

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FERMENTACIÓN DE PULPA DE CAFÉ CON
Penicillium commune A NIVEL LABORATORIO
Y SEMI-PILOTO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

JOSÉ ISAÍAS NAVA VILLAGÓMEZ

DIRECTOR
DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

ASESORES:
DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

DICIEMBRE DE 2003

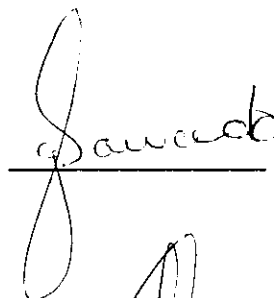
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

José Isaías Nava Villagómez

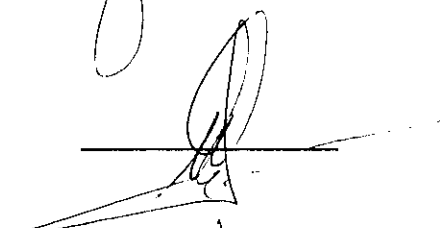
El día 15 de diciembre de 2003

Comité tutorial

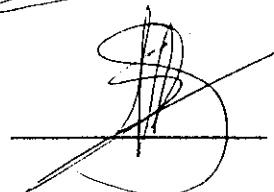
Director: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana



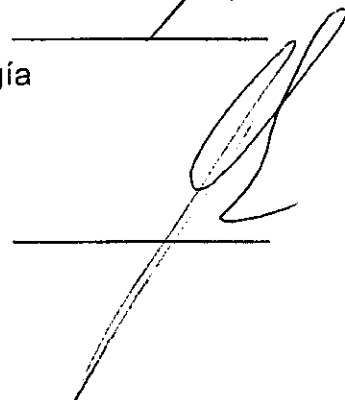
Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dr. Enrique Durán Páramo
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología



Sinodal: Dr. Gustavo F. Gutiérrez López
Escuela nacional de Ciencias Biológicas



La maestría en Biotecnología está incluida en el padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT, y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-O/Maestría en Biotecnología.**

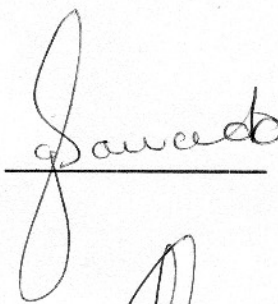
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

José Isaías Nava Villagómez

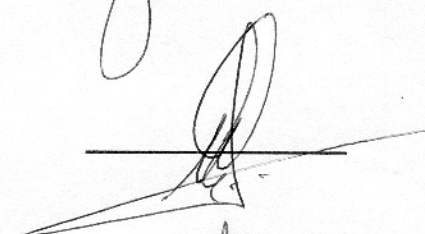
El día 15 de diciembre de 2003

Comité tutorial

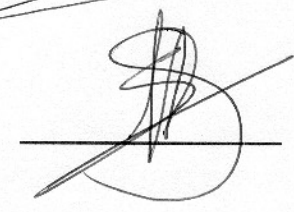
Director: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana




Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana



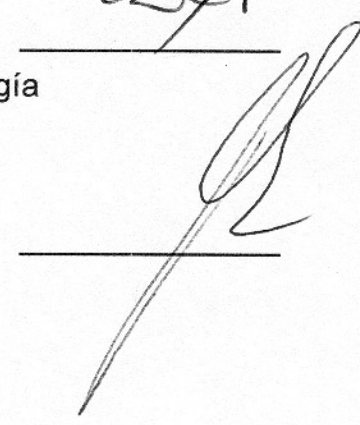
Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dr. Enrique Durán Páramo
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología



Sinodal: Dr. Gustavo F. Gutiérrez López
Escuela nacional de Ciencias Biológicas



AGRADECIMIENTOS:

A los doctores Gerardo Saucedo, Ernesto Favela y Sergio Huerta por su apoyo en la dirección de este trabajo y por darme la oportunidad de trabajar en la Planta Piloto 4.

A toda la gente que ha estado y está en la Planta Piloto 4.

A mis super jefes: Carmen y Roberto, y a mis hermanos.

RESUMEN

Se evaluó las condiciones ambientales y el pre-tratamiento de pulpa de café para su fermentación en medio sólido con *Penicillium commune* a nivel semi-piloto.

El reactor semi-piloto utilizado tiene una capacidad máxima de aproximadamente 26 Kg de pulpa húmeda. Cuenta con un sistema interno de mezclado formado por dos listones helicoidales. Las condiciones ambientales estudiadas fueron: humedad inicial, tamaño del inóculo y temperatura. También se estudió el efecto del pre-tratamiento térmico del sustrato, expresado como la energía recibida por Kg de pulpa. La producción de CO₂ se utilizó como medición indirecta del crecimiento y el pH final como indicador de la degradación de cafeína. Se realizaron fermentaciones en el reactor semi-piloto con el siguiente intervalo de condiciones ambientales: humedad, 62.1-71.3%; tamaño del inóculo, 2.9 X10⁶ - 9.2 X10⁶ esporas por g de materia húmeda inicial; y temperatura inicial, 30-33 °C. La pulpa recibió un tratamiento térmico de 5519-9597 KJ/Kg. Cuando estas condiciones se evaluaron en el reactor semi-piloto se favoreció preferentemente el crecimiento de la microflora original (principalmente *Aspergillus*) sobre el crecimiento de la cepa de *Penicillium*. Para superarlo se estudiaron estas condiciones ambientales a nivel laboratorio (columnas de fermentación de 100 g). Los valores seleccionados son los siguientes: humedad inicial 65%, concentración del inóculo 1X10⁷ esporas/g materia húmeda inicial y temperatura de incubación de 25 °C. Los resultados sugieren que el tratamiento térmico no debe exceder un valor de 1272 KJ/Kg de pulpa, para evitar la inhibición del crecimiento de *Penicillium commune*. La temperatura óptima de ger-

minación de las esporas de *Penicillium commune* es 25 °C. Sin embargo, para el crecimiento del micelio se obtuvo 33.6 °C como temperatura óptima.

La segunda selección de condiciones ambientales permitió realizar fermentaciones a nivel semi-piloto sin presencia de contaminaciones. Se observó una alcalinización de la pulpa lo que sugiere la degradación de cafeína por parte del microorganismo. Los resultados obtenidos en fermentación estática indican un mejor crecimiento comparado con el obtenido a nivel laboratorio. El mezclado de los sólidos, después de la germinación de las esporas, redujo la temperatura de la pulpa y la producción de CO₂. De esta forma, el estudio de la fermentación a nivel laboratorio permitió superar los problemas encontrados a nivel semi-piloto.

A B S T R A C T

The environmental conditions and the pretreatment of coffee pulp for solid-state *Penicillium commune* fermentation at semi-pilot scale were studied.

The semi-pilot reactor used had a capacity of nearly 26 Kg of wet pulp, and an internal mixing system consisted of two helicoidal ribbons. The environmental conditions studied were: initial moisture, inoculum size and temperature. The effect of thermal pretreatment of substrate, expressed in terms of received energy per kg of wet pulp was also studied. The CO₂ production was the indirect measure of growth and final pH was the indicator of caffeine degradation. The following conditions were tested in semi-pilot reactor: moisture, 62.1-71.3%; inoculum size, 2.9 x10⁶-9.2 x10⁶ spores/g initial wet pulp; and initial temperature, 30-33 °C. The coffee pulp received 5519-9597 KJ/Kg wet pulp as thermal treatment. Under these conditions the fermentations showed preferential growth of natural microflora (mainly *Aspergillus*) over *Penicillium* growth.

Therefore, it was decided to study the environmental conditions at laboratory scale (fermentation columns of 100 g wet pulp). The chosen values are: initial moisture 65%. inoculum size, 1x10⁷ spores/g initial wet pulp and initial temperature 25 °C. The results suggest that thermal treatment must not exceed 1272 KJ/Kg wet pulp in order to favor the *Penicillium* strain growth. A germination optimum temperature equal to 25 °C and a mycelium growth optimum temperature of 33.6 °C were estimated. In semi-pilot scale, the selection of appropriate environmental conditions resulted in fermenta-

tions without *Aspergillus* growth. The alkaline final pH observed suggests caffeine degradation. The results of static fermentation suggest better growth at semi-pilot level than obtained at laboratory level. The solid mixing after germination reduces the bed temperature and the production of CO₂.

INDICE

1.	Introducción	1
2.	Revisión bibliográfica	4
2.1	Pulpa de café	4
2.2	Descafeinización de pulpa de café	7
2.3	Variables ambientales de la fermentación en medio sólido	10
	2.3.1 Humedad inicial	12
	2.3.2 Tratamiento térmico del sustrato	14
	2.3.3 Concentración del inóculo	16
	2.3.4 Temperatura de incubación	17
2.4	Escalamiento de los procesos de fermentación en medio sólido	19
	2.4.1 Método de escalamiento descendente	21
	2.4.2 Reactores con mezclado	22
3.	Objetivos	25
	3.1 Objetivo general	25
	3.2 Objetivos particulares	25
4.	Materiales y métodos	26
4.1	Microorganismo y preparación del inóculo	26
4.2	Sustrato y su tratamiento térmico	27
4.3	Reactor a nivel piloto	29
4.4	Fermentación en medio sólido	32
4.5	Métodos analíticos	35

INDICE

4.5.1 Humedad	35
4.5.2 pH	35
4.5.3 Concentración de esporas	35
4.5.4 Medición de CO ₂ y determinación de los parámetros cinéticos	36
4.5.5 Estimación de temperatura de la pulpa a nivel semi-piloto	37
5. Resultados y discusión	41
5.1 Estudios preliminares a nivel semi-piloto (10 Kg)	41
5.1.1 Fermentación de la pulpa de café a nivel semi-piloto	42
5.1.2 Efecto del tratamiento térmico	45
5.2 Efecto de las condiciones ambientales a nivel laboratorio	49
5.2.1 Efecto de la humedad	49
5.2.2 Efecto del tratamiento térmico del sustrato	53
5.2.3 Efecto de la concentración del inóculo	58
5.2.4 Efecto de la temperatura	61
5.3 Estudios a nivel semi-piloto	67
6. Conclusión	74
7. Bibliografía	75
8. Anexo	86
8.1 Nomenclatura	86
8.2 Cálculo de la energía recibida durante el tratamiento térmico	89

1. INTRODUCCIÓN

La producción estimada de pulpa de café, un subproducto del procesamiento húmedo de las cerezas de café, en México durante la cosecha 2000-2001 fue de 182 mil toneladas. La pulpa de café es rica en nutrientes pero también contiene compuestos como la cafeína, los taninos y los polifenoles. La presencia de dichos compuestos impide el uso intensivo de este subproducto en la alimentación animal por sus características antinutricionales y antifisiológicas. Por lo cual, su alta producción representa un serio problema de contaminación en las regiones procesadoras del fruto de café.

La fermentación en medio sólido está definida como el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en presencia de pequeñas cantidades de agua libre. Este tipo de fermentación es atractiva porque simula la forma de vida natural de muchos microorganismos y por su simplicidad. Sin embargo, se han encontrado problemas en el control de los distintos parámetros durante el proceso y en su escalamiento; ambos necesarios para la aplicación industrial.

La fermentación en medio sólido puede llevarse a cabo en charolas o lechos empacados. También puede realizarse en reactores en donde los sólidos son mezclados mecánicamente.

La fermentación en medio sólido ha sido empleada para la descafeinización de la pulpa de café como una alternativa a los métodos de extracción de cafeína empleados tradicionalmente en el grano de café. Se ha demostrado que el hongo *Penicillium commune* es capaz de degradar la cafeína presente en la pulpa cuando crece en fermentaciones líquidas o sólidas. Se ha trabajado a nivel laboratorio en reactores de columna empacada y charolas. Sin embargo, no se ha estudiado el escalamiento del proceso en reactores con mezclado a niveles superiores al laboratorio.

El presente trabajo describe el estudio de parámetros ambientales para la fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio y su posterior aplicación a nivel semi-piloto.

El capítulo siguiente presenta una revisión de la literatura científica relacionada con la investigación para la descafeinización de la pulpa de café, centrada en el empleo de la fermentación en medio sólido. Las condiciones ambientales que influyen en el desarrollo de la misma y el uso de reactores para la realización de dicha fermentación. Así también se incluye el escalamiento de los procesos de fermentación. De esta revisión surgen los objetivos planteados para el trabajo. Posteriormente, se incluye la descripción del microorganismo, del sustrato, del sistema de fermentación y de la metodología empleada para la medición de las variables. El cuarto capítulo también incluye la descripción de las fermentaciones a nivel semi-piloto. Así como la estrategia a nivel semi-piloto para el estudio de los parámetros ambientales de la fermentación.

Los resultados y discusión del trabajo experimental se han dividido en tres secciones principales: estudios preliminares a nivel semi-piloto, efecto de las condiciones ambientales a nivel laboratorio y estudios a nivel semi-piloto. Para finalizar, el sexto capítulo incluye las conclusiones del trabajo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este trabajo se utilizó pulpa de café como sustrato de la fermentación en medio sólido. A continuación se presenta una breve descripción de las propiedades de este sub-producto agrícola. Además, se mencionan sus limitantes y los métodos utilizados para su aprovechamiento. Posteriormente, se presenta la descripción de la fermentación en medio sólido y algunas de las variables que influyen en este proceso. Finalmente, se presenta información sobre las técnicas de escalamiento y sobre algunos reactores empleados para este tipo de fermentación.

2.1 Pulpa de café

La planta del café pertenece a la familia de las Rubiáceas, que tiene más de 70 especies, 7 de ellas con importancia comercial significativa. Las especies cultivadas comercialmente son arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*). La producción de café es una actividad económicamente importante en algunos países latinoamericanos, incluyendo México. La Organización Internacional del Café (ICO) reportó que en México se produjeron 6.2 millones de sacos de café durante la cosecha 2000-2001.

El objetivo del procesamiento industrial de las cerezas del café es llegar a obtener el grano comercial. En general, el procesamiento consiste en una serie de operaciones que eliminan las capas que rodean el grano. Existen dos métodos para el procesamiento: el seco y el húmedo. El método seco es el más simple, tanto tecnológicamente como en cuanto a problemas de residuos generados. Después de la cosecha las cerezas son secadas a una humedad de hasta 10-11% y todas las capas de material que cubren el grano son removidas simultáneamente. A este residuo se le conoce como cáscara (Adams y Dougan, 1987). El método húmedo consiste en la remoción de la pulpa (exocarpio y la mayoría del mesocarpio) en presencia de agua. Los granos obtenidos en esta forma están rodeados de una capa de material mucilaginoso de 0.5 a 2 mm de espesor, que debe ser removida para facilitar el secado. Esto se logra por medio de una fermentación en la que los microorganismos disuelven la pectina del mucílago. El grano libre de mucílago es secado hasta una humedad de 12%. Posteriormente, el pergamino (endocarpio) y la película plateada (testa) son removidos. Así se obtiene el grano de café que ya puede ser tostado y molido (Adams y Dougan, 1987; Avallone y col., 2001)

Las hojas del cafeto colectadas durante la cosecha, generalmente no son consideradas residuo, pero crean dificultad en la manipulación de la fruta. Además, después de la preparación de la infusión de café se genera otro sólido, el residuo de extracción. Así, sólo se utiliza el 6% de las cerezas frescas, mientras el 94% restante está constituido por los subproductos: 39% pulpa, 22% mucílago, 3% pergamino, 9.8% residuo de extracción y 20.4% agua y compuestos volátiles (Zuluaga, 1989).

La pulpa de café es considerada el mayor agente contaminante de los ríos y lagos

localizados cerca de las regiones procesadoras de café de Latinoamérica. En base a los datos de la ICO sobre la cosecha 2000-01, y considerando el balance de Zuluaga (1989), en México se produjeron, en ese período, al menos 137 000 toneladas de sólidos secos de pulpa de café.

La Tabla 2.1 muestra la composición del residuo más importante de cada tipo de procesamiento. Puede existir diferencia en la composición porcentual, según la eficiencia del método usado, la variedad del fruto, las condiciones del cultivo, etc.

Tabla 2.1 Composición de los principales subproductos del procesamiento del café (Pandey y col., 2000).

Componente	Pulpa	Cáscara
	(% en base peso seco)	
Carbohidratos	44	57.8
Proteínas	12	9.2
Fibra	21	-
Grasa	-	2
Cafeína	1.25	1.30
Taninos	-	4.5
Polifenoles	1.0	-

La composición porcentual de la pulpa y de la cáscara son diferentes, aunque la naturaleza de los compuestos presentes en ambas es muy similar. Ambos residuos son ricos en material orgánico, ya que contienen de 9.2 a 12% de proteínas, 21% de fibras y de 44 a 57.8% de azúcares totales junto con 4.5% de taninos y de 1.25 a 1.30% de cafeína, por lo que el empleo de pulpa y cáscara de café como alimento ha mostrado ser nocivo para los animales. Esto impone un límite de 10%

de la ración, a su uso como alimento (Brand y col., 2001; Adams y Dougan, 1987).

Los taninos tienen un peso molecular relativamente grande (500-3000 daltons) y forman complejos fuertes con carbohidratos y proteínas. Son factores antinutricionales e inhibidores del crecimiento microbiano. Los taninos presentes en la pulpa de café son algunas proantocianidinas, ácido clorogénico, epicatequina y catequina (Ramirez-Martinez, 1988; González y col., 1998).

Los polifenoles están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Están asociados especialmente con las plantas, donde se encuentran como fenoles simples, ácidos fenólicos, derivados de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y taninos. Son responsables de muchas propiedades como color, oscurecimiento, amargura y astringencia de frutas, jugos y bebidas fermentadas (Souquet y col., 2000; Wauters y col., 2001).

Otros compuestos fenólicos presentes en los residuos del café son: rutina, ácido protocatecoico y ácido ferúlico (Ramirez-Martinez, 1988).

La cafeína, 1,3,7-trimetilxantina, es importante debido a sus propiedades fisiológicas y a su carácter amargo, ya que es uno de los estimulantes del sistema nervioso central más poderosos además de diurético (Ramalakshmi y col., 2000).

2.2. Descafeinización de pulpa de café

En las últimas décadas, la tendencia hacia una mayor utilización de los residuos

agro-industriales ha permitido el desarrollo de bio-procesos que utilizan estos residuos como materia prima para la producción de químicos y otros productos con valor agregado como etanol, proteína unicelular, hongos comestibles, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios biológicamente activos, etc. (Pandey y col., 2000)

Tradicionalmente, sólo se habían encontrado pocas aplicaciones a la pulpa y cáscara de café, tales como combustible, fertilizantes, alimento para ganado o en composta. Sin embargo, estas aplicaciones utilizan sólo una fracción de la cantidad disponible de los residuos, y no son técnicamente muy eficientes (Pandey y col., 2000). Considerando que estos subproductos contienen una buena cantidad de azúcares fermentables, constituyen un sustrato adecuado para el cultivo de hongos y levaduras. Por lo tanto, gran parte de la investigación se ha centrado en la aplicación de los residuos de café en bio-procesos (Adams y Dougan, 1987; Antier y col., 1993a y 1993b; Minjares-Carranco y col., 1997; Boccas y col., 1994; Fan y col., 2000a y 2000b; Shankaranand y Lonsane, 1994; Soares y col., 2000a y 2000b).

El grano de café es descafeinado industrialmente por medio de solventes volátiles, agua o dióxido de carbono supercrítico (Katz, 1987; Udayashankar y col., 1986). Sin embargo, Molina y col. (1974) encontraron que la descafeinización de la pulpa usando como solvente agua no mejoraba su valor nutritivo cuando se incluye en dietas de ratas. Además, los métodos físicos y químicos, aunque exitosos, no son económicamente viables. Esto ha conducido a la búsqueda de métodos biológicos más sencillos y baratos para la descafeinización de los residuos del beneficio del café.

La degradación de la cafeína por microorganismos ofrece una alternativa al método de extracción con solventes. Permite eliminar los problemas asociados con los residuos de solventes volátiles, así como los altos costos del proceso. Se ha reportado la degradación de cafeína por hongos, levaduras y bacterias (Sideso y col., 2001). En 1985, Peñaloza y col. probaron la fermentación de pulpa de café en medio sólido, usando una cepa de *Aspergillus niger* para mejorar su valor nutritivo y reducir el nivel de cafeína y taninos. Porres y col. (1993) estudiaron la fermentación láctica de la pulpa de café (ensilaje) bajo diferentes condiciones, logrando una reducción entre 13 y 63% en el contenido de cafeína, entre 28 y 70% en los polifenoles totales y entre 51 y 81% en los taninos condensados.

Roussos y col. (1994) estudiaron la degradación de cafeína por *Penicillium verrucosum* en fermentación en medio sólido, tanto con una fuente externa de nitrógeno como sin ella. Los resultados indicaron que a pesar del crecimiento limitado del cultivo sin adición de nitrógeno, la degradación de cafeína fue casi completa. Hakil y col. (1998) reportaron el crecimiento de algunas cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en un medio con cafeína como única fuente de nitrógeno.

Por otra parte, Roussos y col. (1995) reportaron el aislamiento, a partir de muestras tomadas en los sitios de producción de café, de varias cepas de *Penicillium* con gran capacidad para degradar cafeína. La cepa V33A25, identificada como *Penicillium commune*, es capaz de degradar cafeína en medios líquidos y sólidos en niveles de hasta 97.7%, en 72 horas de cultivo. Además, otra característica importante de esta cepa es su capacidad para degradar ácido tánico, un tanino hidrolizable (Gutiérrez, 2000).

Se ha reportado que en *Pseudomonas putida*, la cafeína es convertida a xantina por medio de tres desmetilaciones sucesivas. Posteriormente, ésta pasa a ácido úrico (Sideso y col., 2001). En algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* se han detectado compuestos di y mono metilados de xantina cuando se cultivan en un medio con cafeína como fuente de nitrógeno (Hakil y col., 1998). La degradación de ácido úrico en los microorganismos genera como productos finales urea y glioxilato (Figura 2.1). La presencia de urea provoca aumento en el pH del sustrato. Brand y col. (2001) reportan el aumento en el pH de cáscara de café de 4.5 a 7.5 cuando se degrada el 84% de la cafeína presente usando *Aspergillus niger*.

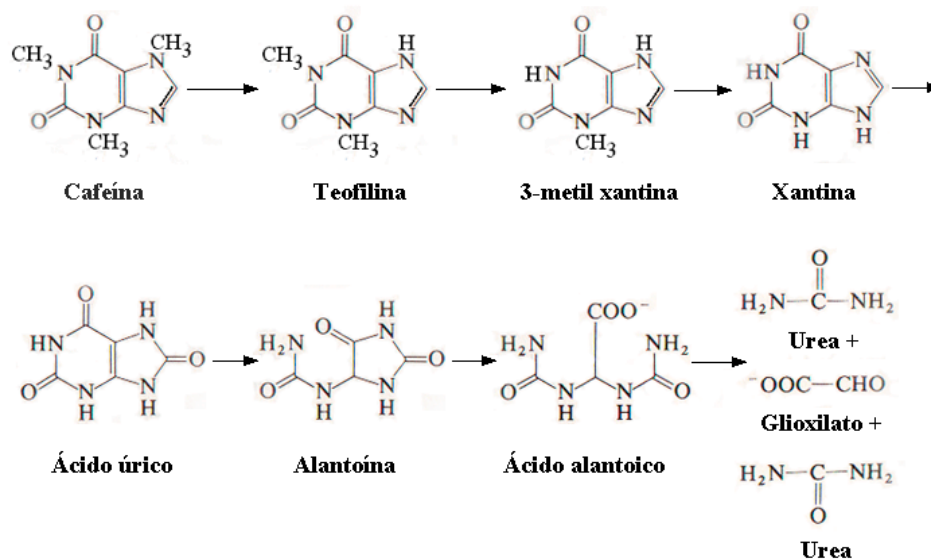


Figura 2.1. Ruta de degradación de la cafeína en hongos filamentosos (Hakil y col., 1998).

2.3 Variables ambientales de la fermentación en medio sólido

Los procesos que involucran el cultivo de microorganismos pueden ser clasificados en dos grupos: los de fermentación sumergida líquida y los de fermentación en medio sólido. La fermentación en medio sólido (FMS) es un proceso general-

mente por lote en el cual se pueden usar materiales naturales heterogéneos que contienen polímeros complejos como lignina, pectina o lignocelulosa en un ambiente con baja concentración de agua libre.

La FMS ha sido reportada como una tecnología de costo relativamente bajo. La fermentación en medio sólido se ha usado en la producción de alimento, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, sabores y biopesticidas (Tabla 2.2). La FMS se ha aplicado en subproductos agro-industriales, como los residuos del beneficio del café, porque ofrece ventajas potenciales en el tratamiento y un valor agregado a tales residuos.

Tabla 2.2. Principales aplicaciones de los procesos FMS.

Sector económico	Aplicación	Ejemplo
Industria alimentaria	Alimentos tradicionales	Koji, tempeh, quesos fermentados
	Producción de hongos	<i>Agaricus</i> y <i>Pleurotus</i>
	Aditivos alimenticios	Sabores y colorantes
Agricultura	Bioinsecticidas	<i>Beauveria</i>
	Hormonas	Giberelinas
	Bioconversión de subproductos	Bagazo de caña y pulpa de café
Fermentación industrial	Enzimas	Amilasas, celulasas y proteasas
	Antibióticos	Penicilina
	Ácidos orgánicos	Ácido cítrico y fumárico

Las bacterias, las levaduras y los hongos pueden crecer sobre sustratos sólidos, y encontrar aplicación en los procesos de FMS. Las bacterias están principalmente involucradas en la composta, el ensilaje y algunos procesos alimenticios. Las levaduras pueden ser usadas para la producción de etanol, alimentos o forraje. Mientras que los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos usados en los procesos FMS debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas.

La estructura macromolecular básica de los sustratos les confiere propiedades de sólido. La estructura macromolecular puede proporcionar simplemente una matriz inerte dentro de la cual se absorben las fuentes de carbono y energía, pero generalmente proporciona también la fuente de carbono y energía.

El sustrato crudo no es adecuado para usarse directamente en la fermentación. Por lo tanto, el sustrato requiere de una preparación o pre-tratamiento que puede consistir en la reducción del tamaño de partícula, en la complementación con nutrientes, en el ajuste del contenido de humedad o ajuste del pH, en un cocimiento para la degradación de la estructura macromolecular o para la reducción de contaminantes.

Sin embargo, se presentan serios problemas como consecuencia de la heterogeneidad del cultivo, en el intercambio de calor, en la transferencia de oxígeno, en el control los gradientes de humedad, pH, nutrientes y producto. Por lo que es importante conocer el efecto de las variables ambientales en el desarrollo de un cultivo sobre un sustrato sólido.

2.3.1 Humedad inicial

El nivel de humedad del sustrato tiene un efecto pronunciado sobre sus propiedades físico-químicas, y éstas, a su vez, afectan el desempeño de la fermentación en medio sólido. Por ejemplo, el nivel de humedad óptimo para el cultivo de *Aspergillus niger* sobre arroz es de 40%, mientras que sobre pulpa de café es de 80% (Prior y Du Preez, 1992). Esto se debe probablemente a la mayor capacidad de re-

tención de agua del último sustrato.

Por lo tanto, existe un contenido óptimo de humedad para cada fermentación que depende del sustrato y microorganismo utilizados. Por esta razón el contenido de humedad del sustrato es uno de los factores clave que determinan el resultado de un proceso de FMS. Varias estrategias han sido utilizadas para mantener constante el contenido de humedad de los sólidos, tales como aplicar altos contenidos de humedad al principio de la fermentación y humidificar la atmósfera en el fermentador entre 90 y 98% (Lonsane y col., 1985).

Existen reportes que indican que cuando se emplea el hongo *Penicillium commune* para la FMS no es recomendable usar niveles iniciales de humedad superiores a 80.5% para pulpa fresca, y 84% para pulpa ensilada, ya que son condiciones adversas para el crecimiento. Además, durante el curso de la fermentación, los niveles de humedad aumentan hasta 86 y 90% (Biopulca annual year report 1, 1999). Sin embargo, Barreto (2001) no reporta problemas en las fermentaciones de pulpa de café con 85% de humedad inicial.

Brand y col. (2000) estudiaron los niveles de degradación de cafeína y de taninos en cáscara de café usando tres cepas de *Rhizopus*, *Phanerochaete* y *Aspergillus* y señalan que los niveles óptimos de degradación se obtienen con contenidos iniciales entre 60 y 65% de humedad del sustrato.

2.3.2 Tratamiento térmico del sustrato

El tratamiento térmico del sustrato sólido para los procesos de FMS tiene un doble objetivo: primero, la esterilización del sustrato y, segundo, su cambio físico-químico. Casi siempre se aplica el calentamiento por lote. Como generalmente los sustratos sólidos son malos conductores de calor, las temperaturas interiores son menores que las de la superficie. Por lo tanto, en los sistemas de FMS es importante considerar además, los tiempos de calentamiento y enfriamiento durante el tratamiento térmico (Lonsane y col., 1992).

En el proceso de esterilización son importantes las siguientes consideraciones:

1. La velocidad de muerte térmica de los microorganismos es proporcional al número de células viables presentes en cualquier tiempo, y depende del estado fisiológico de las mismas.
2. La población inicial es extremadamente variable en tamaño, su determinación es tardada y el resultado es poco confiable.
3. Los microorganismos presentes en el sustrato, tienen diferentes sensibilidades al calor.
4. La magnitud del criterio de esterilización (el logaritmo de la relación de la población final sobre la inicial) aumenta linealmente respecto al logaritmo del volumen del medio de cultivo.

En cuanto al cambio de las propiedades químicas del sustrato, debe considerarse que los sustratos generalmente contienen materiales orgánicos complejos (polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos, etc.). Estos materiales son pro-

pensos a transformarse por la acción del calor y pueden interactuar unos con otros para formar una gran variedad de productos. Por ejemplo, la caramelización se presenta cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión, provocándose una deshidratación de los mismos hasta transformarse en furfural y derivados insaturados capaces de polimerizarse hasta formar melanoidinas. Por otra parte, las reacciones de Maillard también producen melanoidina pero por la reacción de un azúcar reductor y un grupo amino libre. Estas reacciones disminuyen el valor nutritivo ya que se pierden aminoácidos y azúcares y se generan compuestos que pueden ser tóxicos (Badui, 1999).

Gaime-Perraud y col. (1993) establecieron que la población microbiana presente en la pulpa de café inmediatamente después de la operación de despulpado está constituida en su mayoría por levaduras. Sin embargo, el número de bacterias aumenta considerablemente cuando la pulpa es expuesta a la intemperie para ser secada. Posteriormente, se determinó que la pulpa de café, ensilada o fresca, requiere un tratamiento térmico para disminuir la microflora natural presente y permitir el desarrollo aceptable de *Penicillium commune* (Biopulca annual report year 1, 1999). Durante la fermentación en medio sólido de pulpa de café con esta cepa, la degradación de cafeína fue completa en pulpa fresca, y 94.4% en pulpa ensilada, ambas con tratamiento térmico. La degradación fue inferior en pulpa sin tratamiento térmico. Asimismo, el tratamiento térmico de los sustratos aumentó la actividad metabólica del cultivo, es decir, aumentó la velocidad de producción de CO₂ y disminuyó las pérdidas nutricionales debidas a las pérdidas de peso seco (Biopulca annual report 2, 2000).

2.3.3 Concentración del inóculo

Generalmente se usan altas proporciones de inóculo en la mayoría de los procesos de fermentación al producir metabolitos. Esto es con el propósito de lograr el nivel deseado de producto en un período corto. De igual manera, en la mayoría de los procesos FMS se usa una alta proporción de inóculo, en este caso además con el propósito de prevenir la contaminación durante la fermentación. Comúnmente se emplean esporas de hongos por su facilidad de producción y de mezclarse uniformemente con los sustratos sólidos húmedos.

Peñaloza y col. (1992) estudiaron el efecto de la densidad del inóculo en un rango de 3.5×10^3 a 3.5×10^6 UFC g^{-1} , y observaron que el tamaño del inóculo tienen un efecto substancial en el desarrollo de la fermentación *tempeh*. En el caso de la fermentación de pulpa de café ensilada, el empleo de concentraciones entre 10^5 y 10^8 esporas de *Penicillium commune* g^{-1} pulpa húmeda, permite un alto nivel de degradación de cafeína (94%). En cambio, para la pulpa fresca el rango es un poco más amplio, de 10^4 hasta 10^8 esporas de *Penicillium commune* g^{-1} pulpa húmeda con un 100% de degradación de cafeína (Biopulca annual report year 1, 1999).

El desarrollo del inóculo a gran escala involucra un número mayor de subcultivos, los cuales, en algunos casos, conducen a la degeneración del cultivo. Por lo tanto, en las fermentaciones a gran escala es esencial mantener un mínimo número de subcultivos durante el desarrollo del inóculo (Lonsane y col., 1992).

2.3.4 Temperatura de incubación

La temperatura es una variable importante en los procesos de fermentación, ya que para cada microorganismo hay una temperatura óptima de crecimiento. La temperatura óptima para el crecimiento no es necesariamente la misma que para la producción óptima de un metabolito (Mudgett, 1986). Por ejemplo, durante el aislamiento de las cepas presentes en la pulpa de café, se observa que la temperatura tiene un papel importante. Una temperatura de incubación de 35 °C, permite el desarrollo de cepas principalmente del género *Aspergillus* (68% de la población total). Pero a 25 °C sólo constituye el 25% de la población total. Las cepas predominantes a 25 °C son del género *Humicola*. Además, las cepas obtenidas a 35 °C no son capaces de degradar más de 30% de la cafeína presente en un medio líquido aunque se presente buen crecimiento (Roussos y col., 1995).

Generalmente, en los estudios del efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos se han empleado cultivos isotérmicos. La relación de la velocidad específica de crecimiento y la temperatura puede ser descrita por la ecuación de Arrhenius (2.1) u otras ecuaciones (Ikasari y col., 1999). Dicha relación es esencial para el modelamiento de la FMS, pero a pesar de su importancia, las ecuaciones exactas de la influencia de la temperatura sobre las cinéticas en FMS son escasas (Smits y col., 1998).

$$\mu = A e^{\frac{E_a}{RT}} \quad 2.1$$

La ecuación global estequiométrica de la respiración muestra que ésta es alta-

mente exotérmica, y los altos niveles de actividad de los hongos dentro de los sólidos conduce a gradientes térmicos por la limitada capacidad de transferencia de calor de los sustratos sólidos (Raimbault, 1998). En los bio-reactores a escala laboratorio, el calor es removido, usualmente colocando el recipiente de cultivo en una habitación, o en un baño de agua, a temperatura controlada, o bien, pasando agua fría a través de los baffles y/o por una chaqueta del fermentador (Lonsane y col., 1992). Sin embargo, en los sistemas de FMS a gran escala los microorganismos no experimentan condiciones isotérmicas. El crecimiento o germinación comienza a temperatura óptima y pronto se presenta un aumento en la temperatura a niveles cercanos a la temperatura máxima para el crecimiento. Es posible que el comportamiento de un hongo a temperaturas elevadas, después de un crecimiento a temperatura óptima, sea diferente al que se presenta cuando el microorganismo es sujeto a una temperatura elevada desde el comienzo de la fermentación (Ikasari y col., 1999).

La adaptación de los hongos a la temperatura depende de su habilidad para mantener la fluidez de la membrana, de formar proteínas o enzimas estables, y de reemplazar rápidamente las macromoléculas termolábiles cuando la temperatura aumenta. El crecimiento puede disminuir durante la adaptación a los cambios de temperatura, puesto que la adaptación misma consumiría energía.

En FMS, donde la medición directa de la biomasa no es fácil, los cambios de velocidad de crecimiento debido a variaciones en la temperatura pueden ser difíciles de observar. Sin embargo, el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, procesos asociados a la respiración aeróbica, son dos actividades metabólicas que pueden usarse para estimar la velocidad de síntesis de biomasa.

2.4. Escalamiento de los procesos de fermentación en medio sólido

El escalamiento ascendente (scale-up) es el procedimiento por el cual se diseña un sistema a gran escala en base a resultados obtenidos con sistemas modelo a escala menor. El escalamiento es el paso crucial en el desarrollo de un proceso. Determina si dicho proceso operará de una manera viable a escala comercial. Rara vez el ejercicio del escalamiento logra el mismo desempeño global a gran escala que el que se logra en el laboratorio.

Las técnicas usadas para el escalamiento en fermentaciones sumergidas pueden ser clasificadas en cinco grupos (Mitchell y col., 1992):

- a. Técnica fundamental. Aplica la resolución de las ecuaciones fundamentales de momento y transferencia de masa y calor.
- b. Técnica semifundamental. Utiliza ecuaciones y relaciones simplificadas para evitar la complejidad de la técnica fundamental.
- c. El análisis dimensional. Mantiene constantes los grupos dimensionales de parámetros durante el aumento de escala.
- d. Reglas empíricas. Intentan mantener la similitud geométrica, y mantener constante un parámetro de proceso como la potencia por unidad de volumen, el $K_L a$, la velocidad del impulsor o la concentración de oxígeno disuelto.
- e. Escalamiento descendente. Involucra el uso de sistemas a escala pequeña para imitar las condiciones que podrían ser alcanzadas a gran escala .

La FMS ha sido aplicada en procesos industriales a gran escala, principalmente en Japón. La producción tradicional de koji, antes manufacturado en charolas pe-

queñas de madera o bambú, ha cambiado gradualmente a procesos más sofisticados: fermentaciones de lecho fijo del tamaño de una habitación, procesos de tambor giratorio y cámaras de acero automáticas con microprocesadores, sensores electrónicos y agitación, carga y descarga servomecánica. La escala usual en las fabricas de *sake* o *miso* es alrededor de 1 ó 2 toneladas métricas por lote (Raimbault, 1998).

Kumar y Lonsane (1987a) reportaron la producción de pectinasas a escala intermedia. Raimbault (1998) reporta que en Francia, una nueva empresa fue creada para comercializar un proceso de producción de pectinasa a partir de pulpa de remolacha. La producción de queso Roquefort en Francia está siendo modernizada con mejoras mecánicas en el acondicionamiento de los quesos, la producción de las esporas de hongos, y el control de las condiciones ambientales. En Europa y Estados Unidos se ha modernizado y escalado el proceso para preparar composta que anteriormente se usaba en la producción a pequeña escala de hongos comestibles (Raimbault, 1998).

Es vital desarrollar criterios de escalamiento bien fundamentados para la comercialización de los sistemas de fermentación en estado sólido. La información disponible sobre tales estrategias de escalamiento es escasa. Se han usado enfoques empíricos debido al desconocimiento del efecto que tienen el diseño y la operación de los bio-reactores sobre el desempeño de la FMS (Oostra y col., 2000). Entre las estrategias de escalamiento usadas hasta ahora en los sistemas FMS, sólo dos tienen bases científicas: el mantenimiento de los balances de calor y agua, y la técnica de disminución de escala. Estas técnicas son simples, confiables y prácticas (Lonsane y col., 1992).

2.4.1 Método de escalamiento descendente

Los pasos necesarios para llevar un proceso de escala laboratorio a escala industrial por el método de escalamiento descendente, son los siguientes:

1. Selección del diseño de reactor más eficiente a escala industrial
2. Simulación a escala laboratorio
3. Estandarización de condiciones ambientales y de estrategia de operación del reactor a escala laboratorio, e
4. Implementación a escala industrial directamente, o a través de un estudio de planta piloto.

La selección del diseño a escala industrial puede estar basada en información general de la cepa microbiana que será usada, del metabolito microbiano que se pretende producir, o basada en la comparación de un diseño de reactor en procesos similares. La selección del diseño permite estimar el rango de condiciones ambientales más adecuadas para aplicarse a escala laboratorio e industrial. Las condiciones ambientales que pueden ser consideradas en el método de disminución de escala incluyen: velocidad de transferencia de oxígeno, tiempo de mezclado, fuerza de corte y composición del sustrato. Una vez que el proceso está estandarizado a escala laboratorio, el escalamiento del proceso involucra un aumento en el tamaño del reactor manteniendo similitud geométrica (Lonsane y col., 1992).

2.4.2 Reactores con mezclado

Uno de los mayores problemas por superar en la FMS a gran escala es la acumulación excesiva de calor. Deben evitarse las altas temperaturas en el reactor porque afectan la actividad microbiana. Las posibles estrategias de eliminación de calor son el enfriamiento conductivo a través de la pared, el convectivo y el evaporativo. Estos últimos por acción de una corriente de aire (Oostra y col., 2000).

En los reactores a nivel laboratorio puede lograrse un control adecuado de la temperatura por enfriamiento a través de la pared. Sin embargo, conforme el tamaño del reactor aumenta, el enfriamiento conductivo se vuelve insuficiente y se requiere además enfriamiento convectivo y evaporativo. La cuantificación de las pérdidas de agua en diversas condiciones de operación es importante ya que grandes pérdidas pueden secar el sustrato, y esto tiene un efecto adverso sobre el metabolismo microbiano.

El mezclado de los sólidos puede mejorar significativamente el enfriamiento conductivo de un reactor, porque aumenta el coeficiente de transferencia de calor de los sólidos a la pared. La mejora del enfriamiento conductivo puede reducir las necesidades de enfriamiento evaporativo y así evitar los problemas de desecación. Sin embargo, no todos los hongos y sustratos sólidos pueden tolerar las fuerzas que resultan del mezclado. Varios autores han reportado que la agitación impide el crecimiento de los hongos (Desgranges y col., 1993), mientras que otros obtuvieron buenos resultados en los sistemas agitados (de Reu y col., 1993; Marsh y col., 1998; Oostra y col., 2000). Parece que la sensibilidad al estrés mecánico (debido al esfuerzo cortante) depende del tipo de microorganismo, de su morfología y del

tipo de sustrato usado. Hasta ahora no ha podido predecirse cómo se comportará un hongo en los sistemas agitados (Oostra y col., 2000).

El tipo de proceso, el diseño del reactor, y el producto relacionado, determinan las características de la agitación en los sistemas FMS. Varios productos, como las aflatoxinas, la ocratoxina y las enzimas, son obtenidos en sistemas agitados con rendimientos mayores. La agitación puede suprimir la esporulación. En algunos sistemas agitados se reporta un crecimiento más pobre de *Rhizopus oligosporus* y una producción menor de alcohol por *Saccharomyces cerevisiae* (Kargi y Curme, 1985). También se sabe que la agitación tiene efectos adversos sobre la porosidad del sustrato debido a la compactación de las partículas, el rompimiento de las uniones del hongo con los sólidos, y el daño del micelio del hongo debido a las fuerzas de corte en los sistemas FMS. Sin embargo, no se han reportado efecto sobre la producción de ácido giberélico (Kumar y Lonsane, 1987b) y alfa amilasa bacteriana. Además, la agitación puede promover la formación de agregados de la masa en fermentación, o bien, prevenirla, dependiendo de la naturaleza de los sólidos. Se ha reportado que la agitación previene la unión de partículas de sustrato por la acción del micelio (Lonsane y col., 1992).

El escalamiento de los sistemas de agitación en procesos FMS puede no presentar problemas, porque en la mayoría de los procesos las velocidades de agitación son bastante bajas. El uso de agitación intermitente, en lugar de continua, será más apropiado para prevenir el daño a los micelios y el rompimiento de las uniones del micelio con los sólidos. Se ha reportado que el mezclado periódico es capaz de mantener las velocidades máximas de transferencia de gas al mismo nivel que usando agitación continua. Similarmente, es importante considerar la selec-

ción de la velocidad de agitación que permita el mezclado y la remoción de calor de los sólidos (Lonsane y col., 1992).

Además de lo anterior, los problemas de contaminación son experiencias usuales durante el escalamiento del proceso si las precauciones debidas no son tomadas. En muchos procesos FMS se adopta la estrategia de usar altas concentraciones de inóculo para controlar la contaminación. Un bajo contenido de humedad, así como el pH del medio, son útiles en la reducción del crecimiento de los contaminantes, pero no si afectan el crecimiento y metabolismo del cultivo.

A gran escala, la contaminación puede ser controlada con efectividad seleccionando el tipo adecuado de fermentador. Por ejemplo: los fermentadores cerrados, como los tambores giratorios, los recipientes y columnas cubiertas pueden controlar la contaminación. En contraste, los bio-reactores de tipo abierto, como la fermentación en charola, son más propensos a la contaminación. El conocimiento de la fuente de contaminación será útil. Así, el uso del bio-reactor adecuado, una gran proporción de inóculo y buenas prácticas de mantenimiento pueden superar los problemas de contaminación (Lonsane y col., 1992).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar las condiciones de fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio (100 g) para aplicarlas a un proceso de fermentación a nivel semi-piloto (10 Kg).

3.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la humedad inicial, la concentración del inóculo, la temperatura de incubación y el tratamiento térmico de la pulpa de café sobre el crecimiento de *Penicillium commune* a nivel laboratorio.

Evaluar las condiciones ambientales y de tratamiento térmico en la fermentación de pulpa de café a nivel semi-piloto.

Comparar estrategias para el mezclado de los sólidos durante la fermentación a nivel semi-piloto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismo y preparación del inóculo.

Se utilizó la cepa *Penicillium commune* V33A25 perteneciente a la colección de microorganismos IRD-UAM. Este microorganismo fue aislado de muestras tomadas en sitios de producción de café (Roussos y col., 1995). La cepa ha sido usada previamente en estudios de descafeinización, en los que mostró una alta eficiencia de degradación de cafeína (Hakil y col., 1998; Gutierrez, 2000; Barreto, 2001).

Para la preparación del inóculo y el mantenimiento de la cepa se utilizó el medio infusión de café-sacarosa-agar (Tabla 4.1). Los nutrientes y el agar fueron disueltos en una infusión preparada con 40 g de café molido y 1000 ml de agua destilada. La infusión fue filtrada en papel Whatman No. 41 y el volumen perdido se reemplazó con agua destilada. El medio fue esterilizado a 121 °C durante 15 minutos.

Se realizaron subcultivos de la cepa en matraces Erlenmeyer o en botellas Roux sobre 100 o 400 mL de medio respectivamente. Se inocularon con una suspensión de esporas para alcanzar una concentración de 1×10^6 esporas/mL de medio. Los subcultivos fueron incubados a 30 °C por 6 días para asegurar el crecimiento y la esporulación.

Tabla 4.1. Composición del medio infusión de café-sacarosa-agar (Biopulca annual report year 1, 1999)

Componente	Concentración (g/L infusión de café)
Sacarosa	2.00
KH ₂ PO ₄	1.30
Na ₂ HPO ₄	0.12
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.30
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.30
Agar bacteriológico	20.0

Para la inoculación de las fermentaciones en medio sólido se preparó una suspensión de esporas al cubrir las placas de agar con una solución de Tween 80 al 0.1% y agitar suavemente con una barra magnética. Se determinó la concentración de esporas en dicha suspensión con una cámara de Malassez (Larrocche y col., 1994).

4.2 Sustrato y su tratamiento térmico

Se utilizó pulpa de café como sustrato. Se empleó un lote de pulpa seca (5.9-8.4% de humedad) proporcionado por la compañía GESOL (Torreón, Coahuila). La composición aproximada del sustrato fue: cenizas, 5.5 %; proteína, 8.6%; grasa, 2.03%; extracto libre de nitrógeno 65.1%; fibra 12.8% en base seca (Barreto, 2001).

El pre-tratamiento térmico de la pulpa fue realizado en condiciones estáticas o con

mezclado. La pulpa seca fue humedecida con agua destilada para obtener una humedad cercana al 50%. Para el tratamiento estático, la pulpa fue empacada en bolsas de plástico y calentada con vapor de agua hasta que éste alcanzara 15 psi empleando diferentes tiempos de mantenimiento. En la Tabla 4.2 se muestra la descripción general de los tratamientos estáticos.

Tabla 4.2. Condiciones de tratamiento térmico estático

Tratamiento	Pulpa (kg)	Mantenimiento
1	6.9	90 min
2	1.0	10 min
3	1.0	20 min
4	1.0	30 min
5	1.0	40 min

Para el pre-tratamiento con mezclado, la pulpa se mezcló continuamente a una velocidad de 1 rpm durante el calentamiento de la pulpa. Las temperaturas máximas obtenidas se encontraron en un rango de 60.5 a 75.1 °C. Generalmente, se aplicaron uno o dos tratamientos estáticos adicionales con la misma presión durante el

Tabla 4.3. Condiciones de los tratamiento térmico combinados

Tratamiento	Pulpa (kg)	Estático	Con mezclado
1	8.8	121 °C 30 min (2 veces)	60.5 - 65.4 °C 2 horas
2	8.4	121 °C 30 min (2 veces)	60.7 - 63.0 °C 1 horas
3	9.2	121 °C 60 min (1 vez)	75.1 - 76.0 °C 2 horas
4	4.3	-	72.7 - 73.8 °C 3 horas

periodo de mantenimiento. La Tabla 4.3 presenta la descripción general de este tipo de pre-tratamientos combinados.

Ambos tipos de tratamiento fueron expresados como la cantidad de energía recibida por unidad de masa de pulpa (Tabla 4.4); y fue calculada a partir del perfil de temperatura estimada de la pulpa durante el calentamiento (ver Anexo).

Tabla 4.4. Valores de energía recibida en KJ/Kg de pulpa en los tratamientos térmicos estáticos y combinados

Tratamiento	Estático	Combinado
1	554	5519
2	1158	5687
3	1272	9597
4	1398	13610
5	1541	

4.3 Reactor a nivel semi-piloto

Se empleó un reactor a nivel semi-piloto provisto de un sistema de mezclado interno. El tanque de fermentación del reactor tiene las siguientes dimensiones: longitud, 75.6 cm; ancho, 32.6 cm; profundidad, 38 cm. La capacidad total es 83.4 litros (26 Kg de pulpa húmeda). El reactor está equipado con una chaqueta y puertos para la inoculación, descarga de sólidos y toma de muestra (Figura 4.1). El sistema de mezclado (Figura 4.2) consiste en un eje horizontal unido a un par de listones helicoidales concéntricos, que cubren toda la longitud del tanque. El sistema

de mezclado permite obtener velocidades de mezclado entre 0.25 y 1 rpm. El sistema puede manejar mezclado continuo o mezclado intermitente. La tapa del reactor está equipada con dos termopozos para la medición de temperatura dentro del tanque.

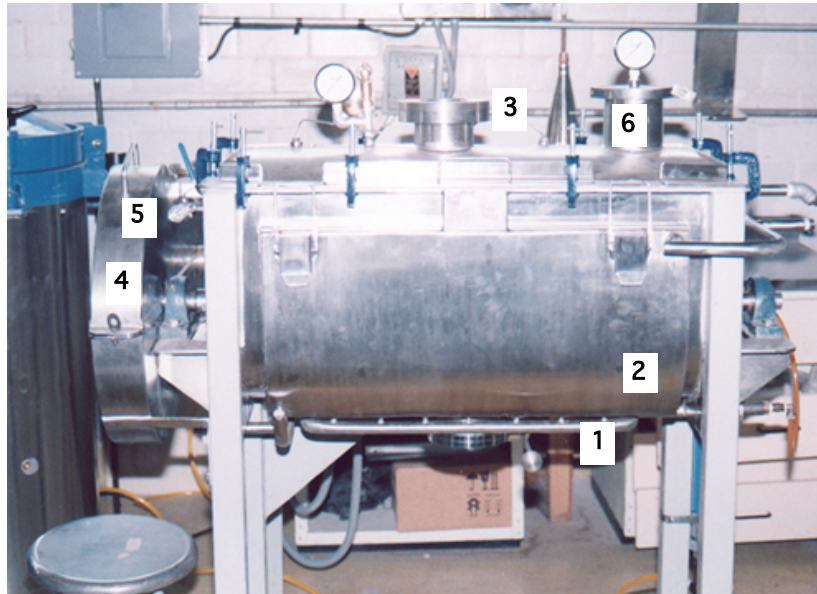


Figura 4.1. Reactor con sistema interno de mezclado para fermentación en medio sólido a nivel semi-piloto (capacidad de trabajo: 26 Kg de pulpa). 1. Entrada de aire; 2. Chaqueta; 3. Escotilla; 4. Motor; 5. Entrada de inóculo; 6. Puerto de muestras; 7. Puerto de descarga.

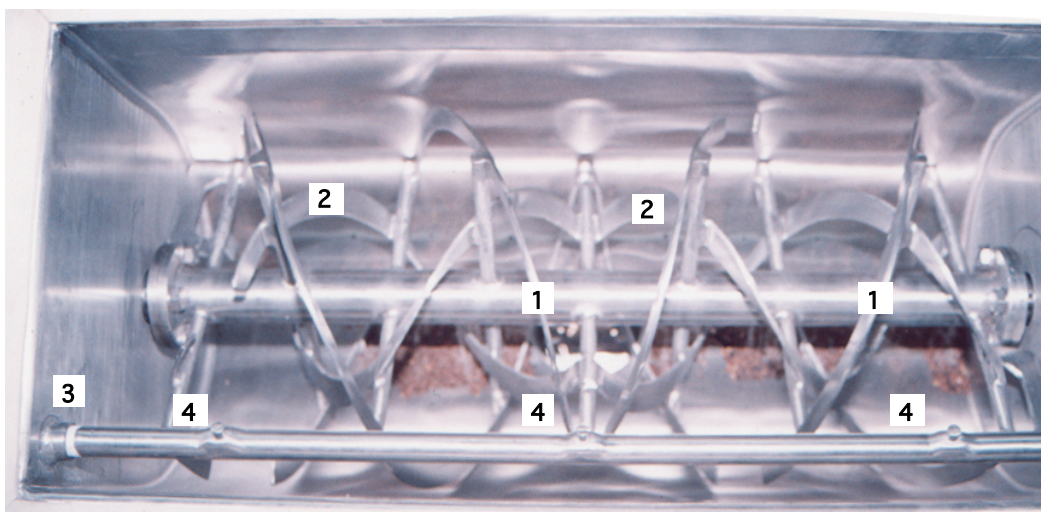


Figura 4.2 Tanque de fermentación del reactor a nivel semi-piloto. 1. Listones externos; 2. Listones internos; 3. Entrada de inóculo; 4. Boquillas para aspersión.

El diagrama del dispositivo empleado para la fermentación a nivel semi-piloto se muestra en la Figura 4.3. Una columna de humidificación proporciona el aire húmedo que se introduce al reactor a través de unos orificios distribuidos en el fondo.

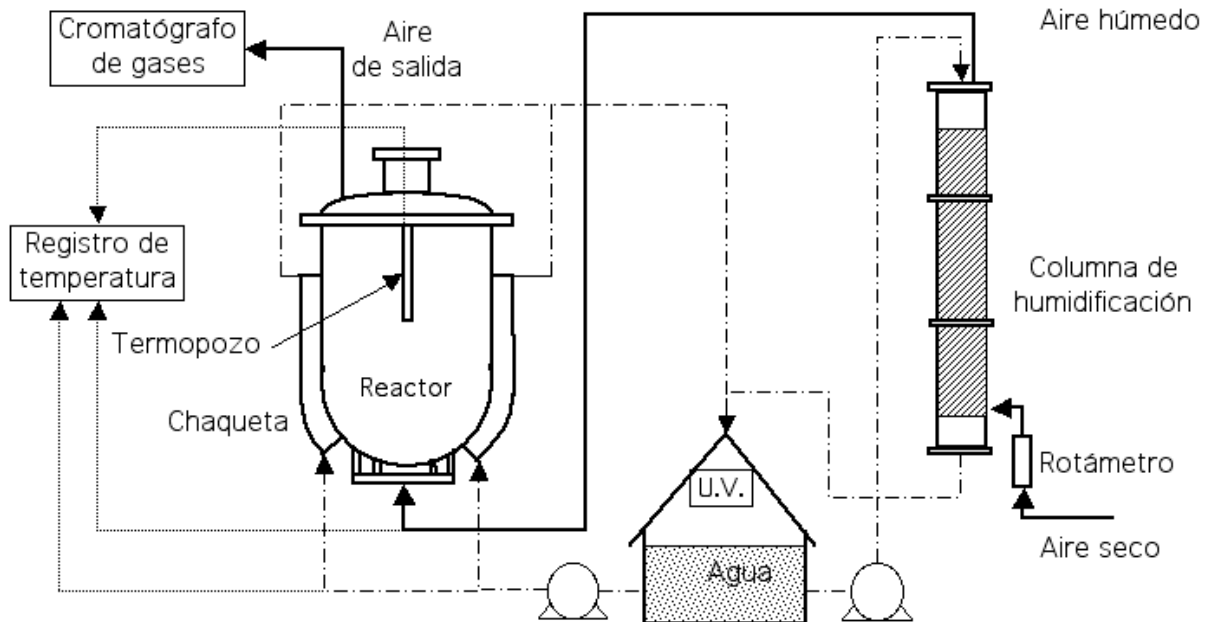


Figura 4.3. Diagrama del dispositivo usado para la fermentación a nivel semi-piloto.

La chaqueta y columna comparten un baño que controla la temperatura del agua. Cuenta con una lámpara de luz UV. Las paredes de todo el sistema se encuentran cubiertas con material aislante. La corriente de agua que fluye a través de la chaqueta del reactor cumple dos funciones: transferir calor a través de la pared y aislar el reactor del ambiente.

Este sistema permite disminuir el efecto de la temperatura ambiente sobre la temperatura interior del reactor. Por ejemplo, en mediciones previas, la temperatura interior del reactor tuvo una fluctuación máxima de 2.21 °C, mientras que la tempera-

tura ambiente llegó a variar hasta 9.21 °C. Así, el sistema permitió mantener un promedio de 29.5 °C mientras que la temperatura ambiental promedio era 21.9 °C. Este sistema se utilizó en todas las fermentaciones a nivel semi-piloto.

4.4 Fermentación en medio sólido

Los estudios de fermentación en medio sólido de la pulpa de café con *Penicillium commune* fueron realizados en dos niveles: laboratorio y semi-piloto.

Nivel laboratorio. A nivel laboratorio se estudió el efecto de cuatro parámetros ambientales por separado. Los parámetros estudiados fueron: (1) humedad inicial, (2) efecto del tratamiento térmico, (3) concentración del inóculo y (4) temperatura de incubación. La Tabla 4.5 muestra los niveles empleados en cada estudio.

Para la fermentación a nivel laboratorio se utilizaron columnas de fermentación similares a las reportadas por Saucedo-Castañeda y col. (1994), en las cuales puede lograrse una temperatura constante por medio de un baño de agua con convección forzada. Además, puede fijarse el flujo de aire deseado en cada columna por medio de válvulas independientes, generalmente con un valor de 1 mL de aire por g de pulpa húmeda. En todos los casos se usó aire saturado para la aereación de las columnas. En cada columna se colocaron 100 g de pulpa húmeda e inoculada. La inoculación del sustrato se efectuó al mezclar la pulpa con una suspensión de esporas. La humedad se ajustó agregando agua destilada estéril. El pH promedio inicial fue 4.3 ± 0.01 . Los experimentos fueron realizados con dos repeticiones y

Tabla 4.5. Diseño experimental para el estudio del efecto de las variables a nivel laboratorio

Experimento	Condición ambiental	Niveles	Valores
1	Humedad inicial (%)	4	50, 55, 60, 65
2	Tratamiento térmico* (KJ/Kg pulpa)	5	A) 554, 1158, 1272, 1398, 1541
		4	B) 5519, 5687, 9597, 13610
3	Concentración del inóculo (esporas/g pulpa húmeda)	4	1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8
4	Temperatura (°C)	6	20, 25, 28, 30, 32, 35 °C

* A)Estático; B)Combinado

los resultados presentados son el promedio de las repeticiones. La pulpa fermentada fue desempacada, mezclada y almacenada en refrigeración hasta su análisis.

El estudio del tratamiento térmico a nivel laboratorio fue dividido en dos partes: tratamiento en autoclave o en reactor. Los tratamientos aplicados estáticos generaron valores de energía recibida de 554, 1158, 1272, 1398 y 1541 KJ/Kg de pulpa. El tratamiento de la pulpa con mezclado proporcionó valores de 5519, 5687, 9597 y 13610 KJ/Kg pulpa.

Asimismo, el estudio del efecto de la temperatura se dividió en dos partes. La primera se realizó con cultivos isotérmicos. En la segunda, los cultivos fueron incubados bajo varios regímenes de temperatura, como se describe a continuación. En todos los niveles la temperatura de incubación durante las primeras 20 horas fue

30 °C. Posteriormente, las columnas fueron expuestas a otras temperaturas de incubación (25, 28, 30, 32 y 35 °C) y mantenidas así hasta el final de la fermentación. Estos regímenes de temperatura fueron usados para eliminar el efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas y evaluar únicamente su efecto sobre el crecimiento del hongo (Ikasari y col., 1999).

Nivel semi-piloto. A nivel semi-piloto se emplearon 10 Kg de pulpa de café húmeda por lote y comprendió dos etapas: la primera incluye una serie de fermentaciones preliminares, a partir de los datos reportados en la bibliografía; y la segunda, consiste en la aplicación de los resultados obtenidos a nivel laboratorio.

Además, se evaluaron dos estrategias de mezclado de los sólidos durante la fermentación: intermitente y continua. Ambas se compararon con una fermentación estática. La estrategia intermitente consistió en agitar a 1 rpm durante 50 segundos cada 2 horas. La estrategia continua utilizó una velocidad constante de 0.25 rpm. Ambas estrategias comenzaron 20 horas después de la inoculación.

Antes de cada fermentación, el tanque del reactor fue tratado con una corriente de vapor hasta alcanzar una temperatura interior de 93.8 °C que se mantuvo por 3 horas. Después de alcanzar la temperatura ambiente, el reactor fue cargado con la pulpa húmeda. La inoculación se logró al mezclar los sólidos con la suspensión de esporas asperjada sobre ellos. El contenido de humedad se ajustó en la misma forma usando agua destilada. Durante la fermentación se circuló por la chaqueta una corriente de agua a temperatura constante. El flujo de aire saturado fue mantenido constante en un nivel de 1 litro de aire/Kg pulpa húmeda por minuto.

Las muestras del reactor fueron tomadas en la región central después del mezclado completo de los sólidos (10 minutos a 1 rpm) y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Humedad

El contenido de agua de las muestras, expresado como porcentaje en base húmeda, fue determinado por un método gravimétrico basado en la pérdida de peso después de colocar las muestras en una estufa a 60 °C durante 24 horas. Se realizaron al menos dos repeticiones para cada muestra.

4.5.2 pH

Para determinar el pH de las muestras se agregó solución de Tween 80 al 0.1% a la pulpa, en una proporción 1:10, y se agitó por 20 min. El pH fue medido en la suspensión resultante con un potenciómetro Conductronic pH 20 previamente calibrado. Se realizaron al menos dos repeticiones para cada muestra.

4.5.3 Concentración de esporas

La concentración de esporas en las suspensiones fue medida usando una cámara

ra de Malassez. Cuando fue necesario se realizaron diluciones de la suspensión en agua destilada. Para evaluar la producción de esporas en las fermentaciones se obtuvo primero una suspensión de esporas agitando una muestra de pulpa en una solución de Tween 80 al 0.1 % por 20 minutos. El resultado fue expresado como el número de esporas por gramo de materia húmeda. Se realizaron al menos dos repeticiones por cada muestra.

4.5.4 Medición de CO₂ y determinación de los parámetros cinéticos

Se utilizó la producción de CO₂ como indicador del crecimiento del hongo. Por lo tanto, la concentración de dióxido de carbono en el aire de salida de las columnas y del reactor fue medida periódicamente por cromatografía de gases. Se usó un cromatógrafo Gow-Mac 580, equipado con una columna concéntrica Alltech (CRTI) y un detector de conductividad térmica. Los parámetros de operación del sistema cromatográfico fueron: temperatura del detector y de la columna 45 °C, corriente del detector 150 mA, fase móvil helio, flujo 40 cm³/min. Los resultados fueron procesados con el paquete CHROMA para obtener la concentración porcentual de CO₂.

La determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento se hizo de manera indirecta como en trabajos anteriores (Saucedo-Castañeda y col., 1994). Primero, la concentración fue expresada en mg de CO₂ por gramo de pulpa seca inicial (g MSI). La velocidad de producción fue calculada como la diferencia en la concentración de CO₂ de dos mediciones consecutivas sobre el tiempo transcurrido entre ambas.

La cantidad total de CO₂ producido durante la fermentación se obtuvo del cálculo del área bajo la curva obtenida en la gráfica de la velocidad de producción contra el tiempo. Por otra parte, el tiempo de germinación (t_{lag}) se calculó usando la gráfica de la producción acumulada de CO₂ contra el tiempo; la intersección con el eje X de la recta obtenida entre la fase de crecimiento exponencial y la fase de desaceleración se tomó como el tiempo de germinación. La velocidad específica de crecimiento μ se determinó como la pendiente de la línea recta obtenida en la gráfica del logaritmo del CO₂ producido contra el tiempo.

4.5.5 Estimación de temperatura de la pulpa a nivel semi-piloto

Las fermentaciones a nivel semi-piloto utilizaron únicamente entre 30.0 y 44.8% de la capacidad total. En consecuencia no fue posible medir directamente la temperatura en el lecho de fermentación, ya que los termopozos no estuvieron en contacto con la pulpa. Para estimar la temperatura se utilizó el siguiente balance, basado en el empleado por Sargantanis y col. (1993) para un reactor de lecho empacado.

$$Q_{Total} = Q_{Conducción} + Q_{Convección/Evaporación} + Q_{Metabolismo} \quad 4.1$$

El balance térmico tomó en cuenta la transferencia de calor con el líquido de la chaqueta a través de la pared del reactor ($Q_{Conducción}$); la transferencia por convección con el aire de entrada y por evaporación de agua del lecho en un solo término ($Q_{Convección/Evaporación}$). Además, consideró la generación de calor debido al metabolismo del microorganismo ($Q_{Metabolismo}$). Se asumió homogeneidad de las condiciones den-

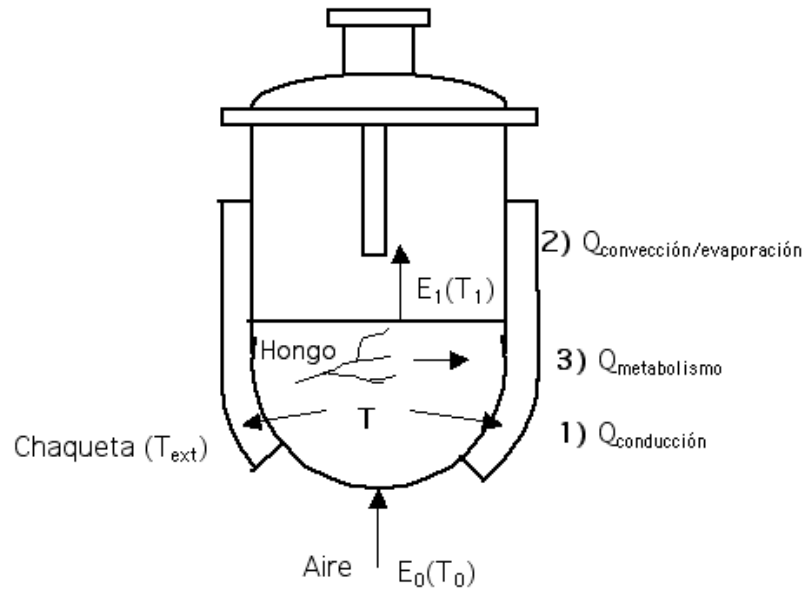


Figura 4.4. Mecanismos de transferencia de calor dentro del reactor a nivel semi-piloto. 1)Conducción por diferencia entre T y T_{ext} . 2)Convección y evaporación por la diferencia entre E_1 y E_0 . 3)Generación de calor por el metabolismo.

tro del lecho (composición del sustrato, contenido de agua, contenido de biomasa y temperatura). La ecuación anterior (4.1) puede escribirse de la siguiente forma:

$$m_{pulp} C_{p,pulp} \frac{dT}{dt} = h_A (T_l - T_{ext}) + F(E_0 - E_1) + Y_{Q/CO_2} \frac{dCO_2}{dt} \quad 4.2$$

En lechos empacados, las variaciones de la temperatura son lentas comparadas al transporte convectivo de calor; por lo que es posible asumir que $dT/dt=0$ (Weber y col., 1999). Por lo tanto, el primer término de la ecuación 4.2 puede igualarse a cero y se obtiene:

$$0 = h_A (T_l - T_{ext}) + F(E_0 - E_1) + Y_{Q/CO_2} \frac{dCO_2}{dt} \quad 4.3$$

donde T es la temperatura de la pulpa, T_{ext} es la temperatura del agua en la chaqueta, h_A es un coeficiente global de transferencia de calor a través de la pared, F es el flujo másico de aire, E_o y E_I son las entalpías de las corrientes de entrada y salida respectivamente, dCO_2/dt es la velocidad de producción de CO_2 y Y_{Q/CO_2} es un coeficiente de equivalencia calórica. De la ecuación 4.3 se despejó la temperatura de la pulpa, T_i , y se sustituyó el valor de las variables para cada tiempo en la fermentación.

La temperatura T_{ext} se registró continuamente durante la fermentación. El coeficiente h_A se calculó como una combinación de la resistencia conductiva de la pared del reactor y el coeficiente convectivo de transferencia de calor para la convección entre la pared del reactor y el agua de la chaqueta (Sargantanis y col., 1993).

$$\frac{1}{h_A} = \frac{1}{h_o A} + \frac{\Delta x}{k_{pared} A} \quad 4.4$$

El coeficiente de transferencia por convección h_o se calculó utilizando la ecuación de Nusselt para una placa vertical con convección natural (Perry y col., 1984) considerando la pared del reactor en contacto con el agua de la chaqueta.

Los términos de entalpía de la corriente de entrada y salida (E_o y E_I , respectivamente) incluyen las contribuciones del calor sensible del aire seco y del vapor de agua, así como del calor latente de evaporación para el agua (Sargantanis y col., 1993), según la siguiente ecuación:

$$E_i = \left[c_{p_{agua}} M_{agua} y_{agua} + c_{p_{aire}} M_{aire} (1 - y_{agua}) \right] (T_i - T_{ref}) + \Delta H_V y_{agua} \quad 4.5$$

La temperatura en cada corriente (entrada T_o y salida T_i) se adquirieron experimentalmente con el uso de un sistema automático. Se asumió que ambas corrientes se encontraban saturadas con agua. Por lo tanto, se calculó la presión de vapor de agua (P_{agua}) en cada corriente usando la ecuación de Antoine (4.6). La fracción de vapor de agua (y_{agua}) se calculó considerando la presión en la Cd. de México de 585 mmHg como la presión total.

$$P_{agua} = 10^{8.0131 - \frac{1730.63}{T_i + 233.426}} \quad 4.6$$

$$y_{agua} = \frac{P_{agua}}{P_{Total}} \quad 4.7$$

El flujo másico F de aire se calculó con la siguiente expresión a partir de los datos experimentales de flujo volumétrico (F_v):

$$F = F_v \cdot \frac{P_{Total} M_{aire}}{RT_{0promedio}} \quad 4.8$$

El coeficiente dCO_2/dt de la ecuación 4.2 se obtuvo como en la sección 4.5.4. Los valores de los demás parámetros y coeficientes utilizados en los cálculos se presentan en la segunda sección del Anexo (Welty y col., 1976; Cooney y col., 1968; Perry y col., 1984).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos del estudio de la fermentación de pulpa de café usando *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semi-piloto. En la primera parte, se presentan los resultados obtenidos en las primeras experiencias realizadas a nivel semi-piloto. El estudio de los parámetros ambientales a nivel laboratorio es el tema de la segunda parte. Mientras que la tercera sección muestra la aplicación a nivel semi-piloto de los resultados obtenidos a nivel laboratorio.

5.1 Estudios preliminares a nivel semi-piloto (10 Kg)

Los trabajos previos, relacionados con la fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune*, se realizaron a nivel laboratorio utilizando columnas de vidrio o reactores de charola con una capacidad de 100 g y 3.2 Kg de pulpa respectivamente. El empleo de tales sistemas ha sido exitoso. Sin embargo, aunque su control es sencillo, poseen una capacidad muy baja. En este trabajo se empleó un reactor a nivel semi-piloto con una capacidad máxima de aproximadamente 26 Kg de pulpa húmeda. Los resultados han sido agrupados de la siguiente manera: en la sección 5.1.1 se presentan las fermentaciones iniciales siguiendo las condiciones reportadas previamente, mientras que en la sección 5.1.2 se encuentran las fermentaciones con distintos tratamientos térmicos del sustrato. Esta parte del tra-

bajo permitió seleccionar algunas variables ambientales para estudiar la fermentación de pulpa de café a nivel laboratorio.

5.1.1 Fermentación de la pulpa de café a nivel semi-piloto.

En la primera etapa de este trabajo se realizaron fermentaciones a nivel semi-piloto para evaluar algunas condiciones de operación anteriormente reportadas para el crecimiento de *Penicillium commune* en pulpa de café (Barreto, 2001; Biopulca annual report year 2, 2000). Se realizaron dos experimentos con humedades iniciales de 62.1 y 71.3%. Los estudios se realizaron a 30 °C, con las siguientes condiciones promedio de aereación, tamaño de inóculo y pH de 1.1 ± 0.02 mL aire/g MHI min y $2.9 \times 10^6 \pm 0.11 \times 10^6$ esporas/g MHI y 4.5 ± 0.04 , respectivamente.

La Figura 5.1 presenta los perfiles de producción de CO₂ obtenidos en las fermentaciones con 62.1 y 71.3% de humedad inicial. A partir de las 20 horas de cultivo la velocidad de producción en función del tiempo fue constante en ambos casos hasta el final del cultivo. La producción final fue diferente para cada nivel de humedad inicial. El valor máximo fue 500 mg CO₂ g⁻¹ MSI en la fermentación con 62.1% de humedad.

Los valores de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (μ) y pH final se reportan en la Tabla 5.1 para los dos niveles de humedad inicial estudiados. A pesar de que el tiempo de germinación es menor con 62.1%, la velocidad de crecimiento es ligeramente mayor en el medio con 71.3% de humedad.

Sin embargo, en ambos casos se presentó crecimiento del hongo *Aspergillus*, un miembro de la microflora de la pulpa de café.

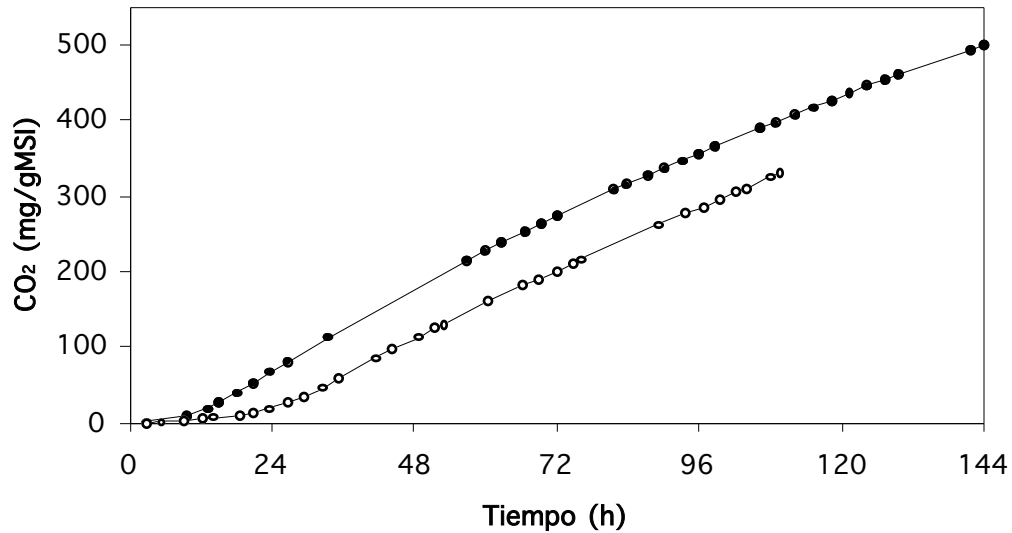


Figura 5.1. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune* usando diferentes humedades iniciales. (●) 62.1; (○) 71.3 (%). Condiciones iniciales: 2.9×10^6 esporas/g MSI, pH= 4.5, 1.1 mL aire/gMHI min.

Tabla 5.1. Efecto de la humedad inicial sobre la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune*

Humedad (%)	Crecimiento de <i>Aspergillus</i>	μ_{CO_2} (h^{-1})	pH final	t_{lag} (h)
62.1	+	0.09	7.5	8.2
71.3	+	0.11	4.4	19.1

La Figura 5.2 muestra el comportamiento de la temperatura durante la fermentación para ambas humedades iniciales. El cambio de temperatura para las fermentaciones fue de alrededor de un grado centígrado. Sin embargo, la estimación considera que la temperatura del lecho es homogénea, por lo que el aumento de temperatura en el centro del lecho pudo ser mucho mayor. En ambos

casos el aumento de temperatura estuvo asociado con el incremento en la velocidad de producción de CO₂.

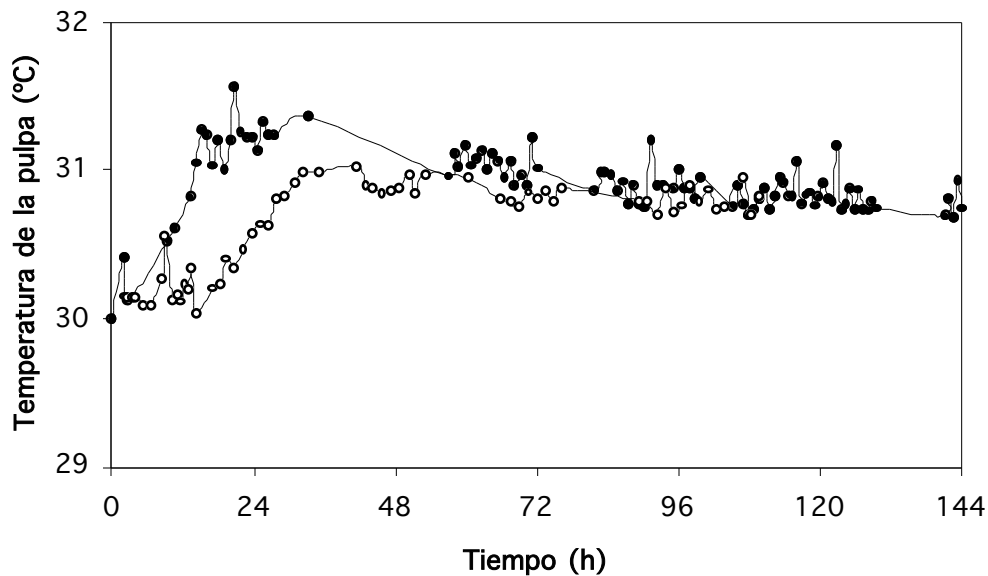


Figura 5.2. Perfil de temperatura en la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune* usando distintas humedades iniciales. (●) 62.1; (○) 71.3 (%).

Las fermentaciones utilizaron en promedio 11 Kg de materia húmeda. La pulpa fue tratada térmicamente manteniendo una presión de 15 psi por 30 minutos. La fermentación con *P. commune* sobre pulpa ensilada de café en un reactor de 4 charolas, cada una con capacidad de 800 g, no presentó problemas de contaminación aun sin aplicar tratamiento térmico al sustrato (Barreto, 2001). Estos resultados plantearon la necesidad de encontrar un tratamiento térmico adecuado, que eliminara la presencia del hongo contaminante. Además, se confirmó que el contenido de humedad inicial cambia los parámetros cinéticos para el crecimiento de *P. commune* y puede favorecer el crecimiento de *Aspergillus* en la FMS de pulpa de café.

5.1.2 Efecto del tratamiento térmico.

El crecimiento de *Aspergillus* indicó que el tratamiento térmico había sido deficiente en la eliminación de la población microbiana natural de la pulpa de café. El calentamiento de sólidos en autoclave no es homogéneo ya que los materiales vegetales presentan problemas en la transmisión del calor. Debido a lo anterior, se probaron tratamientos térmicos donde los sólidos fueron mezclados durante su calentamiento. Los tratamientos se realizaron en el reactor semi-piloto con una velocidad de mezclado de 1 rpm. Los sólidos se calentaron hasta alcanzar una temperatura de 60-76 °C por periodos de 1 a 3 horas. En la mayoría de los casos se aplicó un tratamiento adicional en autoclave. Se buscó así eliminar la población natural y favorecer el crecimiento de *Penicillium*.

Se aplicaron los tres primeros tratamientos (1, 2 y 3) descritos en la Tabla 4.3 de la sección materiales y métodos. La Figura 5.3 muestra la producción de CO₂ por gramo de MSI para cada tratamiento aplicado. La pulpa, con humedad inicial de 64.6 ± 0.7%, se inoculó con una concentración de 9.2x10⁶ ± 1.5x10⁶ esporas/g MHI, el pH promedio inicial fue 4.3 ± 0.06 y el flujo de aire se mantuvo en un valor de 1.1 ± 0.05 mL/ g MHI por minuto. La producción de CO₂ fue similar para los tres niveles de tratamiento. En general ésta disminuyó, con un valor máximo de 196 mg CO₂ g⁻¹ MSI al final de la fermentación con el tratamiento 1. La disminución en la producción de CO₂ indica un menor crecimiento del microorganismo, esto debido al efecto del aumento en la cantidad de energía aplicada durante el tratamiento térmico sobre la concentración de nutrientes o a la formación de sustancias inhibidoras.

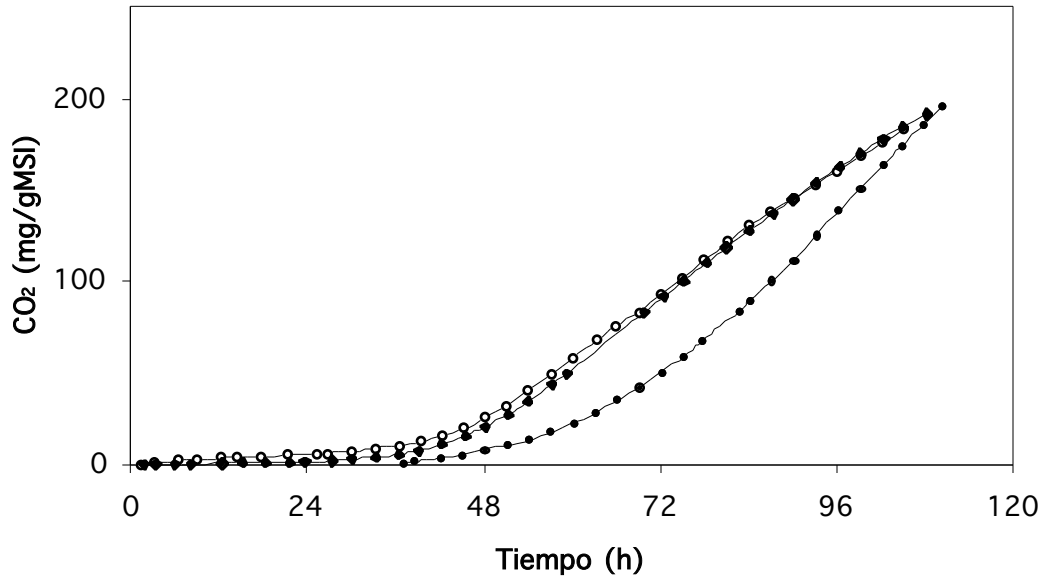


Figura 5.3. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune* usando distintos tratamientos térmicos. (●) 1; (○) 2; (◆) 3. Condiciones iniciales: 64.6% humedad, 9.2×10^6 esporas/gMHI, $\text{pH} = 4.31$, 1.1 mL aire/gMHI min.

Los valores de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (μ) y pH final se reportan en la Tabla 5.2 para los tres tratamientos térmicos usados. A pesar de aumentar los tratamientos térmicos, en todos los casos se presentó crecimiento de *Aspergillus*. En general los tiempos de germinación se prolongaron, se encontraron valores de velocidad específica de crecimiento entre 0.06 y 0.11 h^{-1} y el pH final disminuyó (pH inicial de 4.3) después de un período de fermentación de casi 110 horas.

Tabla 5.2. Efecto del tratamiento térmico sobre la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune*

Tratamiento	Crecimiento de <i>Aspergillus</i>	μ_{CO_2} (h^{-1})	pH final	t_{lag} (h)
1	+	0.06	3.6	51.8
2	+	0.08	3.7	39.8
3	+	0.11	3.6	41.7

La Figura 5.4 muestra el comportamiento de la temperatura durante la fermentación para los tratamientos térmicos empleados. La temperatura inicial en estas fermentaciones fue en promedio 33.3 °C. La temperatura máxima estimada de la pulpa con el tratamiento 1 fue 34.4 °C, mientras que tanto con los tratamientos 2 y 3 fue 34.2 °C. En todos los casos el aumento está relacionado con el incremento en la velocidad de producción de CO₂. Posteriormente, la temperatura descendió ligeramente en los tres casos.

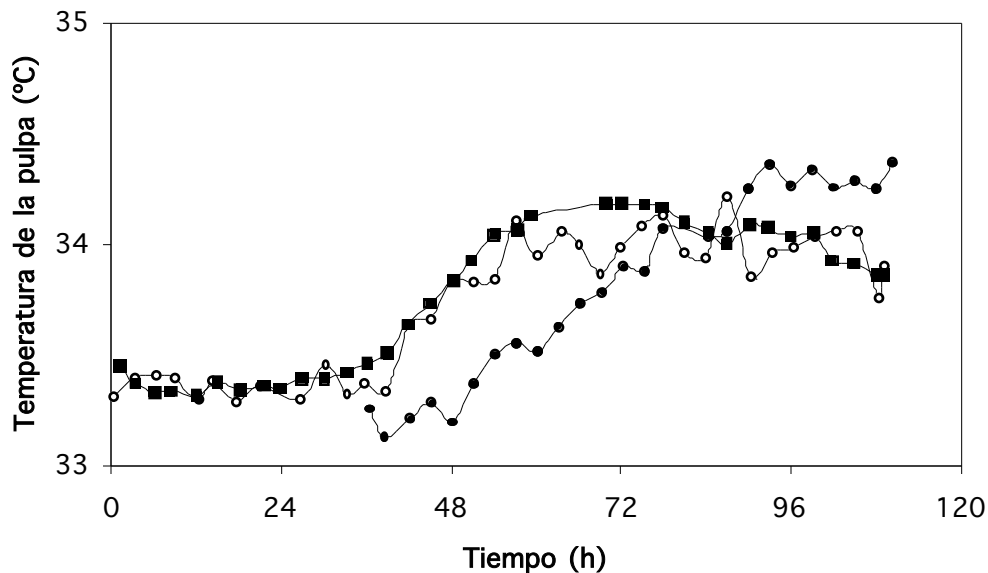


Figura 5.4. Perfil de temperatura en la fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *Penicillium commune* usando distintos tratamientos térmicos. (●) Tratamiento 1; (○) Tratamiento 2; (■) Tratamiento 3.

La cantidad de pulpa utilizada se redujo aproximadamente 1 Kg, es decir un promedio de 9.9 Kg de materia húmeda. En esta parte experimental se obtuvieron temperaturas estimadas mayores, lo cual pudo favorecer el crecimiento del hongo *Aspergillus* (Figura 5.5) como lo reportan Roussos y col. (1995) que obtuvieron del total de cepas aisladas de pulpa de café, 68% de cepas de *Aspergillus* a 35 °C

mientras que a 25 °C solo representaron el 25% del total.

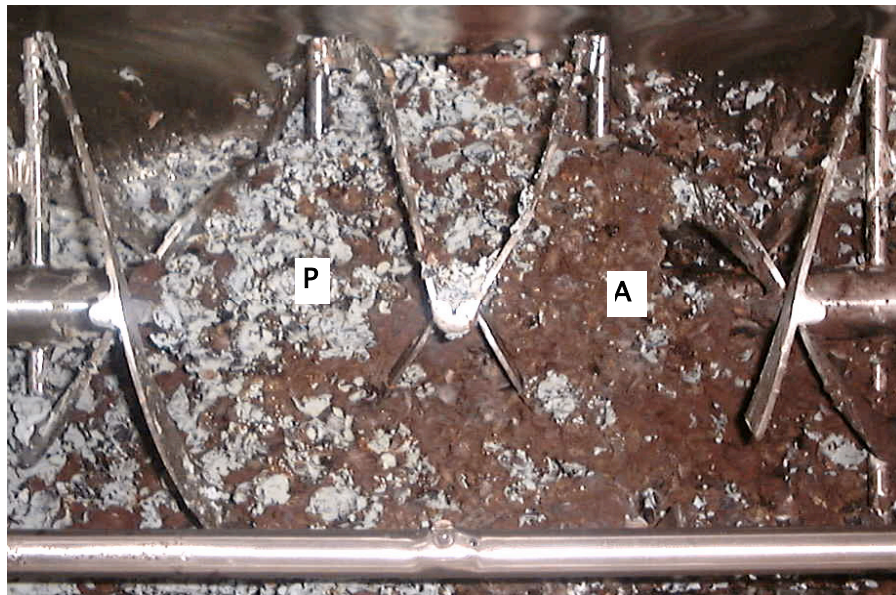


Figura 5.5. Aspecto de la pulpa de café fermentada a nivel semi-piloto durante las pruebas preliminares. P: crecimiento de *Penicillium commune* ; A: crecimiento de *Aspergillus* .

Las condiciones de tratamiento de la pulpa y las condiciones ambientales al inicio de la fermentación aplicadas en esta parte experimental (nivel semi-piloto) favorecieron el desarrollo de *Aspergillus*. El aumento del tratamiento térmico de la pulpa no logró reducir la contaminación. Por lo tanto, fue necesario estudiar los parámetros ambientales y el tratamiento térmico del sustrato en sistemas a nivel laboratorio para establecer las condiciones adecuadas de fermentación de la pulpa de café a nivel semi-piloto.

5.2 Efecto de las condiciones ambientales a nivel laboratorio

Los resultados en el reactor semi-piloto mostraron que el crecimiento de *Aspergillus* era un problema importante a resolver. Se decidió estudiar algunas condiciones ambientales a nivel laboratorio (columnas de fermentación con 100 g de pulpa) para establecer las condiciones que limitaran la contaminación y mantuvieran el crecimiento de la cepa de *Penicillium*. Las variables seleccionadas fueron humedad inicial, el tratamiento térmico, la concentración de inóculo y la temperatura de incubación. Las condiciones seleccionadas fueron aplicadas posteriormente en el reactor semi-piloto.

5.2.1 Efecto de la humedad

La humedad es una variable ambiental importante para el crecimiento de los microorganismos. El límite superior de humedad de la pulpa de café sugerido en el reactor semi-piloto es 65%. Valores superiores impiden un mezclado correcto de los sólidos debido a las características físicas que adquiere el sustrato. Por lo tanto, los niveles de humedad estudiados en este estudio fueron los siguientes: 50, 55, 60 y 65%. El objetivo de este experimento fue la identificación de los límites de humedad en la pulpa de café para la fermentación con *P. commune*.

La Figura 5.6 muestra la producción de CO₂ en cultivos con diferente humedad inicial usando una concentración de inóculo de 1×10^7 esporas/g MHI, temperatura de incubación igual a 30 °C y flujo de aire de 0.5 mL/g MHI por minuto. La producción

final de CO_2 mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) en los diferentes niveles de humedad inicial en el rango de 50 a 65%. El valor máximo fue $556 \pm 19.8 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MSI}$ al final (135 horas) en la fermentación con 65% de humedad inicial. La disminución del contenido de humedad por debajo de 60% afectó considerablemente la producción.

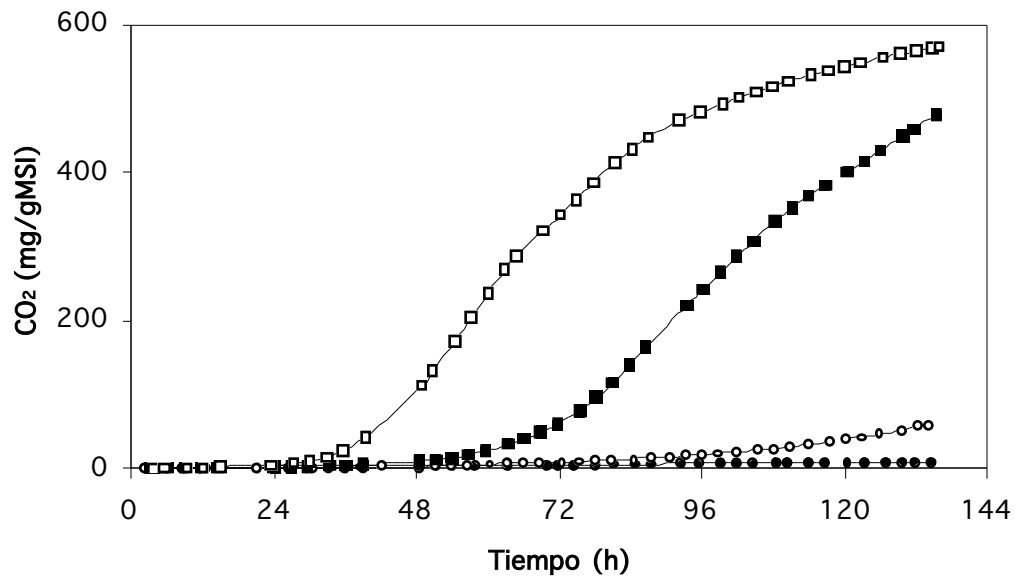


Figura 5.6. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* usando distintas humedades iniciales. (●) 50; (○) 55; (■) 60; (□) 65 (%). Condiciones iniciales: 1×10^7 esporas/gMSI, $\text{pH}=4.3$, $0.5 \text{ mL aire/gMHI min}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los valores promedio de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (μ) y pH final se reportan en la Tabla 5.3 para los cuatro niveles empleados de humedad inicial. En la FMS de pulpa de café a nivel laboratorio con *P. commune* el nivel inicial de humedad, en un rango de 50 a 65%, provocó diferencias significativas en la germinación de las esporas, en el crecimiento y en la actividad degradadora de cafeína del hongo. Los mejores resultados en cuanto a la duración de la fase lag (38.5 h), la velocidad específica de crecimiento (0.12 h^{-1}) y el

pH final (6.7) fueron obtenidos con un nivel de humedad de 65% después de 135 horas de fermentación. En ningún caso hubo crecimiento del hongo *Aspergillus*.

Tabla 5.3. Efecto de la humedad inicial sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel laboratorio

Humedad (%)	ΔCO_2^* (h ⁻¹)	t _{lag} * (h)	pH* final
50	0.01 ± 0.002	134.5 ± 0.29	4.3 ± 0.03
55	0.03 ± 0.002	96.7 ± 4.85	4.3 ± 0.01
60	0.08 ± 0.006	58.2 ± 9.90	5.2 ± 0.15
65	0.12 ± 0.006	38.5 ± 0.67	6.7 ± 0.10

*Diferencia significativa usando análisis de varianza unifactorial (P<0.001).

El contenido mínimo de humedad necesario para el crecimiento de *P. commune* en este trabajo fue 55%, similar al 58% reportado por Domínguez y col. (2001) para la producción de penicilina sobre bagazo de caña con *P. chrysogenum*. El valor máximo de producción de CO₂ se obtuvo al usar 65% de contenido inicial de humedad. Este valor es cercano a los reportados por varios autores para sustratos con un alto contenido de celulosa. Brand y col. (2000) reportaron que un rango de 60 a 70% de humedad inicial influye en la degradación de cafeína y taninos en cáscara de café con *Rhizopus arrhizus* y *Phanerochaete chrysosporium*. Sin embargo, reportaron que al usar *Aspergillus niger* no influye el nivel de humedad. Domínguez y col. (2001) señalan que el rango de humedad adecuado para la producción de penicilina usando bagazo de caña de azúcar y *P. chrysogenum* se encuentra entre 56 y 80%. Asimismo, reportan que el aumento del nivel de humedad estimula la producción de penicilina dentro de dicho rango. En 1987, Considine y col.

reportaron la producción máxima de enzimas extracelulares con contenidos iniciales de humedad entre 60 - 75% para *P. capsulatum* sobre pulpa de remolacha. Sin embargo, Gervais y col. (1988) reportaron que un contenido de agua entre 0.4 y 1.0 g g⁻¹ materia seca, equivalente a 28 y 50%, en discos de celulosa no modifica significativamente las velocidades específica y radial de crecimiento de *P. roqueforti*. Maheva y col. (1984) indican que con un contenido de 0.48 g agua g⁻¹ de materia seca (32%) se obtuvo un máximo de esporulación de la misma especie.

La diferencia en los valores puede ser explicada considerando que cada sustrato posee una relación distinta entre el contenido de humedad y la actividad de agua. Varios autores han reportado una mayor influencia de la actividad de agua que otros factores como la temperatura, sobre las velocidades de crecimiento y el tiempo de germinación de algunas especies del género *Penicillium* (Sautor y col., 2001a; Sautor y col., 2001b; Gervais y col., 1988). Por lo tanto, es posible que en el rango de humedades probadas en la pulpa de café, ésta presente una variación importante en la actividad de agua.

El contenido de humedad inicial de 65% y un tiempo de fermentación de 120 horas fueron seleccionados para las siguientes fermentaciones ya que permiten un buen crecimiento del hongo y una alta tasa de degradación de cafeína como lo sugiere el pH final alcalino.

5.2.2 Efecto del tratamiento térmico del sustrato

Los resultados de las fermentaciones a nivel semi-piloto indicaron que el tratamiento térmico era una variable importante. Por lo que se planteó estudiarla a nivel laboratorio (columnas de 100 g) para encontrar un tratamiento adecuado que permitiera eliminar el crecimiento de la población natural y favorecer el crecimiento de *Penicillium commune*. Los tratamientos empleados se encuentran descritos en las Tablas 4.2 y 4.3 de la sección materiales y métodos. Sin embargo, éstos no pudieron ser comparados directamente por las variaciones en la cantidad de pulpa tratada, la duración de los periodos de mantenimiento o por el uso o no de mezclado. Por lo que cada tratamiento fue renombrado según la cantidad de energía recibida por la pulpa (Tabla 4.4). Los tratamientos fueron clasificados como “estáticos” cuando la energía recibida fue baja (554-1541 KJ/Kg) o “combinados” cuando la energía recibida fue mayor (5519-13610 KJ/Kg). Los tratamientos estáticos fueron resultado del calentamiento de la pulpa en autoclave. Por otra parte los tratamientos combinados se fueron obtenidos cuando el calentamiento se combinó con el mezclado del sustrato en el reactor semi-piloto.

Los primeros resultados corresponden a los tratamientos estáticos. La Figura 5.7 muestra la producción de CO₂ a nivel laboratorio con cada tratamiento térmico. Las condiciones iniciales fueron: humedad de 64.7%, concentración de inóculo de 1x10⁷ esporas/gMHI, temperatura de incubación de 30 °C y flujo de aire de 1 mL/g MHI por minuto. La producción final de CO₂ mostró diferencia significativa ($p < 0.01$) en los diferentes tratamientos térmicos. El valor máximo fue 539 mg CO₂ g⁻¹ MSI al usar 1158 KJ/Kg de pulpa.

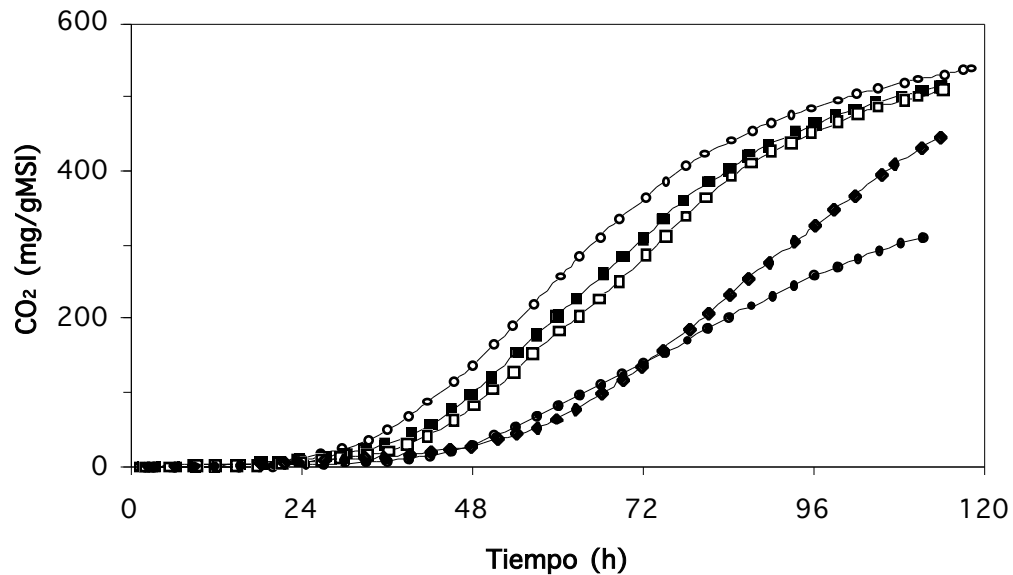


Figura 5.7. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* usando diferentes tratamientos térmicos. (●) 554; (○) 1158; (■) 1272; (□) 1398; (◆) 1541 (KJ/Kg de pulpa). Condiciones iniciales: 64.7% humedad, 1×10^7 esporas/gMHI, pH=4.35, 1.0 mL aire/gMHI min, 30°C.

Los valores promedio de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (\square) y pH final se reportan en la Tabla 5.4 para los tratamientos estáticos. En la FMS de pulpa de café a nivel laboratorio con *P. commune*, la aplicación de estos tratamientos provocó diferencias significativas sobre la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio, así como en el pH final de la pulpa.

Al usar 1158 KJ/Kg de pulpa se obtuvieron los mejores resultados de tiempo de germinación (31.6 h) y de pH final (7.5) mientras que con tratamientos mayores disminuyó el pH final y aumentó el tiempo de germinación. La velocidad específica de crecimiento se mantuvo constante con tratamientos entre 554 y 1398 KJ/Kg. Por lo tanto, la aplicación de tratamientos por encima de 1158 KJ/kg retrasa la germinación de las esporas de *Penicillium*. Con ningún de estos tratamientos estáticos

Tabla 5.4. Efecto del tratamiento térmico en autoclave del sustrato sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel laboratorio

Tratamiento (KJ/Kg)	μ_{CO_2} * (h ⁻¹)	t _{lag} * ** (h)	pH final**
554	0.12 ± 0.020	41.8 ± 1.19	6.6 ± 0.19
1158	0.11 ± 0.004	31.6 ± 2.36	7.5 ± 0.05
1272	0.10 ± 0.001	36.2 ± 0.18	7.4 ± 0.11
1398	0.10 ± 0.003	37.9 ± 0.86	7.3 ± 0.09
1541	0.07 ± 0.006	53.2 ± 0.38	6.8 ± 0.05

*P<0.05 en ANOVA unifactorial; ** P<0.001 en ANOVA unifactorial *** En ningún nivel hubo crecimiento de *Aspergillus*.

se presentó crecimiento de *Aspergillus*. Además, la producción final de esporas no mostró diferencia significativa y se obtuvo un promedio de 6.04×10^8 esporas g⁻¹ materia húmeda.

Los resultados de la fermentación a nivel laboratorio empleando tratamientos combinados se presentan a continuación. La Figura 5.8 muestra la producción de CO₂ usando pulpa con estos tratamientos térmicos. Se utilizó una humedad de 64.8%, 9.7×10^6 esporas/g MHI como inóculo, 30 °C como temperatura de incubación y 0.9 mL de aire/gMHI por minuto. La producción final de CO₂ mostró diferencia significativa ($\alpha < 0.01$) con los tratamientos térmicos. El valor máximo fue 478 ± 49.8 mg CO₂ g⁻¹ MSI al usar 5687 KJ/Kg de pulpa.

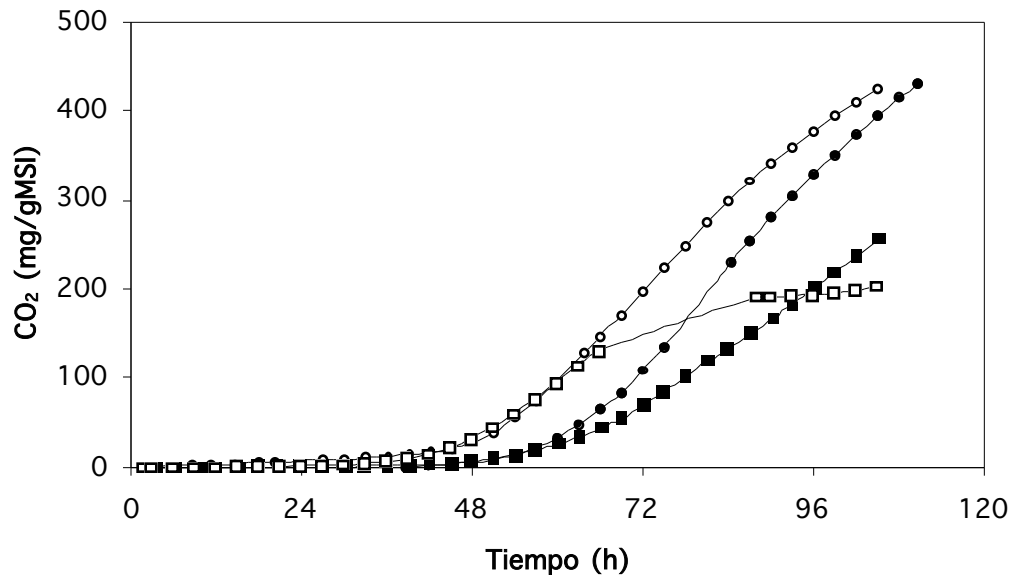


Figura 5.8. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* usando distintos tratamientos térmicos del substrato. (●) 5519; (○) 5687; (■) 9597; (□) 13610 (KJ/Kg de pulpa). Condiciones iniciales: 64.8% humedad, 9.7×10^6 esporas/gMHI, $\text{pH}=4.31$, 0.9 mL aire/gMHI min, 30 °C.

La Tabla 5.5 presenta los valores promedio de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (μ) y pH final para los tratamientos térmicos combinados. En la FMS de pulpa de café a nivel laboratorio con *P. commune*, la aplicación de dichos tratamientos provocó diferencias significativas en la germinación de las esporas, en el crecimiento y en la actividad degradadora de cafeína del hongo. Sin embargo, con estos tratamientos térmicos se favoreció el crecimiento de *Aspergillus*. Aunque las velocidades de crecimiento son relativamente altas, los tiempos de germinación son mayores, y además el pH final desciende por debajo de 4.0 en todos los casos. Lo cual puede deberse a la producción de ácidos por parte de *Aspergillus* y a su incapacidad para degradar cafeína.

Tabla 5.5. Efecto del tratamiento térmico en reactor del sustrato sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel laboratorio

Tratamiento (KJ/Kg)	Crecimiento de <i>Aspergillus</i>	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	pH final**	t _{lag} *** (h)
5519	+	0.15 ± 0.002	3.2 ± 0.08	56.2 ± 4.65
5687	+	0.11 ± 0.003	3.2 ± 0.02	49.9 ± 3.22
9597	+	0.09 ± 0.017	3.7 ± 0.21	59.4 ± 0.49
13610	+	0.14 ± 0.002	3.9 ± 0.12	42.8 ± 1.08

* p<0.01 en ANOVA unifactorial; ** p<0.001 en ANOVA unifactorial;

*** p<0.05 en ANOVA unifactorial

Trabajos previos han señalado la necesidad de aplicar tratamiento térmico a la pulpa de café fresca y ensilada para favorecer la degradación de cafeína (Biopulca annual report year 2, 2000). Sin embargo, ningún trabajo previo había estudiado el efecto que tiene la cantidad de energía recibida por el sustrato durante el calentamiento sobre las variables indicadoras del crecimiento de los hongos. Expresar los tratamientos térmicos como la energía acumulada durante el calentamiento permite aplicar esta variable independientemente de la cantidad de masa utilizada.

En comparación con el tratamiento en autoclave, los tratamientos en el reactor permitieron aplicar más energía sobre el sustrato a pesar de utilizar temperaturas relativamente bajas debido en gran parte a la aplicación de mezclado durante el calentamiento. El aumento de energía provocó un cambio importante en el resultado final de la fermentación: una “inhibición” del crecimiento de *P. commune* permitiendo el desarrollo de la microflora natural sobreviviente (principalmente *Aspergillus*).

Este cambio puede ser explicado considerando la transformación de los compuestos fenólicos de la pulpa en sustancias tóxicas por la acción del calentamiento. Se ha encontrado que el café tostado posee actividad mutagénica y antibacteriana en un amplio rango de bacterias (Daglia y col., 2000). Se ha reportado que algunos antioxidantes fenólicos como el butilhidroxianisol, el butilhidroxitolueno y el propilgalato tienen actividad antifúngica. Las especies del género *Penicillium* mostraron una mayor susceptibilidad a estos compuestos que el género *Aspergillus* (Giridhar y Reddy, 2001). Por su parte, González de Colmenares y col. (1998) reportan que un extracto de pulpa de café puede inhibir la germinación *in vitro* de las esporas de *Hemileia vastratix*.

La aplicación de tratamientos térmicos estáticos permitió determinar los niveles adecuados de energía que debe recibir la pulpa de café para su fermentación sin contaminación. Este conocimiento permite aplicar tratamientos adecuados de cantidades mayores de sustrato en sistemas de una manera más uniforme en sistemas con mezclado. Finalmente, se propuso utilizar tratamientos térmicos entre 554 y 1272 KJ/Kg de pulpa para los estudios posteriores.

5.2.3 Efecto de la concentración del inóculo

A nivel semi-piloto se utilizó un tamaño de inóculo cercano a 1×10^7 esporas/g MHI. La concentración de esporas tiene un efecto directo en la duración de las fases de crecimiento de los hongos. Además influye en la aparición de contaminación, ya que el aumento en la concentración de esporas disminuye la posibilidad de creci-

miento de otros microorganismos. Por lo tanto, se estudió el efecto de la concentración de inóculo a nivel laboratorio como variable ambiental con cuatro niveles: 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas/g pulpa húmeda.

La Figura 5.9 muestra la producción de CO_2 usando diferentes tamaños de inóculo en un medio con 65.6% de humedad y 4.37 de pH promedio inicial. El tratamiento térmico se aplicó en autoclave con un valor de 1275 KJ/Kg de pulpa (condiciones: 1Kg de pulpa húmeda a 121 °C por 20 min). Se aplicó un flujo de aire de 1 mL/g MHI por minuto con una temperatura de incubación de 30 °C. La producción final de CO_2 no mostró diferencia significativa para las concentraciones de inóculo empleadas. El valor promedio fue 553 ± 31.7 mg CO_2 g⁻¹ MSI.

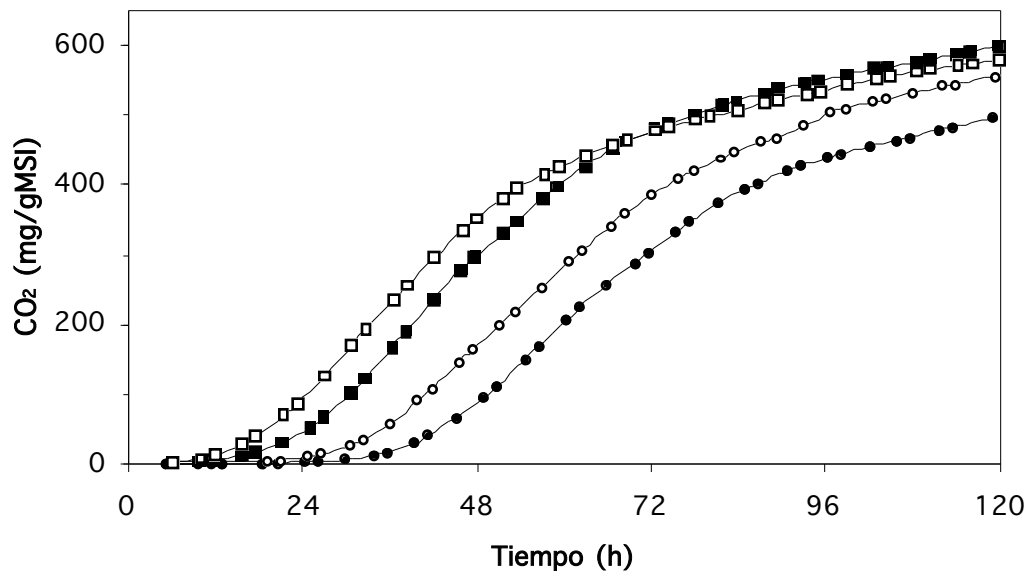


Figura 5.9. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* usando distintas concentraciones de esporas. (●) 10^5 ; (○) 10^6 ; (■) 10^7 ; (□) 10^8 (esporas/gMHI). Condiciones iniciales: 65.6 % humedad, pH= 4.37, 1.0 mL aire/gMHI min, 30 °C.

Los valores promedio de tiempo de germinación (t_{lag}), velocidad específica de crecimiento (μ) y pH final se reportan en la Tabla 5.6 para las cuatro concentraciones

de inóculo empleadas. En la FMS de pulpa de café a nivel laboratorio con *P. commune*, la concentración del inóculo, en un rango de 1×10^5 a 1×10^8 esporas/g MHI, provocó diferencias significativas en la germinación de las esporas y en la actividad degradadora de cafeína del hongo. Sin embargo no se presentaron diferencias significativas en los valores de velocidad específica de crecimiento, con un promedio de 0.14 h^{-1} . Los mejores resultados sobre el tiempo de germinación (15 h) y pH final (7.6) fueron obtenidos al usar una concentración de 1×10^8 esporas/g MHI. Con ninguna concentración hubo contaminación con *Aspergillus*. La producción final de esporas no mostró diferencia significativa entre los valores de concentración con un promedio de 5.8×10^8 esporas g^{-1} de pulpa fermentada.

Tabla 5.6. Efecto de la concentración de esporas sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel laboratorio

Inóculo (esporas/gMHI)	μ_{CO_2} (h^{-1})	pH final*	tiempo** (h)
1×10^5	0.14 ± 0.029	7.3 ± 0.05	38.0 ± 1.15
1×10^6	0.13 ± 0.028	7.4 ± 0.10	29.2 ± 0.64
1×10^7	0.15 ± 0.030	7.5 ± 0.17	21.6 ± 0.30
1×10^8	0.12 ± 0.042	7.6 ± 0.07	15.0 ± 0.09

* $P < 0.05$ en ANOVA unifactorial; ** $P < 0.001$ en ANOVA unifactorial

La combinación de tratamiento térmico y concentración de esporas en este experimento hizo posible que aún a niveles tan bajos como 10^5 esporas/g MHI no se presentara crecimiento de *Aspergillus*. Aunque todas las variables de respuesta mostraron diferencia significativa, hubo un nivel de significancia mayor en cuanto al efecto de la concentración sobre el tiempo de germinación. El aumento del tiempo

de germinación con la disminución del inóculo ha sido reportado para *Listeria monocytogenes* (Augustin y col., 2000) y para esporas de *Aspergillus niger* en FMS (Arasaratnam y col., 2001). Estos resultados sugieren que la concentración de esporas no es una variable tan importante para el control de la contaminación como lo son la humedad y el tratamiento térmico.

Un tamaño de inóculo de 10^8 permitió obtener los mejores resultados. Sin embargo, las necesidades de área superficial para la producción de esporas a este nivel son muy grandes, incluso a nivel laboratorio, por lo cual se mantuvo el nivel de 10^7 esporas/g MHI para las siguientes fermentaciones.

5.2.4 Efecto de la temperatura

La temperatura determina la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Cada uno tiene una temperatura óptima para su crecimiento. A nivel semi-piloto es difícil mantener la temperatura de los sólidos constante durante una fermentación. Pero a nivel laboratorio es fácil realizar estudios que permitan evaluar el efecto de la temperatura sobre las fases de crecimiento de un hongo. Este estudio se dividió en dos partes, en una se evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre la germinación de las esporas y en la otra se evaluó el cambio en el crecimiento del micelio con la temperatura. La primera parte se realizó con cultivos isotérmicos, con las siguientes temperaturas de incubación: 20, 25, 28, 30, 32 y 35 °C. La segunda parte fue hecha con esporas germinadas a 30 °C y posteriormente incubadas a diferentes temperaturas (25, 28, 30 y 35 °C) durante el crecimiento del micelio .

La Figura 5.10 muestra la producción de CO₂ con diferentes temperaturas de incubación usando pulpa con humedad de 64.4%, pH promedio inicial de 4.3 e inoculada con 1x10⁷ esporas/g MHI. Se aplicó un tratamiento térmico de 1188 KJ/Kg de pulpa (1 Kg a 121°C por 10 minutos). El flujo de aire aplicado fue de 1 mL/g MHI por minuto. La producción final de CO₂ mostró diferencia significativa ($\square < 0.001$) para las temperaturas empleadas. El valor máximo fue 503 ± 30.5 mg CO₂ g⁻¹ MSI con una temperatura de incubación de 28 °C.

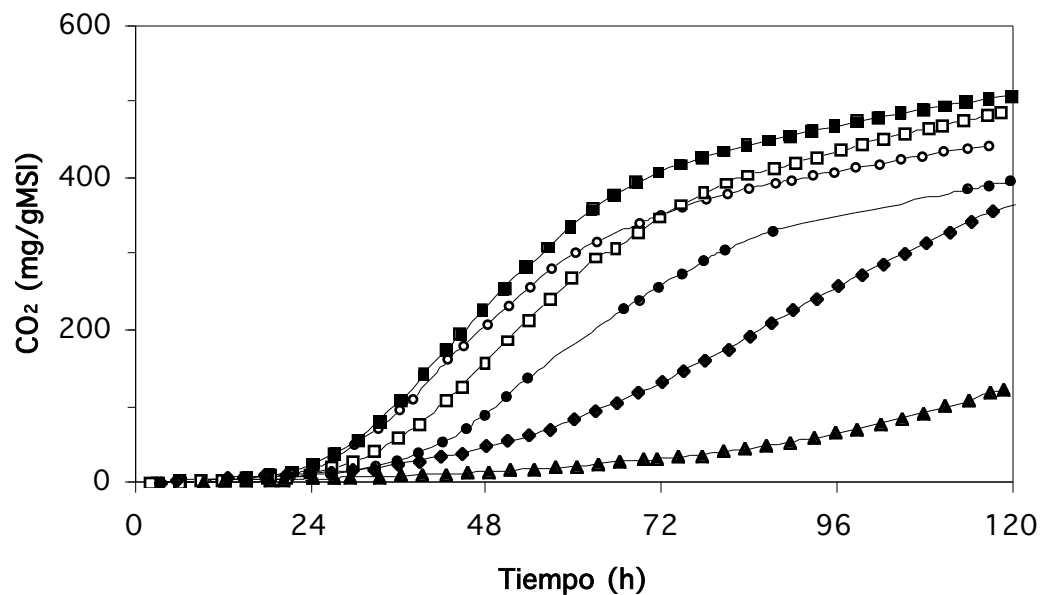


Figura 5.10. Cinéticas de producción de CO₂ en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* usando distintas temperaturas. (●) 20; (○) 25; (■) 28; (□) 30; (◆) 32; (▲) 35 °C. Condiciones iniciales: 64.4% humedad, 1X10⁷ esporas/g MHI, pH 4.3, 1.0 mL aire/g MHI min.

Los valores promedio de velocidad específica de crecimiento, tiempo de germinación y pH final se reportan en la Tabla 5.7 para seis fermentaciones isotérmicas. En la FMS de pulpa de café a nivel laboratorio con *P. commune*, la temperatura de incubación, en un rango de 20 a 35 °C provoca diferencias significativas sobre dichas variables indicadoras de la germinación de las esporas, crecimiento y actividad descafeinasa del hongo. Sautor y col. (2001a) reportan un fuerte efecto de la

temperatura sobre el tiempo de germinación de *P. chrysogenum*. Los mejores resultados sobre el tiempo de germinación (24 h) y pH final (7.8) fueron obtenidos al usar una temperatura de 25 °C después de 120 horas de fermentación. Sólo las columnas incubadas a 35 °C presentaron crecimiento de *Aspergillus*. La producción de esporas de *P. commune* también mostró diferencia significativa para las temperaturas probadas (Tabla 5.7). La incubación a 20 °C permitió obtener el máximo de producción de 7.7×10^8 esporas g^{-1} MHF.

Tabla 5.7. Efecto de la temperatura de incubación sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel laboratorio

Temperatura (°C)	Esporas de <i>P. commune</i> * (por g MHF)	\square_{CO_2} * (h ⁻¹)	pH final*	t _{lag} * (h)
20	$7.7 \pm 1.4 \times 10^8$	0.09 ± 0.01	7.5 ± 0.07	34.8 ± 2.78
25	$7.6 \pm 0.8 \times 10^8$	0.15 ± 0.03	7.8 ± 0.03	24.1 ± 0.85
28	$5.8 \pm 1.0 \times 10^8$	0.15 ± 0.01	7.6 ± 0.30	24.9 ± 0.20
30	$5.5 \pm 1.2 \times 10^8$	0.13 ± 0.01	7.5 ± 0.24	29.7 ± 0.72
32	$4.0 \pm 2.5 \times 10^7$	0.07 ± 0.01	7.1 ± 0.28	46.0 ± 1.22
35	$2.8 \pm 0.4 \times 10^7$	0.03 ± 0.01	3.7 ± 0.13	75.3 ± 1.05

* P < 0.001 en ANOVA unifactorial

El objetivo de la segunda parte del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura únicamente sobre la velocidad de crecimiento del micelio. La Figura 5.11 presenta la producción de CO₂ en las fermentaciones con esporas germinadas a 30 °C e incubadas entre 25 y 35 °C. Los valores iniciales fueron: humedad, 64.3%; pH promedio, 4.3; inóculo, 1×10^7 esporas/gMHI. Se utilizó un flujo de 1 mL de aire húmedo/gMHI durante la fermentación. La producción total de CO₂ mostró diferen-

cia significativa ($\square < 0.001$) para las temperaturas probadas. La máxima producción de 496 ± 7.1 mg CO_2 /g MSI se obtuvo con 32°C como temperatura de incubación.

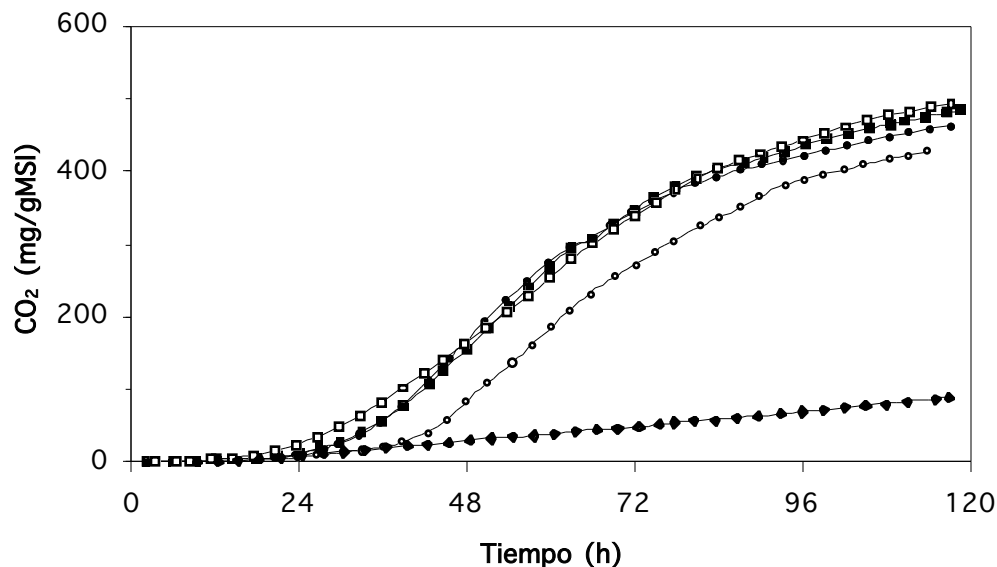


Figura 5.11. Cinéticas de producción de CO_2 en la fermentación a nivel laboratorio de pulpa de café con *P. commune* con esporas germinadas a 30°C usando distintas temperaturas. (●) 25; (○) 28; (■) 30; (□) 32; (◆) 35 °C. Condiciones iniciales: 64.3 % humedad, 1×10^7 esporas/g MHI, pH=4.32, 1.0 mL aire/g MHI min.

Se determinó diferencia significativa en el pH de la pulpa fermentada. Encontrándose en un rango pequeño (7.1 a 7.7) al usar temperaturas entre 25 y 32°C . Mientras que con 35°C , se obtuvo 3.9 como pH final. La producción de esporas de *Penicillium* disminuyó significativamente con el aumento de la temperatura, con 7.7×10^8 esporas/g MHF a 25°C y 7.6×10^7 esporas/g MHF a 35°C . Aunque a esta última temperatura también hubo crecimiento de *Aspergillus*, éste fue menor comparado con la columna incubada isotérmicamente a 35°C .

La Figura 5.12 muestra el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento del micelio de *P. commune* cuando la germinación de las esporas se reali-

zó a 30 °C. Han y Nout (2000) así como Smits y col. (1998) han utilizado la ecuación de Ratkowsky (5.1) para describir el comportamiento de los hongos *Rhizopus microsporus* y *Trichoderma reesei*. El comportamiento de *Penicillium commune* también pudo describirse con el modelo de Ratkowsky con un valor de 0.96 como coeficiente de correlación.

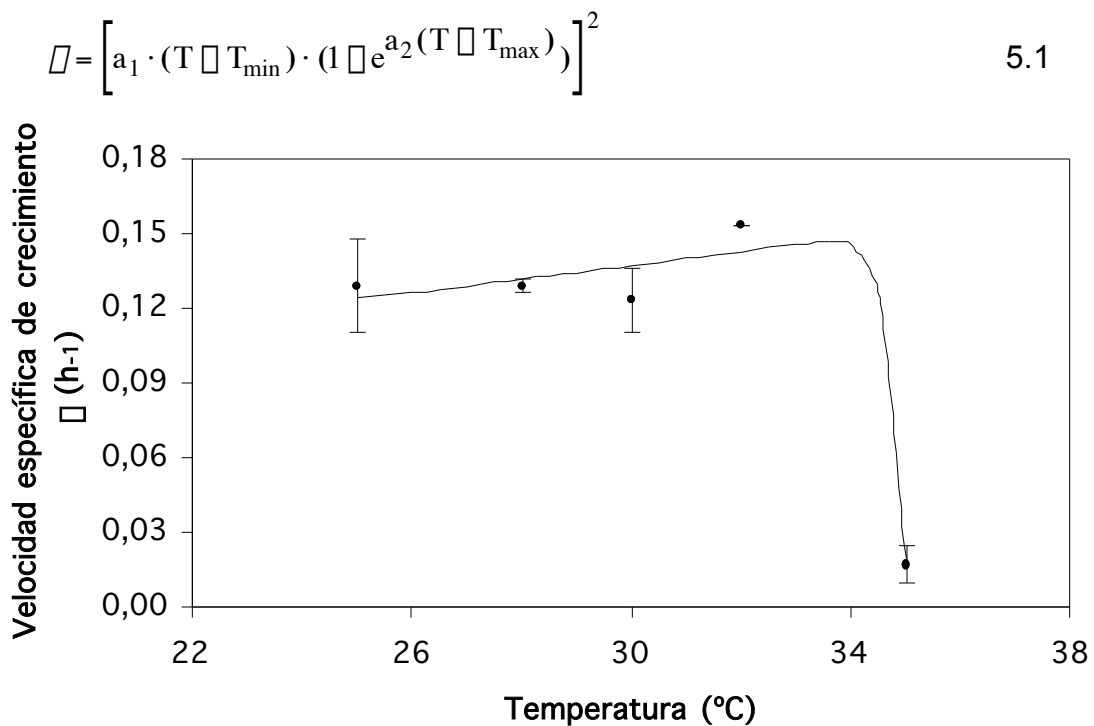


Figura 5.12. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) de *P. commune* en pulpa de café. (●) Datos experimentales; (—) Ajuste de la ecuación de Ratkowsky.

En contraste con la temperatura óptima de 28 °C para los cultivos isotérmicos, el máximo estimado de μ (0.146 h⁻¹) se obtuvo a 33.6 °C. La temperatura máxima y mínima para el crecimiento encontradas con esta ecuación son $35.1 \pm 1.69 \times 10^{-10}$ y -68.8 ± 34.9 °C respectivamente. La temperatura mínima es un valor demasiado bajo para corresponder con un valor real, por lo que para obtener un valor más rea-

lista es necesario aumentar las temperaturas probadas por debajo de 25 °C. La constante a_1 tiene un valor de $0.0037 \pm 0.0013 \text{ h}^{-1} \text{ °C}^{-1}$ mientras que a_2 es igual a $4.12 \pm 28.34 \text{ °C}^{-1}$. Sin embargo, la temperatura máxima coincide con la limite superior de crecimiento de *Penicillium* en la fermentación a 35 °C. Es importante señalar que este trabajo emplea un sustrato complejo y el nivel de ajuste es también bueno.

Como se observa en la gráfica 5.12 el aumento de velocidad de crecimiento es muy bajo, de 0.13 a 0.15 entre 25 y 32 °C. Esto supone la existencia de limitaciones en la difusión de nutrientes durante el proceso como lo indica el bajo valor de energía de activación (cercano a 2.7 Kcal/mol) obtenido de la gráfica de Arrhenius. La energías de activación típicas para el crecimiento se encuentran entre 15-20 Kcal/mol y las de la difusión molecular están alrededor de 6 Kcal/mol (Wang, 1979). Esta limitación puede ser el resultado del crecimiento del hongo en los espacios interpartícula.

La temperatura es uno de los parámetros más significativos en los trabajos sobre el efecto de las variables ambientales en el crecimiento de hongos (Sautor y col., 2001a, 2001b). Como en el estudio de Han y Nout. (2000), las esporas usadas fueron germinadas previamente a la misma temperatura para estandarizar las condiciones de crecimiento del micelio y excluir el efecto de otros factores sobre la germinación de las esporas de *Penicillium commune*. La velocidad de crecimiento calculada con esta consideración mostró un efecto positivo en el rango de 25 a 32 °C. Reportado también para *Penicillium chrysogenum* sobre medio sólido (Sautor y col., 2001b). Además, la temperatura óptima para el crecimiento del micelio, esti-

mada con el modelo de Ratkowsky, es diferente a la temperatura óptima para la germinación de las esporas. Así se obtuvo el tiempo de germinación más corto a 25 °C pero la máxima velocidad de crecimiento a 32 °C. Se seleccionó como temperatura de incubación 25 °C para los estudios a nivel semi-piloto.

5.3 Estudios a nivel semi-piloto

Los estudios del tratamiento térmico del sustrato y de las condiciones ambientales (humedad, inóculo y temperatura) a nivel laboratorio permitieron seleccionar los valores que fueron aplicados en la fermentación a nivel semi-piloto. Además, se probaron dos estrategias de mezclado de los sólidos. Una de ellas, denominada intermitente, consistió en la agitación periódica de los sólidos (50 segundos a 1 rpm cada 2 horas). La continua consistió en agitar ininterrumpidamente a 0.25 rpm. Ambas estrategias comenzaron después de un período estático de 20 horas para no influir en la germinación.

La Figura 5.13 muestra la producción de CO₂ a nivel semi-piloto usando pulpa de café con una humedad y pH promedio de 64.8% y 4.26 respectivamente, una concentración de inóculo de 1X10⁷ esporas/g MHI y flujo de 1.2 mL de aire/g MHI por minuto. La temperatura inicial de incubación fue 25 °C. Cada kilogramo de pulpa recibió entre 532 - 689 KJ durante el tratamiento térmico (7-7.6 Kg de pulpa a 121 °C por 10 minutos). La producción final de CO₂ mostró diferencia para las estrategias de mezclado empleadas a nivel semi-piloto. El valor máximo fue 340 mg CO₂ g⁻¹ MSI para la fermentación con agitación intermitente. En condiciones similares

se obtuvo una producción de CO₂ a nivel laboratorio de 361.7 ± 75.7 mg CO₂/gMHI como valor promedio.

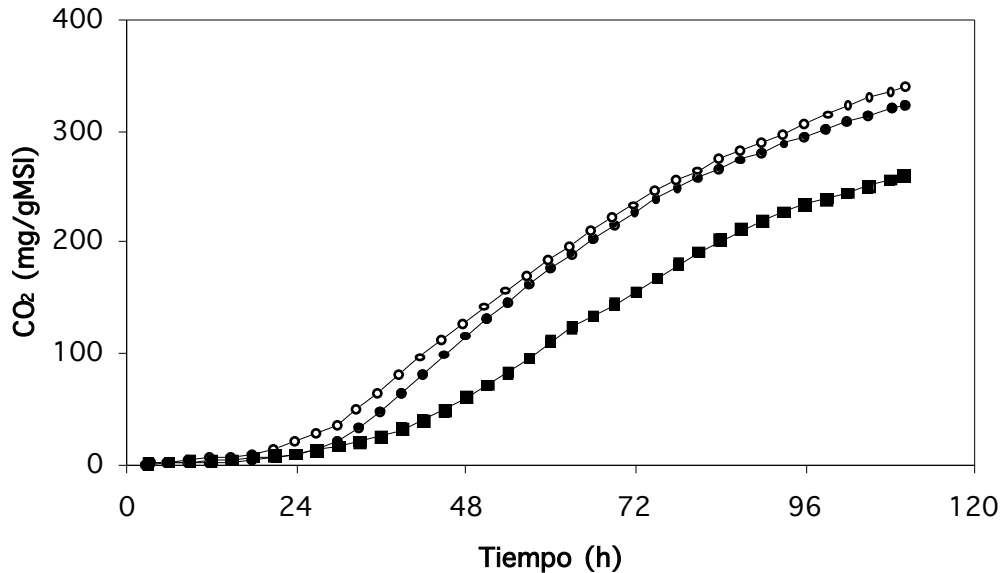


Figura 5.13. Cinéticas de producción de CO₂ en la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel semi-piloto. (●) Estática; (○) Mezclado intermitente; (■) Mezclado continuo. Condiciones iniciales: 64.8% humedad, 1×10^7 esporas/gMHI, pH=4.26, 1.2 mL aire/gMHI min.

En cada estrategia, se utilizaron columnas de fermentación a nivel semi-piloto, las cuales fueron incubadas a temperatura constante de 25 °C. La gráfica 5.14 A presenta la producción relativa de CO₂, es decir, el cociente de la producción a nivel semi-piloto sobre la producción a nivel laboratorio. Las tres estrategias de mezclado presentaron valores superiores a la unidad al inicio de la fermentación, sin embargo, solo la fermentación estática mantuvo esta tendencia hasta el final. El máximo valor de producción relativa se presentó en la fermentación con mezclado intermitente alrededor de las 21 horas mientras que las dos restantes lo presentaron entre las 36-39 horas. En ningún caso, la temperatura superó los 33.6 °C, temperatura máxima para el micelio (Figura 5.14 B).

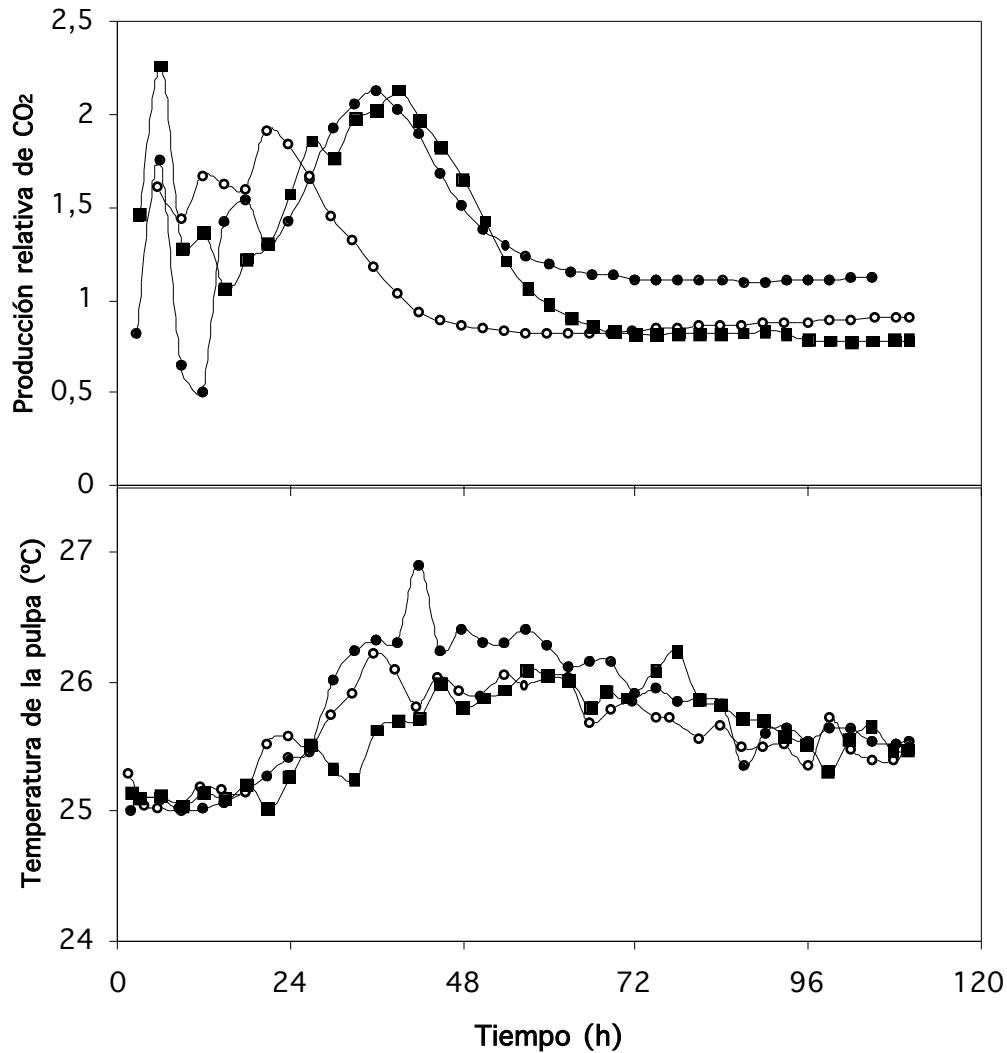


Figura 5.14. Fermentación a nivel semi-piloto de pulpa de café con *P. commune* usando distintas estrategias de mezclado. A) Producción relativa de CO₂ (nivel semi-piloto/nivel laboratorio) B) Perfil de temperatura estimada. (●) sin mezclado; (○) mezclado intermitente; (■) mezclado continuo.

En la fermentación estática, el descenso en la producción relativa pudo estar relacionado con un fuerte crecimiento en los límites del lecho provocando que los espacios entre partículas se ocuparan totalmente por el micelio y reduciendo la transferencia de gases. En la fermentación intermitente el descenso está relacionado con el inicio del mezclado (20 horas). En este caso, se presentó una combi-

nación del efecto negativo del mezclado y la poca transferencia de gases al interior del lecho. En la fermentación continua, sin embargo, el inicio del mezclado coincide con un aumento en la producción relativa. Los efectos negativos del mezclado pudieron ser compensados por la transferencia mejorada de gases al interior del lecho, permitiendo un mejor crecimiento del hongo en la parte interna de la pulpa de café a lo largo del lecho.

Los valores de tiempo de germinación (t_{lag}) y velocidad específica de crecimiento (μ) se reportan en la Tabla 5.8 para las tres estrategias de mezclado empleadas. Los resultados de cada estrategia se compararon con la fermentación a nivel laboratorio en forma de porcentajes. En la FMS de pulpa de café a nivel semi-piloto con *P. commune*, cada estrategia de mezclado provocó diferencias en la germinación de las esporas y en el crecimiento del hongo. Con la fermentación estática la velocidad de crecimiento fue 33.8% más grande comparada con la obtenida a nivel laboratorio, mientras que con cualquier tipo de mezclado permaneció por debajo de dicho valor. En cambio, el tiempo de germinación disminuyó en los tres casos, obteniéndose la mayor disminución con el mezclado continuo.

Tabla 5.8. Efecto de la frecuencia de mezclado sobre la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel semi-piloto

Frecuencia de mezclado	μ_{CO_2} * (h ⁻¹)	t_{lag} * (h)
Sin mezclado	0.16 (133.8)	26.1 (75.8)
Intermitente	0.10 (75.4)	22.0 (77.8)
Continua	0.07 (73.4)	32.2 (67.4)

* Los números en los paréntesis indican el porcentaje que representa con respecto al valor en la fermentación a nivel laboratorio

En ninguna fermentación a nivel semi-piloto se presentó crecimiento de *Aspergillus* (Figura 5.15). La producción de esporas de *Penicillium* también mostró diferencia para las estrategias de mezclado. El mezclado continuo provocó un aumento del 33% en la producción (10.6×10^8 esporas g^{-1} MHF) con respecto al nivel laboratorio. Este aumento puede relacionarse con una mayor proporción de pulpa con buena transferencia de gases. Por otra parte, cuando se emplean fermentaciones estáticas y mezcladas intermitentemente hay una disminución en la producción de las esporas de 46% y 50% respectivamente en relación al nivel laboratorio.

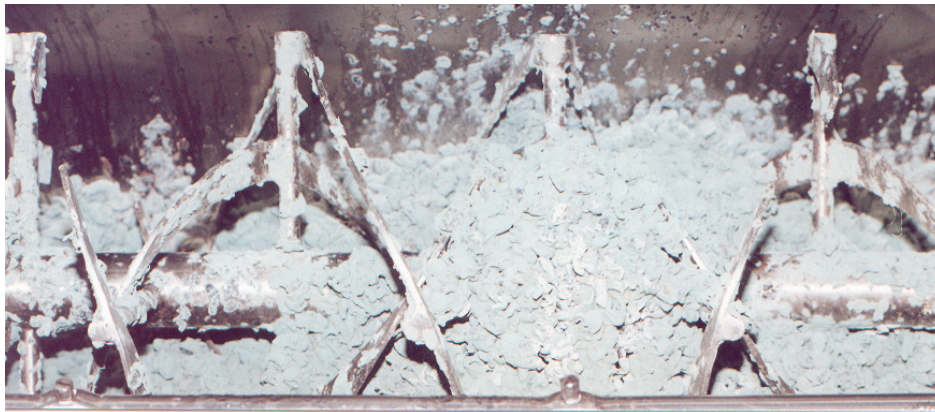


Figura 5.15. Aspecto de la pulpa de café fermentada a nivel semi-piloto con las condiciones de la Figura 5.13 obtenidas a nivel laboratorio. No se aplicó mezclado, presentando únicamente crecimiento de *P. commune*.

La Figura 5.16 muestra el pH de la pulpa de café después de 110 horas de fermentación con *P. commune*. El valor máximo (7.4 ± 0.06) se presentó con agitación continua. Sin embargo, este valor no presenta diferencia significativa al compararse junto con el pH obtenido al utilizar agitación continua (7.2 ± 0.12) y en la fermentación a nivel laboratorio (7.2 ± 0.47). Pero la fermentación estática tuvo un pH significativamente inferior (5.8 ± 0.15).

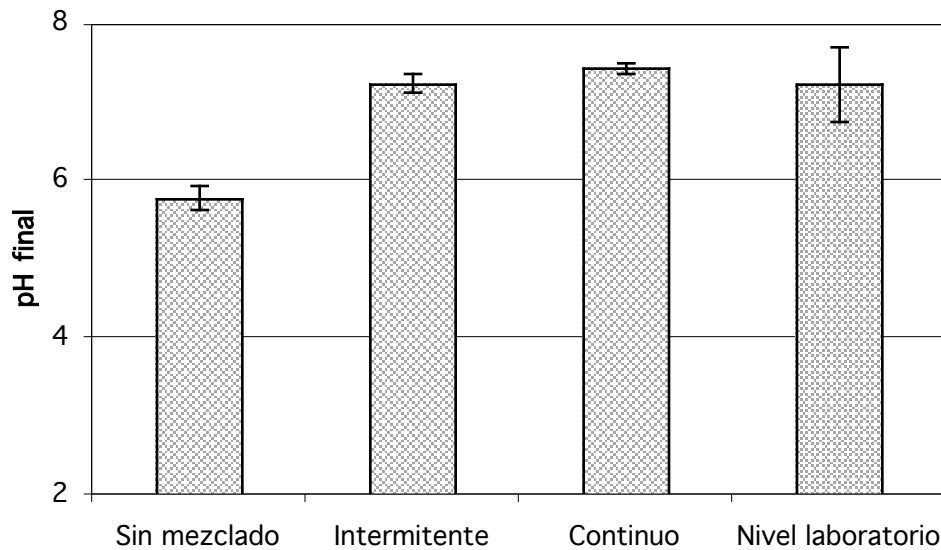


Figura 5.16. Efecto del tipo de mezclado sobre el pH final en la fermentación de pulpa de café con *P. commune* a nivel semi-piloto. pH inicial de 4.26.

El crecimiento del hongo en las fermentación sin mezclado y mezclada intermitentemente fue en su mayoría superficial. Al final de la fermentación se obtenía un solo bloque de pulpa unido por el hongo. En cambio, la agitación continua evitó la formación de aglomerados de pulpa que impiden la aereación del cultivo. También hizo posible el aumento en la producción de esporas, lo cual puede ser resultado del crecimiento más homogéneo al interior del lecho de pulpa (Figura 5.17). Otros investigadores, de Reu y col. (1993), reportan que la agitación intermitente mejora la fermentación de soya con *Rhizopus oligosporus*. Por su parte, Oostra y col. (2000) señalan que no existe efecto negativo sobre la producción de esporas de *Coniothyrium minitans* sobre avena en un reactor de tambor agitado continuamente.

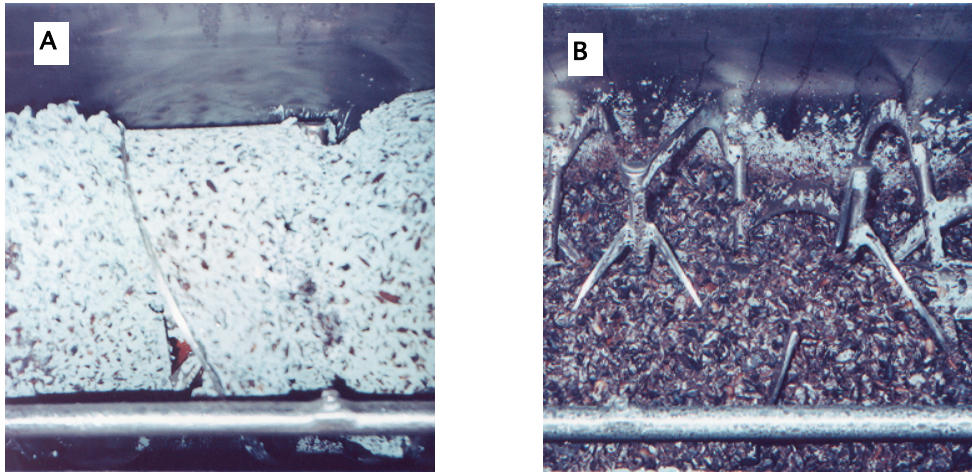


Figura 5.17. Aspecto de la pulpa de café fermentada a nivel semi-piloto. A) Parte inferior del lecho en condiciones estáticas; B) Con mezclado continuo.

La identificación de los límites de tratamiento térmico para la pulpa de café (554 - 1272 KJ/Kg) y de la temperatura de incubación (25 °C) permitieron favorecer el crecimiento de *Penicillium commune* y detener el crecimiento de la cepa contaminante *Aspergillus* en las fermentaciones a nivel semi-piloto.

6. CONCLUSIÓN

1. La extrapolación de las condiciones de operación a nivel laboratorio a semi-piloto no permitieron el crecimiento de *Penicillium commune* en pulpa de café sino que favorecieron el desarrollo de contaminaciones por *Aspergillus*.
2. Se demostró que el tratamiento térmico debe ser menor a 1272 KJ/Kg de pulpa de café para evitar la formación de productos tóxicos para el crecimiento fúngico.
3. Los estudios a nivel laboratorio permitieron establecer la humedad inicial del medio (60-65%), el tamaño de inóculo (1×10^7 esporas/g pulpa húmeda) y la temperatura de incubación (25 °C) en donde el crecimiento de *P. commune* es predominante sobre el contaminante en la fermentación de pulpa de café.
4. Las condiciones seleccionadas a nivel laboratorio pudieron ser extrapoladas a nivel semi-piloto operando el reactor sin/con agitación sin observarse contaminación por *Aspergillus*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, M.R. Dougan, J. (1987) Waste products. En Coffee Volume 2 Technology editores R.J. Clarke y R. Macrae. Elsevier Applied Science. London and New York.

Antier, P. Minjares, A. Roussos, S. Raimbault, M. Viniestra-González, G. (1993a) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb Technol.* 15:254-260.

Antier, P. Minjares, A. Roussos, S. Viniestra-González, G. (1993b) New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotechnol Adv.* 11(3):429-440.

Arasaratnam, V. Mylvaganam, K. Balasubramaniam, K. (2001) Glucoamylase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation with paddy husk as support. *J Food Sci Technol.* 38(4):334-338.

Augustin, J.C. Brouillaud-Delattre, A. Rosso, L. Carlier, V. (2000) Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1706-1710.

Avallone, S. Guyot, B. Brillouet, J.M. Olguin, E. Guiraud, J.P. (2001) Microbiology and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiol.* 2001. 42(4): 252-256.

Badui, S. (1999) *Química de los alimentos*. Tercera edición. Addison Wesley Longman, México.

Biopulca annual report year 1. (1999) Pilot plant engineering of coffee pulp silage/detoxification. En *Development of bioprocesses for the conservation, detoxification and valorization of coffee pulp*. EU Project INCO DC: N° IC18*CT970185.

Biopulca annual report year 2. (2000) Pilot plant engineering of coffee pulp silage/detoxification. En *Development of bioprocesses for the conservation, detoxification and valorization of coffee pulp*. EU Project INCO DC: N° IC18*CT970185.

Bird, R.B. Stewart, W.E. Lightfoot, E.N. (1998) *Fenómenos de transporte*. Quinta reimpresión. Editorial Reverté, México.

Boccas, F. Roussos, S. Gutiérrez, M. Serrano, L. Viniegra, G.G. (1994) Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *J Food Sci Technol.* 31: 22-26.

Brand, D. Pandey, A. Roussos, S. Soccol, C.R. (2000) Biological detoxification of

coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microb Technol.* 27: 127-133.

Brand, D. Pandey, A. Rodríguez-León, J.A. Roussos, S. Brand, I. Soccol, C.R. (2001) Packed bed column fermenter and kinetic modelling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. *Biotechnol Prog.* 17: 1065-1070.

Considine, P.J. Hackett, T.J. Coughlan, M.P. (1987) Solid-state cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. *Biotechnol Lett.* 8(2):131-134.

Cooney, C.L. Wang, D.I.C. Mateles, R.I. (1968) Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. *Biotechnol Bioeng.* 11:269-281.

Daglia, M. Papetti, A. Gregotti, C. Berté, F. Gazzani, G. (2000) In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem.* 2000. 48(5):1449-1454.

de Reu, J.C. Zwietering, M.H. Rombouts, F.M. Nout, M.J.R. (1993) Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40:261-265.

Desgranges, C. Vergoignan, C. Léréec, A. Riba G. Durand, A. (1993) Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. *Biotech Adv.* 11:577-587.

Domínguez, M. Mejía, A. Revah, S. Barrios-González, J. (2001) Optimization of bagasse, nutrients and initial moisture ratios on the yield of penicillin in solid-state fermentation. *World J Microbiol and Biotechnol.* 17:751-756.

Fan, L. Pandey, A. Soccol, C.R. (2000a) Solid state cultivation -an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *J Basic Microbiol.* 40(3):187-197.

Fan, L. Pandey, A. Mohan, R. Soccol, C.R. (2000b) Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol.* 20(1): 41-52.

Gaime-Perraud, I. Roussos, S. Martínez-Carrera, D. (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micol Neotrop Apl.* 6:95-103.

Gervais, P. Bensoussan, M. Grajek, W. (1988) Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 27:389-392.

Giridhar, P. Reddy, S.M. (2001) Phenolic antioxidants for the control of some mycotoxigenic fungi. *J Food Sci Technol.* 38(4):397-399.

González de Colmenares, N. Ramírez-Martínez, J.R. Aldana, J.O. Ramos-Niño, M.E. Clifford, M.N. Pérekar, S. Méndez, B. (1998) Isolation, characterisation and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. *J Sci Food Agric.* 77:368-372.

Gutiérrez, G. (2000) Degradación de cafeína en presencia de ácido tánico, por *Penicillium commune*, PV33A25. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México, D.F.

Hakil, M. Denis, S. Viniegra-González, G. Augur, C. (1998) Degradation and product analysis of caffeine and related demethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme Microb Technol.* 22(5):355-359.

Han, H.Z. Nout, R.M.J. (2000) Effects of the temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of temperate fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 16(8/9):853-858.

Heldman, D. Singh, R.P. (1981) *Food Process Engineering*. Second edition. Van Nostrand Reinhold, USA.

Ikasari, L. Mitchell, D.A. Stuart, D.M. (1999) Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol Bioeng.* 64(6):722-728.

Kargi, F. Curme, J.A. (1985) Solid-state fermentation of sweet sorghum to ethanol in a rotary-drum fermentor. *Biotechnol Bioeng.* 27:1122-1125.

Katz, S.N. (1987) Decaffeination of coffee. En *Coffee Volume 2 Technology* editores R.J. Clarke y R. Macrae. Elsevier Applied Science. London and New York.

- Kumar, P.K.R. Lonsane, B.K. (1987a) Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnol Bioeng.* 30(2):267-271.
- Kumar, P.K.R. Lonsane, B.K. (1987b) Potential of fed-batch culture in solid-state fermentation for production of gibberelic acid. *Biotechnol Lett.* 9:179-182.
- Larroche, C. Besson, I. Gros, J.B. (1994) Behaviour of spores of *Penicillium roquefortii* during fed-batch bioconversion of octanoic acid into 2-heptanone. *Biotechnol Bioeng.* 44:699-709.
- Lonsane, B.K. Ghildyal, N.P. Budiatman, S. Ramakrishna, S.V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 7:258-265.
- Lonsane, B.K. Saucedo-Castañeda, G. Raimbault, M. Roussos, S. Viniegra-González, G. Ghildyal, N.P. Ramakrishna, M. Krishnaiah, M.M. (1992) Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.* 27: 259-273.
- Maheva, E. Djelveh, G. Larroche, C. Gross, J.B. (1984) Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. *Biotechnol Lett.* 6(2):97-102.
- Marsh, A.J. Mitchell, D.A. Stuart, D.M. Howes, T. (1998) O₂ uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor. *Biotechnol Lett.* 20:607-611.
- Minjares-Carranco, A. Trejo-Aguilar, B.A. Aguilar, G. Viniegra-González, G. (1997) Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus*

niger adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. Enzyme Microbiol Technol. 21:25-31.

Mitchell, D.A. Lonsane, B.K. Durand, A. Renaud, R. Almanza, S. Maratray, J. Desgranges, C. Crooke, P.S. Hong, K. Tanner, R.D. Malaney, G.W. (1992) General principles of reactor design and operation for SSC. Solid substrate cultivation. editores: H.W. Doelle, D.A. Mitchell, C.E. Rolz. Elsevier applied science.

Molina, M. de la Fuente, G. Batten, M. Bressani, R. (1974) Decaffeination process to detoxify coffee pulp. J Agric Food Chem. 22(6):1055-1059.

Mudgett, R.E. (1986) Solid-State Fermentation. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain, A.L. Solomon, N.A. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

Oostra, J. Tramper, J. Rinzema, A. (2000) Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. Enzyme Microb Technol. 27:652-663.

Pandey, A. Soccol, C. Nigam, P. Brand, D. Mohan, R. Roussos, S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochem Eng J. 2000. 6:153-162.

Peñaloza, W. Molina, M.R. Gomez, R. Bressani, R. (1985) Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. Appl Environ Microbiol.

49(2):388-393.

Peñaloza, W. Davey, C.L. Hedger, J.N. Kell, D.B. (1992) Physiological studies on the solid-state quinoa tempe fermentation, using on-line measurements of fungal biomass production. *J Sci Food Agric.* 59:227-235.

Perry, R.H. Green, D. Maloney, J.O. (1984) Perry's chemical engineers' handbook. Sixth edition. Mc Graw Hill. USA.

Porres, C. Alvarez, D. Calzada, J. (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotechnol Adv.* 11:519-522.

Prior, B. A. Du Preez, J.C. (1992) Environmental parameters. Solid substrate cultivation. editores: H.W. Doelle, D.A. Mitchell, C.E. Rolz. Elsevier applied science.

Raimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology.* 1(3):1-15.

Ramalakshmi, K. Prabahara, P.G. Rao, Nagalakshmi, S. Ragharan, B. (2000) Physico-chemical characteristics of decaffeinated coffee beans obtained using water and ethyl acetate. *J Food Sci Technol.* 37(3):282-285.

Ramirez-Martinez, J.R. (1988) Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. *J Sci Food Agric.* 43:135-144.

Roussos, S. Hannibal, L. Aquiahuatl, M.A. Trejo-Hernández, M.R. Marakis, S. (1994) Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation of coffee pulp: critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. J Food Sci Technol. 31:316-319.

Roussos, S. Aquiahuatl, M.A. Trejo-Hernández, M.R. Gaime, I. Favela, E. Ramakrishna, M. Raimbault, M. Viniegra-González, G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp -isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. Appl Microbiol Biotechnol. 42:756-762.

Sargantanis, J. Karim, M.N. Murphy, V.G. Ryoo, D. Tengerdy, R.P. (1993) Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. Biotechnol Bioeng. 42:149-158.

Saucedo-Castañeda, G. Trejo-Hernández, M.R. Lonsane, B.K. Navarro, J.M. Roussos, S. Dufour, D. Raimbault, M. (1994) On-line automated monitoring and control systems for CO₂ y O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. Process Biochem. 29:13-24.

Sautor, M. Rouquet, A. Dantigny, P. Divies, C. Bensoussan, M. (2001a) Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. J Appl Microbiol. 91:900-906.

Sautor, M. Rouquet, A. Dantigny, P. Divies, C. Bensoussan, M. (2001b) Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. *Lett Appl Microbiol.* 32:131-134.

Shankaranand, V.S. Lonsane, B.K. (1994) Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. *World J Microbiol Biotechnol.* 10:165-168.

Sideso, O.F.P. Marvier, A.C. Katerelos, N.A. Goodenough. P.W. (2001) The characteristics and stabilization of a caffeine demethylase enzyme complex. *International J Food Sci Technol.* 2001. 36:693-698.

Smits, J.P. Rinzema, A. Tramper, J. van Sonsbeek, H.M. Hage, J.C. Kaynak, A. Knol, W. (1998) The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 22:50-57.

Soares, M. Christen, P. Pandey, A. Soccol, C.R. (2000a) Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 35(8):857-861.

Soares, M. Christen, P. Pandey, A. Raimbault, M. Soccol, C.R. (2000b) A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue. *Bioprocess Eng.* 23(6):695-699.

Souquet, J.M. Labarbe, B. Le Guernevé, C. Cheynier, V. Moutounet, M. (2000)

Phenolic composition of grape stems. J Agric Food Chem. 48:1076-1080.

Udayashankar, K. Manohar, b. Chokkalingam, A. (1986) A note on supercritical carbon dioxide decaffeination of coffee. J Food Sci Technol. 23:326-328.

Wang, D. I. C. Cooney, C.L. Demain, A. L. Dunnill, P. Humphrey, A. E. Lilly, M. D. (1979) Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley, USA.

Wauters, T. Iserentant, D. Verachtert, H. (2001) Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. Can J Microbiol. 47(4):290-293.

Welty, J.R. Wilson, R.E. Wicks, C.E. (1976) Fundamentals of momentum heat and mass transfer. Second edition. John Wiley & Sons, USA.

Zuluaga, J. (1989) Utilización integral de los subproductos del café. I Seminario internacional sobre biotecnología en la agroindustria cafetalera. Xalapa, Ver. 1989.

8. ANEXO

8.1 Nomenclatura

A	Área de transferencia por conducción
\mathcal{A}	Factor de frecuencia
Bi	Número de Biot
Cp_{pulpa}	Capacidad calorífica de la pulpa
Cp_{agua}	Capacidad calorífica del vapor de agua (2.06 KJ Kg ⁻¹ °K ⁻¹)
Cp_{aire}	Capacidad calorífica del aire (1.01 KJ Kg ⁻¹ °K ⁻¹)
D	Diámetro de la pulpa empacada para el tratamiento térmico
dCO_2/dt	Velocidad de producción de CO ₂
E_a	Energía de activación
E_o	Entalpía del aire húmedo a la entrada del lecho
E_l	Entalpía del aire húmedo a la salida del lecho
F	Flujo másico de aire
F_v	Flujo volumétrico de aire
g	Aceleración de la gravedad (9.81 m/s ²)
Gr	Número de Grashoff
h	Coefficiente de transferencia convectiva en el tratamiento térmico
h_o	Coefficiente de transferencia por convección en el reactor semi-piloto

h_A	Coeficiente global de transferencia de calor en el reactor semi-piloto
k_{pared}	Conductividad térmica de la pared del reactor ($16 \text{ W m}^{-1} \text{ }^\circ\text{K}^{-1}$)
k_{pulpa}	Conductividad térmica de la pulpa
k_{vapor}	Conductividad térmica del vapor de agua ($0.02 \text{ W m}^{-1} \text{ }^\circ\text{K}^{-1}$)
M_{agua}	Peso molecular del agua (18 g/mol)
M_{aire}	Peso molecular del aire (28.5 g/mol)
m	Resistencia relativa
m_{pulpa}	Masa de pulpa (kg)
n	Posición relativa
Nu	Numero de Nusselt
P_{agua}	Presión de vapor de agua
P_{Total}	Presión atmosférica (585 mmHg)
Pr_{agua}	Número de Prandtl del vapor de agua (1.06)
Q_{Total}	Ganancia neta de calor en el sistema
$Q_{Convección/Evaporación}$	Perdida de calor en el sistema por convección y evaporación
$Q_{Conducción}$	Perdida de calor en el sistema por conducción
$Q_{Metabolismo}$	Generación de calor en el sistema por el metabolismo
R	Constante de los gases ($0.082 \text{ L atm/ g mol }^\circ\text{k}$)
T	Temperatura absoluta
T	Temperatura de la pulpa en el tratamiento térmico
T_o	Temperatura de la pulpa en el tiempo cero del tratamiento térmico
$T_{0promedio}$	Temperatura promedio de la corriente de aire a la entrada
T_i	Temperatura de la corriente de aire a la entrada/salida
T	Temperatura del vapor en el tratamiento térmico

T_f	Temperatura promedio de T_o y T
T_{ext}	Temperatura en la chaqueta del reactor semi-piloto
T_l	Temperatura en el lecho de pulpa en el reactor semi-piloto
T_{ref}	Temperatura de referencia (273 °K)
t	Tiempo
X	Tiempo relativo
X_H	Porcentaje de humedad en la pulpa
X_C	Porcentaje de carbohidratos en la pulpa
X_P	Porcentaje de proteína en la pulpa
X_F	Porcentaje de grasa en la pulpa
X_A	Porcentaje de cenizas en la pulpa
x	Distancia del centro a cualquier punto en la pulpa empacada.
x_l	Radio de pulpa empacada en el tratamiento térmico
Y	Cambio no realizado de temperatura
Y_{Q/CO_2}	Coefficiente de equivalencia calórica (0.41 KJ/mmol CO ₂)
y_{agua}	Fracción de vapor de agua.
\square_{pulpa}	Difusividad térmica de la pulpa de café
\square	Coefficiente de expansión térmica
\square_{pulpa}	Densidad de la pulpa (310 Kg/m ³)
\square_{vapor}	Densidad del vapor de agua (0.59 Kg/m ³)
\square	Velocidad específica de crecimiento
\square_{vapor}	Viscosidad del vapor de agua (12.7 Pa s)
$\square H_v$	Calor latente de vaporización a 273 °K (44.72 KJ/mol)

$\Delta Q/\Delta t$	Diferencia de calor de la pulpa durante el tratamiento térmico
$\Delta T/\Delta t$	Diferencia de temperatura de la pulpa en el tratamiento térmico
Δx	Espesor de la pared del reactor (1×10^{-3} m)

8.1 Cálculo de la energía recibida durante el tratamiento térmico

Este cálculo se dividió en dos partes: 1) el tratamiento en autoclave, donde se estimaba la temperatura de la pulpa a partir de datos de temperatura del vapor; 2) el tratamiento en reactor donde no era necesaria la estimación de la temperatura.

1) Estimación de la temperatura durante el tratamiento en autoclave.

Como no fue posible la medición directa de la temperatura de la pulpa en los tratamientos en autoclave, ésta se estimó considerando el calentamiento de un cuerpo sólido (pulpa de café), en estado no estacionario sin resistencia superficial ($Bi > 0.1$), con el empleo de un fluido en este caso vapor de agua.

La estimación de la temperatura se realizó utilizando las gráficas de Heissler para el caso de una esfera (forma aproximada de la pulpa empacada). Por lo tanto fue necesario evaluar, en cada período, tres parámetros: el tiempo relativo, la resistencia relativa y la posición relativa (X , m y n , respectivamente).

$$X = \frac{\alpha_{pulpa} t}{x_1^2} \quad 8.1$$

$$m = \frac{k_{pulpa}}{hx_1} \quad 8.2$$

$$n = \frac{x}{x_1} \quad 8.3$$

En donde α_{pulpa} y k_{pulpa} son la difusividad y conductividad térmica respectivamente de la pulpa, t es el tiempo de calentamiento, x es la distancia del centro a cualquier punto, x_1 es el radio del medio conductor y h es el coeficiente de transferencia convectiva.

El radio en cada tratamiento, x_1 , se obtuvo considerando la cantidad y densidad de pulpa. Las propiedades de la pulpa se calcularon con las siguientes relaciones (Heldman y col., 1981) con una humedad alrededor de 50%.

$$k_{pulpa} = 0.148 + 0.00493(X_H) \quad 8.4$$

$$\alpha_{pulpa} = \frac{k_{pulpa}}{C_{pulpa} \rho_{pulpa}} \quad 8.5$$

$$C_p = 1.424X_c + 1.549X_p + 1.675X_F + 0.837X_a + 4.187X_H \quad 8.6$$

El coeficiente de transferencia convectiva se calculó usando la ecuación 8.7 (Perry, 1984):

$$h = \frac{Nu \cdot k_{vapor}}{D} \quad 8.7$$

La expresión empírica 8.8 se utilizó para obtener el número de Nusselt, Nu (Bird y col., 1998).

$$Nu = 2 + 0.6(Gr^{1/4} \cdot Pr^{1/3}) \quad 8.8$$

Donde Gr y Pr designan los números de Grashoff y Prandtl, respectivamente y se calcularon con las siguientes ecuaciones tomadas de la misma referencia

$$Gr = \frac{D^3 \cdot \rho_{vapor}^2 \cdot g \cdot \beta \cdot \Delta T}{\mu_{vapor}^2} \quad 8.9$$

$$Pr_{vapor} = \frac{\rho_{vapor} C_{p_{agua}}}{k_{vapor}} \quad 8.10$$

El coeficiente de expansión térmica del promedio de la temperatura en la superficie de la pulpa (T_o) y de la temperatura del medio de calentamiento (T) como se expresa en la ecuación 8.11. La diferencia ΔT se obtiene entre la temperatura superficial y la del medio de calentamiento, es decir, $\Delta T = T - T_o$

$$\beta = \frac{1}{T_f} \quad 8.11$$

Con las gráficas de Heissler (Welty y col., 1976) y los parámetros X , m y n se obtuvo un cuarto parámetro, Y . definido por la ecuación 8.12, de la cual se despejó la temperatura del sólido, T .

$$Y = \frac{(T - T)}{(T - T_o)}$$

8.12

Como la temperatura al interior de la pulpa no es homogénea se evaluó en el centro, en la superficie y en otros cuatro puntos intermedios, que corresponden a los valores de n iguales a 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0. El tiempo de calentamiento fue dividido en periodos y para cada de ellos se obtuvo una temperatura al final.

Los perfiles de temperatura estimada para la parte correspondiente del tratamiento 1 en la Tabla 4.3 se muestra en la Figura 8.1. Éste consistió en la aplicación de 2 calentamientos en autoclave por 30 minutos a 121 °C a 8.8 Kg de pulpa húmeda.

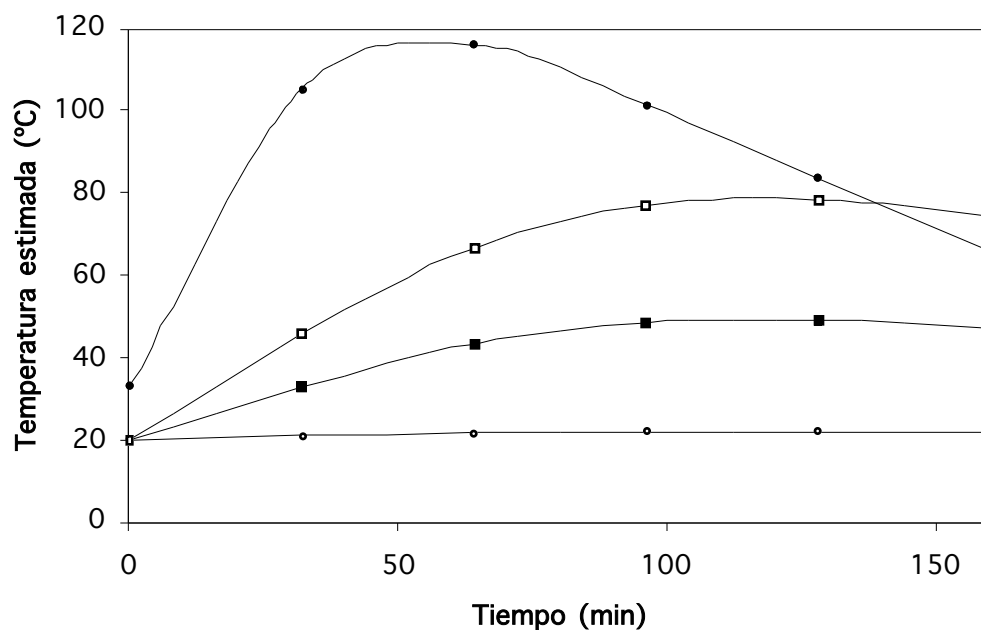


Figura 8.1. Perfil de temperatura estimada de la pulpa de café durante el tratamiento térmico en autoclave. (●) Vapor; (○) $n=0, 0.2, 0.4$ y 0.6 ; (■) $n=0.8$; (□) $n=1.0$

La temperatura promedio entre dos puntos intermedios se utilizó para los siguientes cálculos y para el tratamiento 1 se muestran en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Temperatura promedio en las distintas zonas de la esfera de pulpa de café.

Tiempo (min)	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0
0	20	20	20	20	20
32	20.9	20.9	20.9	26.8	39.2
64	21.6	21.6	21.6	32.5	55.0
96	21.9	21.9	21.9	35.2	62.8
128	22.0	22.0	22.0	35.6	63.8
160	21.8	21.8	21.8	34.6	60.9

Posteriormente se calculó la velocidad de energía recibida por la pulpa utilizando la ecuación 8.13. En esta ecuación, la masa y la capacidad calorífica de la pulpa se consideraron constantes porque las pérdidas por evaporación de agua son insignificantes.

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = m_{pulpa} C_{p_{pulpa}} \frac{\Delta T}{\Delta t} \tag{8.13}$$

La suma de las integrales en cada región da un total de 2393.8 KJ que al dividirlos entre los 8.8 Kg resulta 272 KJ/Kg de pulpa húmeda. Como el calentamiento en autoclave se realizó dos veces se tuvo una contribución de 544 KJ por el tratamiento en autoclave. Los datos de velocidad de energía recibida y de la integral en cada región se encuentran en la Tabla 8.2

Tabla 8.2. Perfil de velocidades de recepción de energía durante el tratamiento con autoclave en las distintas zonas de la esfera de pulpa de café.

Tiempo (min)	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0
0	0	0	0	0	0
32	0.0052	0.037	0.10	1.55	7.2
64	0.0096	0.067	0.18	2.84	13.1
96	0.0117	0.082	0.22	3.47	16.1
128	0.0121	0.085	0.23	3.55	16.4
160	0.0113	0.079	0.22	3.31	15.4
Integral (KJ)	1.418	9.926	26.94	418.0	1937.5

2) Tratamiento en reactor.

Posteriormente en el tratamiento 1 de la Tabla 4.3, se aplicó un tercer calentamiento por 2 hora a temperaturas entre 60.5 y 65.4 °C en el reactor semi-piloto. La pulpa se colocó en el tanque de fermentación. Se aplicó calentamiento por las paredes de la chaqueta con vapor de agua y se registró la temperatura del interior del tanque a lo largo del proceso. El perfil de temperatura se muestra a continuación en la Figura 8.2.

Como no se consideraron gradientes de temperatura por el mezclado, se calculó directamente la velocidad de energía recibida por Kg de pulpa con la siguiente fórmula con la formula 8.13

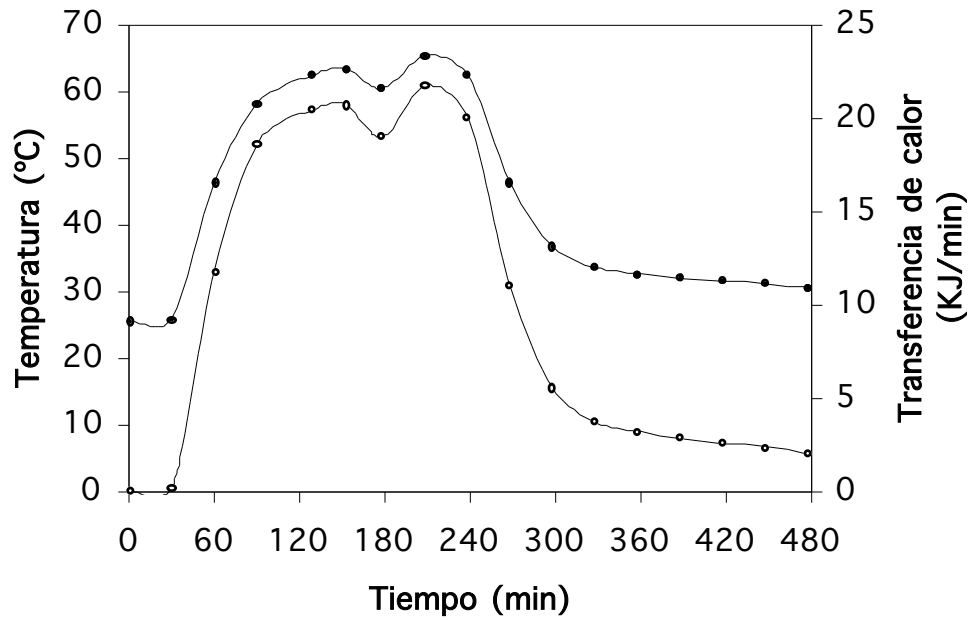


Figura 8.2. Perfil de temperatura de la pulpa de café en el tratamiento en reactor con mezclado. (●) Temperatura (○) Transferencia de calor.

La integral de esta curva fue igual a 4975 KJ/Kg que al sumarse con el valor para el tratamiento en autoclave resultó en un valor de 5519 KJ/Kg de pulpa húmeda.