiene características muy similares al Villa Sarchi en cuanto a forma y tamaño. Posee la ventaja de producir granos de mayor tamaño que el Villa Sarchi. Es una variedad de maduración tardía y de alta producción y es la variedad más recomendable para cultivar en las zonas húmedas del país. (3)

- **Mundo Novo**: Es un cruce de Bourbon con Sumatra originario del Brasil, es parecido al Hibrido tico en cuanto a forma y tamaño. Es una variedad de alta producción y se adapta a zonas de baja precipitación pluvial, presenta alto rendimiento (cereza-oro), de maduración tardía y uniforme. (3 y 4)

- **Catuai**: Hibrido entre Caturra y Mundo Novo, originario del Brasil. Los frutos son grandes, tiene alto rendimiento (cereza-oro), su producción es superior a la de otras variedades y maduración tardía. Presenta el inconveniente de producir altos porcentajes de "grano vano" que conlleva a bajos rendimientos en los beneficios. Con el fin de controlar este factor negativo de origen genético, el Instituto del Café (ICAFE) y el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) han establecido campos de producción de semilla seleccionada. (3 y 4)

- **Geisha T.2722**: Variedad de buena producción pero requiere de buena fertilización y disponibilidad de agua. Sus frutos son grandes con semillas grandes y alargadas y magnífica calidad de

taza. Es de maduración tardía. La característica principal es la de poseer resistencia a la enfermedad "Roya del café". (3 y 4)

Las variedades más recomendadas por el ICAFE y el MAG para cultivar son: Catuai, Caturra, Villa Sarchi y Mundo Novo.

#### D- TIPOS DE CAFE

El café de exportación (grano oro) se divide en los siguientes cinco tipos de calidad: (4)

1. Strictly Hard Bean (S.H.B.): Es el café producido a más de 1200 m, grano caracterizado por su dureza física. Presenta en la taza alta acidez, buen cuerpo y aroma; es el de mejor calidad. (estrictamente de altura)

2. Good Hard Bean (G.H.B.): Producido en el Valle Central en las zonas comprendidas entre 1000 y 1200 m.; grano de buena dureza. Taza con marcada acidez y buen cuerpo. (Mesetas superiores)

3. Hard Bean (H.B.): Producido en las zonas de 800 a 1200 m. de altura. Grano de tipo duro, con licor de muy buenas características de cuerpo y aroma. Su acidez es inferior a la de los anteriores. (Mesetas)

4. Medium Hard Bean (M.H.B.): Proveniente de zonas con precipitaciones mayores que las anteriores (de 3200 a 4200 mm anual). Grano de dureza media. Taza de mediana acidez, cuerpo y aroma. (Semi-mesetas)

5. High Grown Atlantic (H.G.A.): Se produce en zonas de alturas desde 900 a 1200 m. Grano de tipo duro y buen tamaño. Taza con menos cuerpo y aroma que en los anteriores. Es el mejor entre los tipos de la vertiente atlántica. (Atlánticos de altura)

6. Medium Grown Atlantic (M.G.A.): Café producido en las zonas de 600 y 900 m. Grano de menor dureza pero de buen tamaño. Condiciones limitadas de acidez, cuerpo y aroma. (Atlántico medio)

7. Low Grown Atlantic (L.G.A.): Producido en zonas cuya altura alcanza hasta 600 metros s.n.m.. Es de grano grande, del tipo suave, pobre en aroma, sabor y licor. Es el tipo de más baja calidad producido en el país. (Atlánticos de bajura)

8. Pacific (P): Producido en alturas de 300 a 1000 m. en la vertiente del Pacífico, es rico en cuerpo y aroma. (Pacíficos)

#### E-APROVECHAMIENTO DE LA PULPA DE CAFE EN COSTA RICA

El 80% de la pulpa de café no es utilizada y se descarta al

ambiente o a los rios. El 20% restante, se utiliza en la elaboracion de compost para la fertilizacion de los cafetales y en la elaboracion de pulpa seca (15% aproximadamente).(5)

En Costa Rica solo la empresa "Subproductos del Cafe, S.A." utiliza la pulpa para la fabricacion de Pulpina (nombre comercial del producto) y asegura ser la unica industria a nivel mundial que produce este producto.

Esta empresa fue instituida hace unos 10 anos y cuenta con una planta que funciona desde hace 5 anos.

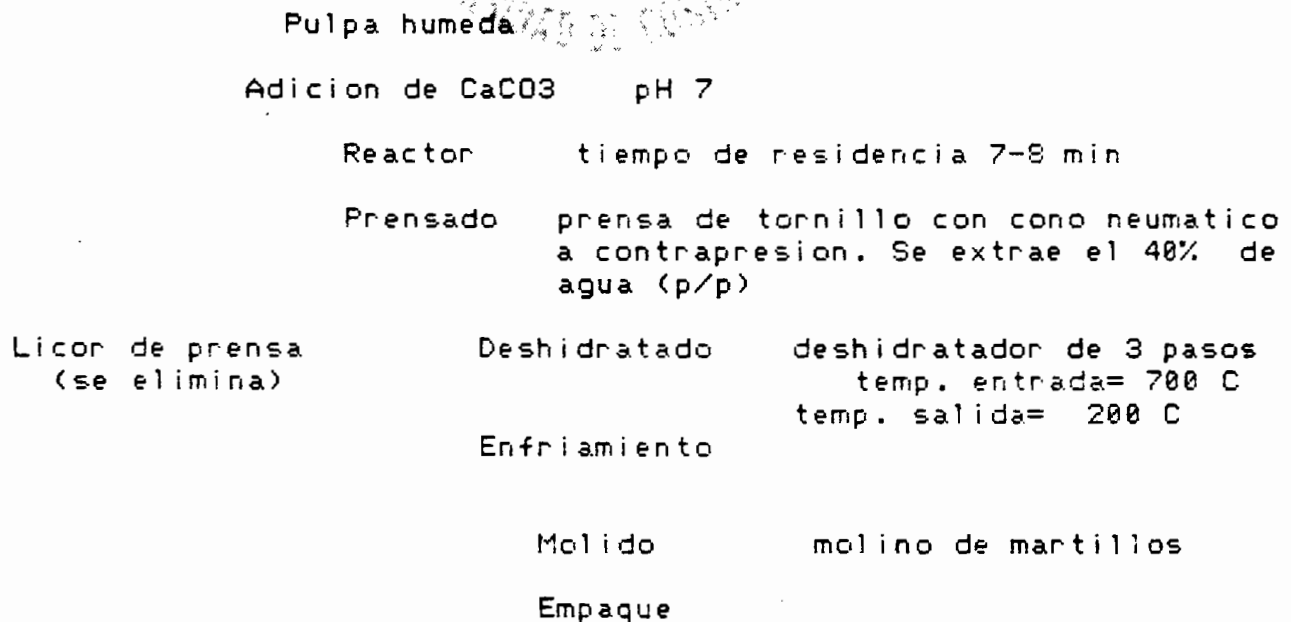
En el ano 1987, la empresa proceso 2500 toneladas metricas de producto (cerca de 17857 TM de pulpa humeda; el % de reduccion pulpa-pulpina es de 14). La cantidad de pulpina producida por hora es de 1200 a 1400 kg; el proceso dura aproximadamente 30 minutos.

El producto presenta las siguientes caracteristicas quimicas:(5)

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| -Humedad               | 14 %          |
| -pH                    | 7             |
| -Proteina              | 11-13 %       |
| -Carbohidratos totales | 44 %          |
| -Fibra                 | 22 %          |
| -Grasa                 | 7 %           |
| -Cafeina               | menos del 1 % |

Los porcentajes de pulpina utilizadas en las mezclas para alimento animal son: 13% para ganado, 5% para cerdos y de un 2.5 a 3% para pollos.(5)

#### DIAGRAMA DE PROCESO PARA LA ELABORACION DE PULPINA:





## ANEXO

### 1. Costa Rica (información general).

Limita al norte con Nicaragua (300 km), al sur con Panama (363 km), al oeste con el Océano Pacífico y al este con el Océano Atlántico.

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Area:                    | 50 900 km   |
| Población total 1984(6): | 2 416 809 (1 208 593 mujeres,<br>1 208 216 hombres) |
| Población urbana(6):     | 1 075 254   |
| Población rural(6):      | 1 341 555   |
| Alfabetismo(6):          | 93.1%   |

El clima es caliente y húmedo en las costas y tierras bajas hasta 900 m. de altitud; la temperatura en esas zonas oscila entre 22 C y 28 C. Entre los 900 y 1500 metros s.n.m., la temperatura oscila entre 14 C y 20 C. En las regiones montañosas la temperatura media anual es de 14 C.

La humedad relativa promedio en San José es de 82% y el rango está entre 77% (en marzo) y 86% (en setiembre y octubre).

### 2. Instituto del Café de Costa Rica.

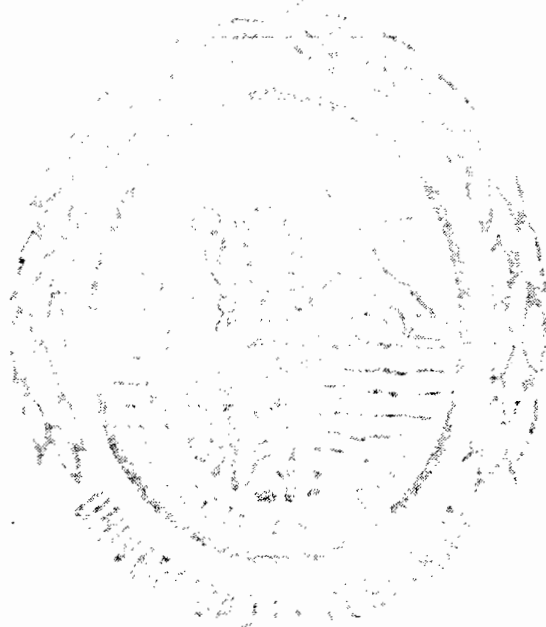
Es el ente contralor y regulador a nivel nacional relacionado con los diversos sectores involucrados en la actividad cafetalera: productores, beneficiadores, exportadores y torrefactores. El ICAFE cuenta con laboratorio químico, sala de catación y el CICAPE (Centro de Investigaciones del Café).

El CICAPE realiza los estudios agnómicos de las variedades en las parcelas de experimentación, selección de semillas y ofrece cursos a nivel nacional e internacional de beneficiado en la planta piloto.

## BIBLIOGRAFIA

1. INSTITUTO DEL CAFE. 1986. Informe anual de labores 1985. San José. 59 p.
2. ----- 1986. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. San José. 110 p.
3. OFICINA DEL CAFE. 1983. Manual de recomendaciones para cultivar café. 5 ed. San José. 86 p.
4. ----- 1978. El café en Costa Rica. Información general. 16 p.
5. CLEVES, R. 1987. Café y subproductos del café. San José: CICAPE. Comunicación personal.

7. COSTA RICA. MINISTERIO DE ECONOMIA, INDUSTRIA Y COMERCIO.  
DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA Y CENSOS. 1987. Censo de  
Poblacion 1984. Tomo 1 y 2. San Jose.



Victoria Chan.  
San Jose, 24 de marzo de 1987.  
cc/Archivo.

CUADRO # 1

VALOR F.O.B. EN DOLARES DE LAS EXPORTACIONES Y LOS PRINCIPALES PRODUCTOS DE COSTA RICA  
(valor en millones de dolares)

| DETALLE                | 1981   |        | 1982  |        | 1983  |        | 1984  |        | 1985  |        | 1986* |        |
|------------------------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
|                        | Valor  | %      | Valor | %      | Valor | %      | Valor | %      | Valor | %      | Valor | %      |
| Cafe                   | 248.8  | 23.73  | 236.8 | 27.47  | 238.9 | 26.52  | 264.6 | 27.12  | 313.2 | 32.52  | 95.2  | 34.48  |
| Banano                 | 224.8  | 22.23  | 236.4 | 27.43  | 238.2 | 27.36  | 229.5 | 23.52  | 282.7 | 21.85  | 53.8  | 19.49  |
| Carne                  | 35.2   | 3.28   | 54.6  | 6.33   | 29.3  | 3.37   | 46.9  | 4.81   | 56.3  | 5.85   | 17.8  | 6.16   |
| Otros productos        | 513.2  | 58.76  | 334.1 | 38.77  | 372.1 | 42.75  | 434.6 | 44.55  | 398.6 | 48.58  | 118.1 | 39.87  |
| TOTAL DE EXPORTACIONES | 1011.2 | 100.00 | 861.9 | 100.00 | 878.5 | 100.00 | 975.6 | 100.00 | 943.8 | 100.00 | 276.1 | 100.00 |

Fuente: Banco Central de Costa Rica.

\*: Datos al 31 de marzo de 1986.

PUBLICATIONS ORSTOM UAM 1986

\* ORSTOM : Institut Francais de Recherche Scientifique pour le développement en Coopération, Département F , UR 601 ; 213 rue La Fayette ; 75010 Paris ; France.

\*\* UAM : Universidad Autonoma Metropolitana, Departamento de Biotecnologia, U.A.M-Iztapalapa, A. P. 55-535 ; 09340 Mexico D.F. MEXIQUE.

I. Participations à différents Congrès

A. XVII CONGRESO NACIONAL MICROBIOLOGIA Puebla,Pue. 27-30 de abril de 1986

BACQUET G., SAUCEDO G., VINIEGRA G.1986.Modelo matematico de transferencia de calor en fermentacion solida de la yuca.II Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

HUERTA S., VINIEGRA, G.1986. Metodo para la validacion de modelos de cinetica microbiana. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

HUERTA S., RAIMBAULT M., REVAH S., VINIEGRA G.1986. Evaluacion de parametros fisiologicos de Aspergillus niger durante su crecimiento en medio solido. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

LOPEZ R., HUERTA S., BACQUET, G., ROUSSOS S., MASSUCCO A.E., GUTIERREZ M., VINIEGRA, G.1986 Evaluacion tecnica de fermentadores piloto para el enriquecimiento proteico de juca en medio solido. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

RIVERA G., GUTIERREZ M., MASSUCCO A. E., VINIEGRA G.1986. Evaluacion tecnica de un sistema de produccion de esporas en columna. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

ANAYA,S., BARRIOS,J. 1986. Fermentacion solida con inoculos pregerminados . XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr. 1986

ROUSSOS S., RAIMBAULT M., VINIEGRA G. 1986. Fisiologia de esporulacion de Trichoderma harzianum . XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

SAUCEDO G., VINIEGRA G. 1986. Efecto del contenido proteico en el ensilaje de yuca. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

TREJO M., ORIOL E., LOPEZ A., ROUSSOS S., VINIEGRA G. 1986. Produccion

de pectinasas en medio solido. XVII Cong.Nacion.Microbiol. Puebla,Pue. 27-30 abr.1986.

B. I<sup>o</sup> CONGRES NATIONAL DE MICROBIOLOGIE ( AFM ), Toulouse 1-4 Avril 1986, France

RAIMBAULT M. et ROUSSOS S.1986.- Production de spores de champignons filamenteux en réacteur à disques rotatifs. IS Cong.Nacion.Microbiol. (AFM),Toulouse 1-4 avril 1986, France.(poster)

C. XVII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS ,Cholula ; Pue. Mexico, 3-6 de Agosto de 1986

CRUZ,C.T., ORIOL,E., GUTIERREZ,M., VINIEGRA,G.. 1986. Preacondicionamiento térmico de harina de yuca (Manihot esculenta) para su enriquecimiento proteínico por fermentación sólida. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Cholula, Pue. 3 - 6 de Agosto 1986

CRUZ,C.T., SAUCEDO,G., GUTIERREZ,M., VINIEGRA,G. 1986. Enriquecimiento proteínico de yuca ensilada. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Cholula, Pue. 3 - 6 de Agosto 1986

ORIOL,E., JIMENEZ,T., OLIVARES,M., GUTIERREZ,M., VINIEGRA,G. 1986. Efecto de la adición de soportes en la fermentación sólida de la raíz de yuca. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Cholula, Pue. 3 - 6 de Agosto 1986.

SAUCEDO,G., GARCIA-OROZCO,J., VINIEGRA,G. 1986. Influencia de la temperatura en el ensilaje de yuca. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Cholula, Pue. 3 - 6 de Agosto 1986.

TREJO M., ORIOL E., LOPEZ A., ROUSSOS S., VINIEGRA, G. 1986. Produccion de pectinasas en medio solido. XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Cholula, Pue. 3-6 de Agosto de 1986.

C. XVII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA ACAPULCO , GRO ; 27-30 de Abril de 1987. TRABAJOS ACEPTADOS.

SAUCEDO CASTANEDA G., GONZALEZ BLANCO P. & G. VINIEGRA GONZALEZ. Optimizacion del tamaño de inóculo en el ensilaje de yuca (Manihot esculenta).

TOMASINI A., BARRIOS J. & G. RODRIGUEZ. Produccion de aflatoxinas en fermentacion solida.

BARRIOS J., AGUILERA A. & C. MARTINEZ. Germinacion de suspensiones concentradas de esporas de A. niger

VINIEGRA GONZALEZ G., CORZO G., HUERTAS S. & M. RAIMBAULT. Analisis de la cinetica de fermentacion solida (FS) de la yuca (Manihot esculenta)

por *Aspergillus niger*.

ORIOLE E., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. y G. VINIEGRA-GONZALEZ. Cultivos de *A. niger* en medio solido con soporte inerte impregnado con medio liquido: influencia de la concentracion de la glucosa y del inoculo.

ORIOLE E., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. y G. VINIEGRA-GONZALEZ. Efecto de mezcla de fibra de bagazo de cana para mejoramiento de la cinetica de crecimiento de *A. niger* sobre harina de yuca en fermentacion solida.

ORIOLE O., CONTRERAS R., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. y G. VINIEGRA-GONZALEZ. Utilizacion de la micro-calorimetria para el estudio del metabolismo de germinacion de esporas de hongos cultivados en medio solido.

BRIZUELA M.A.; RAIMBAULT M., ROUSSOS S. & G. VINIEGRA. Fisiologia de esporulacion de *Aspergillus terreus*.

ROUSSOS S. & A. OLMOS. Produccion de esporas de hongos filamentosos sobre soporte

AQUIAHUATL M.A., OLMOS A., RAIMBAULT M., RODRIGUEZ W., ROUSSOS S. & G. VINIEGRA. Conservacion y viabilidad de esporas de hongos filamentosos

AQUIAHUATL M.A. , RAIMBAULT M. , ROUSSOS S. & Maria del Refugio TREJO. Aislamiento, purificacion y fisiologia de cepas de hongos filamentosos que crecen en extracto de cafe para detoxificar la pulpa de cafe por fermentacion solida.

SERRANO L., GUTIERREZ M., ROUSSOS S. & G. VINIEGRA. Busqueda de nuevas materias primas para la fermentacion en medio solido

LOPEZ ULIBARRI R., CRUZ CORDOBA T., HUERTA OCHOA S. & M. GUTIERREZ ROJAS. Escalamiento del pretratamiento termico de feculas para fermentacion en sustrato solido.

RAMOS AGUILAR I., GONZALEZ CASTILLO O.F. & M. GUTIERREZ ROJAS. Desarrollo de la ingenieria basica de una planta piloto para fermentaciones en sustrato solido.

## II. SEMINAIRES ET COURSES

BARRIOS, J. 1986. Control de la produccion de aflatoxinas en fermentaciones solidas. Sociedad Mexicana de Biotecnologia y Bioingenieria, Palacio de Mineria ; 13 de Enero de 1986.

GUTIERREZ ROJAS, M. 1986. ESCALAMIENTO DE REACTORES BIOLOGICOS. Area de Ingenieria Quimica, Mexico DF, 1 abril 1986.

SAUCEDO, G. 1986. Reactores de fermentacion solida. Departamento de Ingenieria de Procesos e Hidraulica. Area de Ingenieria Quimica. UAM-I ; Mexico DF 30 Julio 1986.

RAIMBAULT, M. 1986. La Biotecnología en Francia. I Muestra Franco-Mexicana de Cooperación Científica y Tecnológica. Museo Tecnológico de la C.F.E. ; Mexico DF 15 - 30 de Abril de 1986.

ROUSSOS, S. 1986. Valorización Biotecnológica de los desechos agrícolas. II Semana Europea de Ciencia, Tecnología y Cultura. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Queretaro ; Queretaro del 3 - 7 de Noviembre de 1986.

VINIEGRA, G et RAIMBAULT, M. 1986. Curso Internacional sobre Fermentaciones en Medio Sólido. Universidad Nacional de la Plata. Centro de Investigación de Fermentaciones Industriales, Argentina. Noviembre.

GUTIERREZ, M. 1986. Fermentación Sólida de las Féculas. Desarrollo Piloto. II Seminario RETADAR y II Encuentro de Resultados del Programa de Alimentos de la OEA, San José de Costa Rica del 2 al 12 de Diciembre.

### III. BREVETS D'INVENTION DEPOSES A L'ANVAR

ORIOLE, E., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., BARRIOS, J., GUTIERREZ, M. & VINIEGRA, G. 1986. Procédé de culture de microorganismes sur supports solides imprégnés, en vue de la production et l'extraction d'enzymes et de métabolites. Demande de Brevet déposée @ l'ANVAR en 1986.

# DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE

por

AQUIAHUATL, M-A., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. y M-R. TREJO

## I. INTRODUCCION GENERAL

### 1. PRODUCCION DE CAFE EN EL MUNDO

- 1.1 Origen del café
- 1.2 Areas cafetaleras
- 1.3 Introducción y cultivo del café en América Latina
- 1.4 El café Mexicano y el mercado Internacional
- 1.5 El cultivo del café y su industrialización
- 1.6 Conclusiones

## II. ANALISIS BIBLIOGRAFICO

### 2.1 Introducción

### 2.2 Cultivo del café

### 2.3 Industrialización del café

### 2.4 Subproductos disponibles :

- . Pulpa del café
- . Cascarella
- . Pajilla
- . Aguas de lavado

### 2.5 Principales compuestos tóxicos de la pulpa del café:

- . Cafeína
- . Fenoles
- . Taninos

### 2.6 Conclusiones

## III. INVESTIGACION DE CAMPO

### 3.1 Industrialización del café en Soconusco, Chis.

### 3.2 Industrialización del café en Jalapa, Ver.

### 3.3 Filmación de la Industrialización del café

#### 3.3.1 En Chiapas (escenario)

#### 3.3.2 En Jalapa (escenario)

### 3.4 Filmación de la valorización biotecnológica de la pulpa



- 3.4.1 Estrategia de recolección de muestras
- 3.4.1 En la UAM - Iztapalapa (escenario)
- 3.4.2 En INIREB
- 3.4.3 En Costa Rica

### 3.5 Conclusiones

## IV. MATERIALES y METODOS

### 4.1 Material de videograbación

- 4.1.1 Manejo de la cámara
- 4.1.2 Manejo de la luz y del sonido
- 4.1.3 Presentación final del documental

### 4.2. Tratamiento de textos y sistemas de computación

### 4.3 Microorganismos

- 4.3.1 Cepas aisladas en nuestro Laboratorio
- 4.3.2 Cepas de colección

### 4.4 Medios de cultivo

- 4.4.1 Aislamiento, purificación y conservación de cepas
- 4.4.2 Descripción e identificación de cepas

### 4.5 Métodos de análisis

- 4.5.1 Crecimiento apical
- 4.5.2 Índice de esporulación

## V. AISLAMIENTO y PURIFICACION DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS

### 5.1 Origen de las muestras

### 5.2 Composición de los medios de cultivo

### 5.3 Condiciones de incubación

### 5.4 Numeración de los microorganismos aislados

- 5.4.1 Principales criterios de purificación:
- 5.4.2 Morfología de las colonias
- 5.4.3 Descripción del micelio
- 5.4.4 Descripción de las formas de reproducción asexual

### 5.5 Cepas puras

### 5.6 Conclusiones

## VI. DESCRIPCION DE LAS CEPAS

- 6.1 Composición de los medios estandar
- 6.2 Condiciones de cultivo
- 6.3 Caracteres morfológicos considerados
  - 6.3.1 Descripción de la colonia
  - 6.3.2 Descripción del micelio
  - 6.3.3 Descripción de las formas de reproducción
- 6.4 Identificación de las cepas
- 6.5 Conclusiones

## VII. SELECCION DE LAS CEPAS

- 7.1 Crecimiento apical
- 7.2 Índice de esporulación
- 7.3 Degradación de cafeína
- 7.4 Producción de biomasa
- 7.5 Cepas seleccionadas
- 7.6 Conclusiones

## VIII. FISILOGIA DE LAS CEPAS QUE DEGRADAN LA CAFEINA EN MEDIO LIQUIDO

- 8.1 Efecto del pH
- 8.2 Efecto de la Temperatura
- 8.3 Efecto de la concentración de cafeína
- 8.4 Efecto de la concentración de azúcar
- 8.5 Determinación del balance C/N
- 8.6 Efecto de sales minerales
- 8.7 Condiciones óptimas de cultivo en medio líquido

## IX. FISILOGIA DEL CRECIMIENTO EN FERMENTACION SOLIDA

- 9.1 Optimización de los siguientes parámetros:

- 9.1.1 Tamaño de la partícula
- 9.1.2 Humedad inicial del sustrato
- 9.1.3 Tamaño del inóculo
- 9.1.4 Temperatura de incubación
- 9.1.5 Composición de la solución mineral
- 9.1.6 Gasto de aire
- 9.1.7 Cinéticas de degradación de la cafeína

- 9.2 Condiciones óptimas para la degradación de la cafeína

en

medio sólido

- 9.3 Conclusiones

## X. ESCALAMIENTO DEL PROCESO- TRÁNSFERENCIA DE RESULTADOS A LA PLANTA PILOTO

- 10.1 Acondicionamiento de las materias primas
  - . Tratamientos físicos
  - . Tratamientos químicos
- 10.2 Producción de esporas en planta piloto
- 10.3 Producción de lotes de 10 a 25 Kg base seca
- 10.4 Estrategias de control de parámetros durante el proceso
- 10.5 Evaluación de la productividad del proceso. Balances de materia y energía
- 10.6 Estudios técnico económicos. Factibilidad del proceso
- 10.7 Evaluación nutricional del producto final
- 10.8 Elaboración de manuales del proceso y control de calidad de materias primas, producto en proceso y final
- 10.9 Conclusiones

## XI. CONCLUSIONES GENERALES

## XII. BIBLIOGRAFIA

Reporte de actividades de Maria del Refugio Trejo Hernandez del primero de Noviembre de 1986 al 30 de Enero de 1987

## DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE

### 1. ANALISIS BIBLIOGRAFICO

#### 1.1 INTRODUCCION

La mayoría de los subproductos agro-Industriales presentan alternativas viables para su utilización en la alimentación animal. Sin embargo, hay evidencias de que no todos son aprovechados debido a que contienen compuestos difíciles de degradar y en muchos de los casos, estos compuestos son tóxicos, por lo que su aprovechamiento se reduce notablemente.

La fermentación sólida representa una opción muy interesante en la reutilización de estos desechos, así como en la eliminación de la toxicidad, mediante el uso de microorganismos que presenten la capacidad de metabolizar estos compuestos. Entre los residuos interesantes se están la pulpa de café, la harina de algodón, el frijol mexicano, etc.

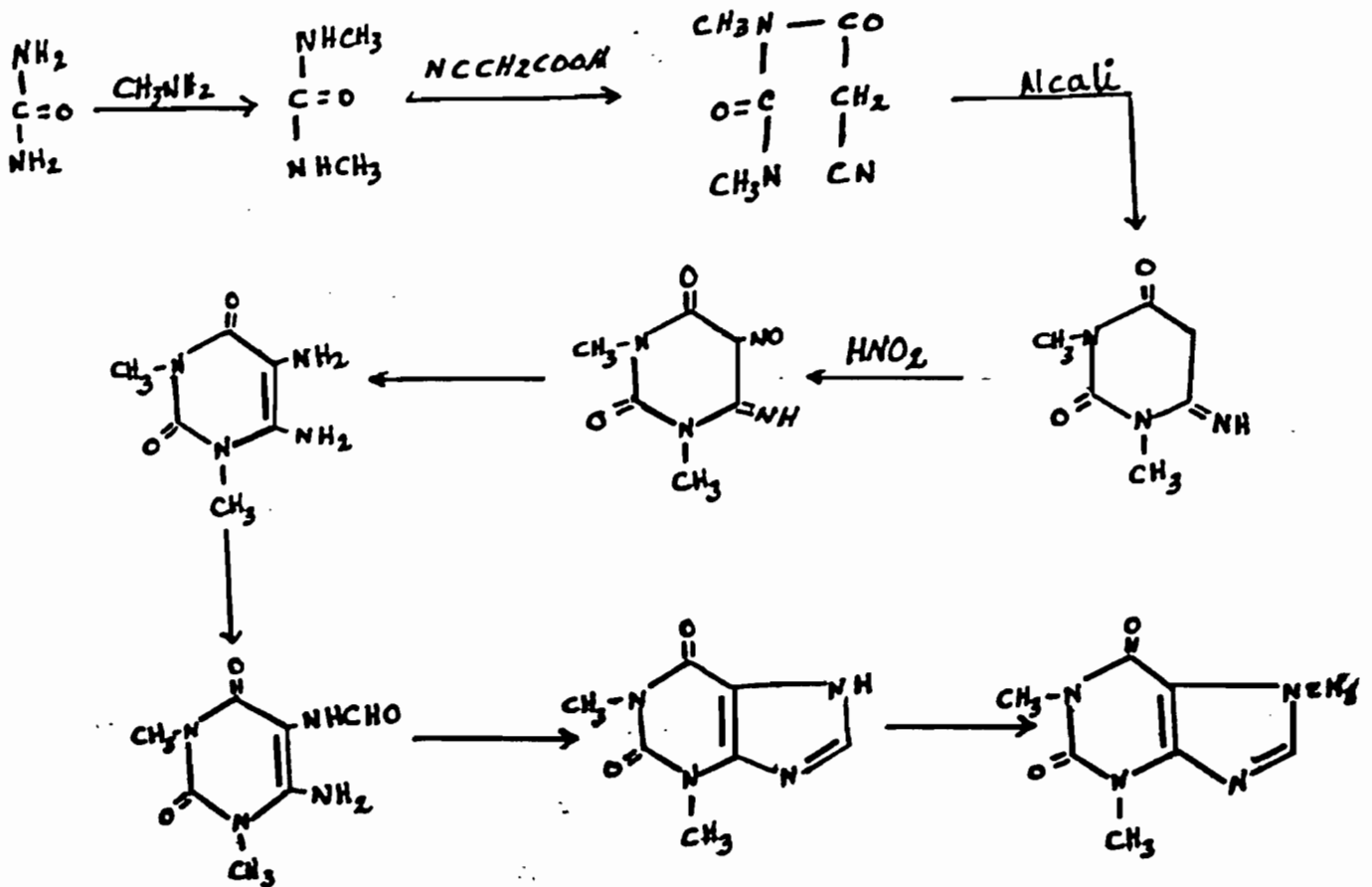
En estudios reportados con anterioridad se encontraron microorganismos que presentan habilidad para descomponer compuestos orgánicos complejos y que tienen importancia práctica, ya que pueden ser utilizados como un método biológico de degradación. Como es el caso de los compuestos lignocelulósicos que son degradados por microorganismos aislados de diferentes fuentes: suelo, madera, frutas, etc., que son posteriormente utilizados en la fermentación sólida de salvado de trigo y virutas de madera, (Golovlev, 1966)

La problemática actual de contaminación por desperdicios de diversos procesos agro-Industriales ha provocado el desarrollo de una gran cantidad de estudios sobre el aprovechamiento de estos. Una área importante y que presenta este tipo de problemas es la del procesamiento del café, en la que los desechos incluyen aguas residuales y desechos sólidos, como la pulpa de café, (Adams, 1981).

Table 1 Summary of chemical and physical treatments given to coffee pulp.

| Type of pulp             | Treatment  | Results   | References  |
|--------------------------|--|---|---|
| Whole, fresh and ensiled | Ca(OH) <sub>2</sub><br>Immersion: 1, 2, & 3% sol. (solid/solvent = 1/2.5)<br>Contact: add. of 1, 2, & 3% Ca(OH) <sub>2</sub> to fresh pulp<br>Treatment time: 0 & 16 h<br>Dehydration: sun   | As the conc. of Ca(OH) <sub>2</sub> increased, dehydration time, ether extract, crude fibre, protein, and tannins decreased<br>Biological tests with rats showed no increase in nutritive value of pulp | Tables 1-5<br>Bendaña 1977<br>Gómez Brenes et al 1977                                   |
| Whole, fresh             | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub><br>Contact: Add. of 0.5, 1.0, 1.5, 2% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub><br>Dehydration: sun and drum<br>Contact: Add. of 0.025, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | Crude fibre, nitrogen, cellular walls, cellulose, lignin, and lignified protein decreased, ash, nitrogen-free extract, cellular content, and tannins increased<br>Same results as above                 | Tables 6-8<br>Bressani 1974<br>Murillo et al. 1977<br>Jarquín et al. 1976<br>Solis 1977 |
| Whole, fresh             | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub><br>Immersion: Add. of 0.025, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5% sol. (solid/solvent = 1 kg/litre)<br>Treatment time: 20 min<br>Dehydration: sun  | Increase in chlorogenic and caffeic acids<br>Increase in caffeine content of pulp was greater when treated by contact with Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>                                | Jarquín et al. 1976<br>Solis 1977   |
| Ground, sun dried        | Water<br>Percolation: 94 °C (solid/solvent = 1/20)<br>Extraction: 25 °C  | Ether extract and crude fibre increased, protein, ash, caffeine, tannins, chlorogenic and caffeic acids, and total soluble sugars decreased   | Table 9 Fig. 1<br>Molina et al. 1974, 1976<br>Cuevas 1976                               |
| Ground, sun dried        | NaOH<br>Immersion: 2.5, 5.5, & 7.5% NaOH (solid/solvent = 1/1)<br>Treatment time: 24 h, neutralized after treatment with 0.2 N HCl<br>Dehydration: oven at 50 °C for 24 h  | Ash, lignified nitrogen, cellular walls, hemicellulose, and lignin increased, soluble carbohydrates, tannins, and in vitro dry-matter digestibility decreased   | Table 12<br>Egaña et al. 1977   |
| Whole, sun dried         | Ground<br>Ground and extrusion<br>Ground and 5.5% NaOH<br>Ground, extrusion, and 5.5% NaOH   | Biological evaluation with rats showed no statistical differences among the treatments  | Egaña et al. 1977   |

# SINTESIS DE CAFEINA

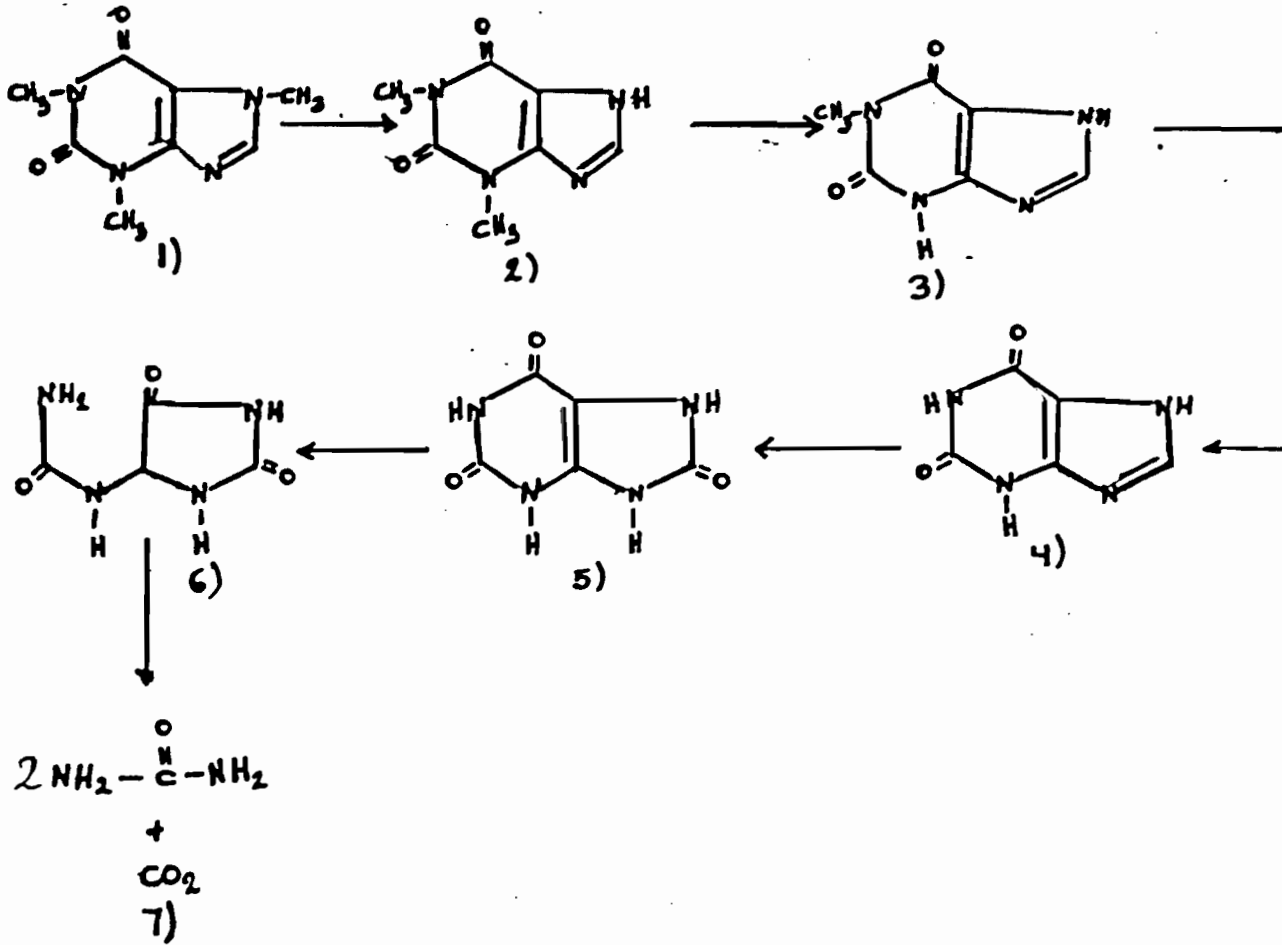


**CAFEINA**  
 (1,3,7 trimetil xantina)  
 PM = 194.20 g/mol

Ref. (Martin and Cook, 1956)

FIG. 1

# A).- DEGRADACION DE CAFEINA



1).- Cafeína

2).- Teofilina

3).- 1 Metil Xantina

4).- Xantina

5).- Acido úrico

6).- Acido alantoico

7).- Urea y dióxido de carbono

\* B).- OTRA PROBABLE RUTA DE DEGRADACION ES LA SIGUIENTE:



Ref. (Martin and Cook, 1956)

\* Ref. (Franke W. y Hahn, G. E. 1955)

FIG. 2

En una primera etapa, el interés se ha enfocado al problema de aprovechamiento de la pulpa de café. El número de sustancias con posible actividad antifisiológica en esta, no han sido determinadas, pero sobre la base del análisis químico de los granos de café, algunos han sido estudiados para determinar su correlación con los efectos observados en animales, Quazi et al., 1984. Esto incluye (a) la cafeína; (b) los fenoles libres o monoméricos, ácidos clorogénico, cafelco y tánico; y (c) los fenoles poliméricos, los taninos hidrolizables y los condensados.

## 1.2 CAFEINA

La cafeína es el componente tóxico más importante de la pulpa de café, es una purina metilada, comúnmente llamada metilxantina, (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, PM= 194.20 g mol.). Su estructura se representa en la fig.1.

La cafeína en la pulpa de café secada al sol se presenta en concentraciones que varían de 0.6 al 1.2 %; el ácido clorogénico, (0.18 a 3.16 %); ácido cafelco o ácido 3, 4-dihidrocinnámico, (0.28 a 2.58 %; y ácido tánico o digalico, (2.30 a 5.56 %), (Bressani, et. al., 1978).

Los factores que parecen ser importantes en relación con la pulpa de café y sus efectos observados en animales son: (1) la concentración relativamente alta de nitrógeno en la cafeína; (2) su actividad estimulante; y su efecto diurético. La cafeína contiene 26.38 % de N y es encontrada en un promedio de 1.0 % en pulpa deshidratada. Esto indica que el nitrógeno de la cafeína se presenta en cantidades aproximadas de 0.26 %, que es equivalente al valor de proteína cruda de 1.6 %. Se ha reportado que la pulpa de café contiene un promedio de 11 % de proteína cruda, de esto alrededor del 15 % es el N de la cafeína. (Bressani et. al., 1978).

El papel de los fenoles libres y taninos, no está definido, pero existen evidencias de su efecto en la utilización de los nutrientes en la pulpa de café. (Flores Recinos, 1973,1976), (Somogyi, 1969, 1976), entre otros.

Grandes esfuerzos se han realizado para eliminar estos compuestos antifisiológicos, tanto por métodos químicos como físicos, Tabla 1., (Brenes,1978). Los métodos biológicos han sido poco estudiados. Sin embargo los estudios encontrados en la revisión bibliográfica son muy interesantes, ya que reportan microorganismos capaces de metabolizar o degradar la cafeína y algunos polifenoles.

Fusarium oxysporum aparentemente resiste la toxicidad y crece con una baja concentración de cafeína, (Wolf, 1955). Por otra parte, Pseudomonas aeruginosa involucra en su metabolismo un sistema enzimático para la oxidación de metil purinas, parece tener xantina dehidrogenasa y urlicasa, enzimas con alta especificidad para degradar metilxantinas a metil alantoinas, (Franke and Hahn, 1955 y Bergmann et al., 1962).



En estudios realizados por Kurtzman y Schwimmer, (1972), han considerado los métodos biológicos como alternativas de extracción de la cafeína del café. Los autores muestran que la cafeína puede ser utilizada como única fuente de carbono o de nitrógeno, por el crecimiento de una bacteria, Bacillus coagulans y 2 hongos, Penicillium roqueforti y especies de Stemphyllum, estos microorganismos fueron aislados del aire, manejando concentraciones de cafeína y sacarosa de 0.01 y 0.08 M respectivamente. La disminución de cafeína por el crecimiento de Stemphyllum, se llevó a cabo en un medio conteniendo concentraciones de 0.001 M de cafeína, 0.088 M de sacarosa, 0.024 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y sales de Hoagland's, (reemplazando Cloruros por nitratos), fig. 3.

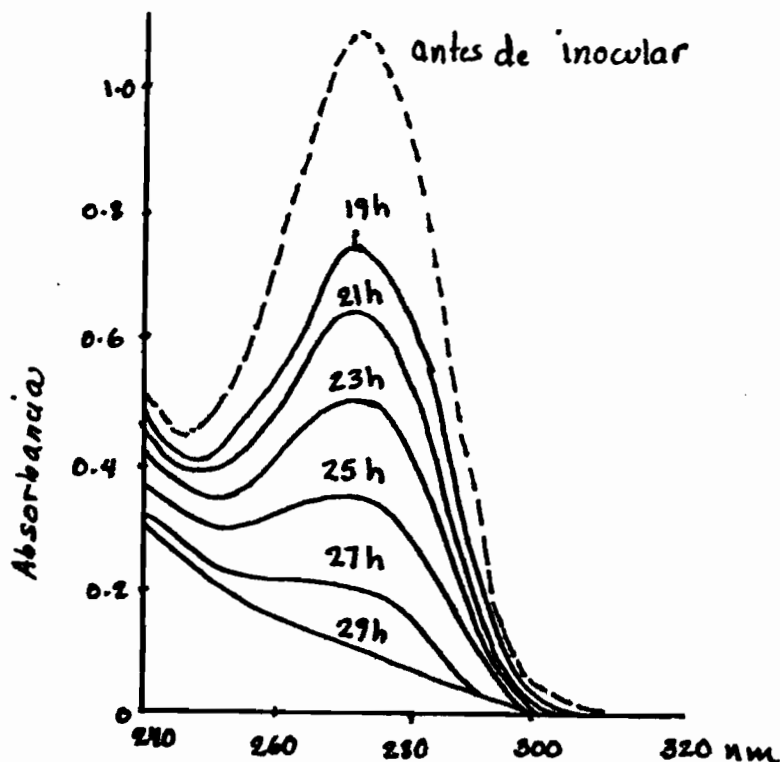


FIG. 3.

Desaparición de cafeína por el crecimiento de Stemphyllum.

Se reportaron resultados obtenidos sobre el crecimiento de los hongos Stemphyllum y P. roqueforti sobre cafeína a 20 por 10 días. Donde la concentración de cafeína se varió desde 0.01 a 0.1 M y nitratos una concentración de 0.03 M. Se observa crecimiento hasta una concentración de 0.04 M de cafeína para ambos hongos, este de 217 y 279 mg de biomasa/50 ml. El mayor crecimiento se obtuvo a una concentración de 0.01 M de cafeína, el cual es similar al crecimiento sobre 0.03 M de nitratos con 449 mg de biomasa/50ml de medio.

Dentro de este mismo estudio se determinó la disminución de las metil xantinas (xantina, cafeína y teobromina, en una concentración de 0.01 M). La cafeína es eficientemente consumida por P. roqueforti y por Stemphyllum en 13.3 y 11.9 micromoles/h/50 ml respectivamente.

Schwimmer et al., (1971), continuaron el estudio de decafeinización del café con Penicillium roqueforti, siendo este el microorganismo mas prometedor de los anteriores. El metabolismo de metil xantinas como la cafeína en los microorganismos parece involucrar alguna oxidación directa a metil alantoinas, (Franke y hahns, 1955) o una demetilación seguida de una dehidrogenación a

ácido úrico, el cual es más adelante metabolizado a allantoinas, de ahí a ácido alantóico y finalmente a urea y dióxido de carbono.

Las reacciones bioquímicas involucradas y los compuestos intermedios en la degradación de la cafeína podrían ser los de la figura 2b.

Schwimmer et al., 1971, identifican el producto de la primera transformación de la cafeína, mediante el uso de carbono 14 (1-metil-<sup>14</sup>C) de la cafeína. La primera etapa en degradación de la cafeína por el metabolismo de P. roqueforti es una demetilación en la posición 7 de la purina. El metabolito intermedio de esta degradación es la teofilina.

En estudios sobre la decafeinización de infusiones de café, por P. crustosum cepa NRRL 5452, Schwimmer et al., (1972) han observado la influencia de la concentración de azúcar y del pH, la presencia de un amortiguador y las condiciones de cultivo en la velocidad de degradación de la cafeína. El contenido inicial de esta en las infusiones varía de 0.45-0.59 mg/ml = (0.0023 - 0.003038 M).

La cafeína presente en el medio disminuye en un 50 % a 12 horas de incubación en ausencia de azúcar por P. crustosum. Sin embargo la presencia de sacarosa o glucosa (.003 M y 0.06 M respectivamente), durante las primeras fases del crecimiento, estimula la degradación de la cafeína en 15 horas encontrando hasta un 1 a 6 % remanente de esta. El pH óptimo para la decafeinización fue a 4.8 en 24 horas de incubación. Por otro lado el efecto de los amortiguadores disminuye cuando la sacarosa está presente en el medio.

Fermentaciones a escalas mayores no decrece la eficiencia de la utilización de la cafeína, en la tabla 2, se muestran fermentaciones de los extractos de café y medio sintético a mayor escala.

Tabla 2. Fermentacion de cafe a mayor escala.

| no. de medio                           | A          | B          | C          | D          | E      |
|--|------------|------------|------------|------------|--------|
| Volumen, (lts)                         | 0.05       | 4          | 6          | 10         | 4      |
| Sacarosa (%)                           | 1          | 2          | 3          | 1          | 3      |
| Cafeina mg/ml<br>Inicial               | 0.46       | 0.60       | 0.91       | 1.65       | 2.0    |
| pH final<br>(dias)                     | 5.3<br>(1) | 7.3<br>(3) | 6.7<br>(4) | 7.5<br>(6) | -<br>- |
| Velocidad<br>max.mg cafe-<br>na/ml/dia | 0.24       | 0.25       | 0.27       | 0.28       | 0.28   |

(Schwimmer, 1972)

Medios de cultivo con diferente concentracion de cafeina: A, Infusion de cafe; B, cafe soluble; C, cafe soluble; D, Infusion de cafe; E, medio sintetico.

donde se observa una velocidad de consumo de cafeina similar entre el medio sintetico con 2 mg/ml de cafeina Inicial y medio de Infusion de cafe con 1.65 mg/ml de cafeina. El pH fue mas alto en este experimento.

### 1.3. FENOLES

Por otra parte, los polifenoles y los taninos son compuestos toxicos importantes de considerar en la pulpa de cafe. Dentro de esta revision se ha encontrado que algunos microorganismos de la microflora del suelo, presentan habilidad para degradar fenoles libres como el acido firulico, (Black, 1976; Mishustin, 1966). Estos trabajos son interesantes, ya que utilizan los compuestos fenolicos como fuente de carbono, lo que implica su degradacion casi completa. Los microorganismos aislados que son capaces de degradar el acido firulico son del genero de Penicillium principalmente; P. janthinellum, P. spinulosum, P. funiculosum, otros como Fusarium oxysporum, Stemphylium dendriticum, Trichoderma viride, tambien presentan alta capacidad de descomposicion, la

concentracion utilizada fue de 100 mg/l con inoculo de 2 a  $6.10^5$  esporas/ml incubado a 25°C .

La degradacion de compuestos aromaticos ha sido muy estudiada. Levaduras aisladas del suelo utilizan compuestos fenolicos. Shoda et al., (1980), describen el aislamiento de microorganismos que utilizan fenol. Los medios de aislamiento contenian concentraciones de 0.25 a 1 g/l, consumen fenol como unica fuente de carbono o con glucosa.

Una de las cepas aisladas identificada como Trichosporum cutaneum, sintetiza una enzima constitutiva, la catecol-1-2-oxigenasa que tiene preferentemente el fenol a la glucosa. el crecimiento de esta cepa en un medio con 0.10 % de glucosa y 200 ppm de fenol, presenta un consumo inicial de fenol, el consumo de glucosa es mas rapido cuando la concentracion de fenol es de 10 a 20 ppm en el medio siendo la velocidad de consumo de 0.1015 micromoles de fenol/min/D.O. y la actividad de la enzima de 4.54 U/mg de proteina inducida por fenol.

Otros estudios se han reportado en relacion a la degradacion de compuestos fenolicos por microorganismos del suelo, principalmente levaduras, eumycetes y algunos hongos. Itoh et al., (1980). Los autores reportan un grupo de levaduras y hongos que utilizan p- y m-Isomeros de cresol y monohidribenzoato. La cepa mas interesante aislada fue identificada como Aureobasidium pullulans, crece en medios conteniendo isomeros de cresol en una concentracion de 108 microgramos/ml. Esta cepa se desarrolla en un medio conteniendo o-cresol en un rango de concentracion de 90 a 608 microgramos/ml.

Takahashi et al., 1981, realiza un estudio de indentificacion taxonomica de Aureobasidium pullulans, que utiliza fenol y o-cresol. El fenol es rapidamente degradado en concentraciones de 0.1 %, por lo que consideran que puede ser eficientemente utilizado en el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de compuestos fenolicos.

#### 1.4. CONCLUSIONES

De acuerdo al analisis bibliografico realizado, se puede concluir que existen evidencias, aunque no recientes, sobre la degradacion biologica de la cafeina. Los microorganismos reportados fueron aislados de fuentes tales como el suelo, frutos de cafe y del aire.

El medio de crecimiento es en algunos casos un medio sintetico con cafeina, sacarosa y sales; en otros, es solamente infusiones de cafe con o sin sacarosa. Las concentraciones de utilizacion de la cafeina varian de 0.01 a 0.10 M.

Esto permite pensar en la posibilidad de aplicar la informacion recopilada, para probar la detoxificacion de la pulpa de cafe, siguiendo primero una estrategia de seleccion de los microorganismos con mayor capacidad de degradacion de los compuestos toxicos presentes y posteriormente su aplicacion en la pulpa de cafe con base a la tecnica de cultivo en medio solido.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams M. R., and Dougan J. (1981). "Biological management of coffee processing". Trop. Sci., 23 (3), 178-196.
- Bergmann F., Ungar-Waronh., Kwletny-Govrin H., Goldberg H. and Leon S. (1962). "Some specific reactions of the purine-oxidizing system of *Pseudomonas aeruginosa*". Bioch. Biophys. Acta., 55, 512-522.
- Black R. L. B. and Dix N. J. (1976). "Utilization of ferulic acid by microfungi from litter and soil". Trans. Br. Mycol. Soc., 66 (2), 313-317.
- Bresani R., (1978). " Factores antifisiológicos de la pulpa de café". En: Braham, J. E. y Bresani R. eds. Pulpa de café; composición, Tecnología y Utilización. (Ottawa, Canada, International Development Research Centre), pp 143-152.
- Franke W. and Hahn G. E. (1955). Physiol. Chem., 301, 90.
- Gomez Brenes, R. (1978). " Procesamiento de la pulpa de café; Tratamientos químicos". En: Braham, J.E. y Bresani R. eds. Pulpa de café; Composición, Tecnología y Utilización. ( Ottawa, Canada, International development Research Centre), pp 125-142.
- Golovlev E. L., Chermenski D. N., Okunev O. N., Brustavetskaya T. P., Golovleva L. A. and Skryabin G. k. (1983). "Selection of fungal cultures for solid -phase fermentation of sawdust and straw". Microbiol., Vol.2 (1) ; 65-68
- Itoh M., Takahashi S., Iritani M. and Kaneko Y., (1980). "Degradation of three isomers of cresol and monohydroxybenzoate by eumycetes". Agric. Biol. Chem., 44, (5), 1037-1042.
- Kurtzman R. H. and Schwimmer S. (1971). "Caffeine removal from growth media by microorganisms". Experientia, 27 (4), 481-482.
- Mishustin E. N. and Erofeev N. S. (1966). "Nature of the toxic compounds accumulating during the decomposition of straw in soil. Microbiology., 35 (1), 126-129.
- Schwimmer S., Kurtzman Jr. and Heftmann E. (1971). "Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*". Arch. Biochem. Biophysics., 147, 109-113.
- Schwimmer S. and Kurtzman R. H. Jr. (1972). "Fungal decaffeination of roast coffee infusions". J. Food Science, 37, 921-923.
- Shoda M., Maruta K. and Udaka S. (1980). "Isolation and properties of phenol utilizing microorganisms with special reference to catechol 1, 2-oxigenase". Agric. Biol. Chem., 44 (8), 1841-1846
- Takahashi S., Itoh M., Tsubaki K. and Kaneko Y. (1981). "Taxonomical identification of phenol-and-o-cresol-assimilating fungus *Aurebasidium pullulans* and its growth characteristics in

phenol medium with methanol or formaldehyde". Agric. Biol. Chem.,  
45 (8), 1809-1815.

Yuroskaya E. M. and Yaroshenko V. A. (1965). "Selection of  
microorganisms for the oxidation of certain toxic components of  
sewage of gas-generating stations. Microbiology, 34 (3), 434-437.

Expert Panel on Food Safety & Nutrition. (1983). Fermt. Technol.,  
37 (4), 87-91.

Wolf, F. T. (1955). Bull. Torrey Bot. Club, 82, 342.