

## Efecto del tamaño de la partícula, la aeración y la temperatura en la fermentación en estado sólido de cáscara cítrica seca

J. ECHEVARRÍA<sup>1</sup>, J. A. RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, W. BECHSTEDT<sup>2</sup>, F. J. RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, N. SIERRA<sup>1</sup>, A. DANIEL<sup>1</sup> y O. MARTÍNEZ<sup>1</sup>

1. Instituto de Química y Biología Experimental. ACC.

Ave. 26 No. 1605, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana

2. Institut für technische Chemie. AdW. DDR. Leipzig

Recibido en mayo de 1986

### RESUMEN

Se ha señalado que en los procesos fermentativos en estado sólido, existen variables relacionadas con los fenómenos de transporte de masa y energía, que dadas las características de estos procesos, desempeñan un papel determinante en cuanto al desarrollo de los mismos.

El propósito de este trabajo es estudiar el efecto de tres variables relacionadas con estos fenómenos: el tamaño de la partícula del sustrato, la aereación y la temperatura, con relación a la fermentación de cáscara cítrica seca mediante un proceso en estado sólido.

Los resultados obtenidos demuestran que el calor generado en el proceso produce un aumento de la temperatura, que puede representarse por un modelo matemático de tipo exponencial, teniendo este factor un efecto mucho más crítico que los otros factores analizados en el presente trabajo.

### SUMMARY

It was pointed out that in solid state fermentation processes there are several factors close related with mass and energy transport phenomena which are determinant in the process development.

The aim of this work is to study the effect of three factors related with these phenomena, which are determinant in the process development; like particle size, aereation and temperature, when citrus dried peel was fermented with a strain of *Aspergillus niger* in a solid state fermentation process.

The results show that the heat evolved in the process produce a rise in the process temperature represented by an exponential model. Temperature has a more critical effect in the process than the others factors studied in this work.

### INTRODUCCION

Diferentes autores han señalado las ventajas y desventajas de los procesos de fermentación en estado sólido (Hesseltine, 1977; Aidoo *et al.*, 1982; Golovleva *et al.*, 1983; Senez, 1983), destacándose en estos procesos los bajos requerimientos de energía para el desarrollo de estos.

De igual modo, se han realizado esfuerzos para establecer métodos adecuados para lograr la caracterización de estos sistemas mediante procedimientos apropiados y específicos a este tipo de fermentación (Raimbault y Alazard, 1980; Carrizalez *et al.*, 1981; Viesturs *et al.*, 1983) que en cierto sentido los diferencia de los procesos de cultivo sumergido. Sin embargo, esta caracterización aún dista de alcanzar el nivel adquirido en el caso de los procesos fermentativos convencionales.

La fermentación en estado sólido se caracteriza por el hecho de que no existe agua libre en el sistema (Cannel y Moo-Young, 1980) y por tanto, en un proceso de este tipo existen relaciones muy específicas de transferencia de masa y de energía, que los distingue en cuanto a las relaciones que existen para los fenómenos de transporte en otros sistemas fermentativos. Coincidiendo con este hecho se ha señalado que existen muy pocas variables con las cuales controlar las fermentaciones en estado sólido, destacándose como tales la temperatura y el intercambio gaseoso (Zadrazil y Brunnert, 1982) además de otros parámetros tales como la humedad, la adición de nutrientes, el pH, etcétera, que favorecen y determinan una fermentación específica.

El objetivo del presente trabajo es analizar los efectos de tres variables íntimamente relacionadas con los fenómenos de transporte: el tamaño de la partícula, la aereación y la temperatura, aplicadas a la fermentación en estado sólido de cáscara cítrica seca con la cepa *Aspergillus niger* QH-2, con vista a lograr el enriquecimiento proteico de dicha cáscara, para ser utilizada en la elaboración de piensos para alimentación animal.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos

Se empleó la cepa *Aspergillus niger* QH-2, perteneciente al cepario del Instituto de Química y Biología Experimental de la Academia de Ciencias de Cuba. Esta cepa se conserva en medio agar-malta a 30°C, transfiriéndose mensualmente a medio fresco.

### Sustrato sólido

Se utilizó cáscara cítrica seca comercial producida por el Combinado Citrícola del municipio especial Isla de la Juventud, Cuba.

El sustrato fue suplementado, cuando fue necesario, con sulfato de amonio, considerando 0,63 g de nitrógeno/100 g de sustrato seco.

### Desarrollo de la fermentación

Las fermentaciones se realizaron en un sistema de columnas empacadas de 7 cm de diámetro y 20 cm de longitud, con aereación del fondo hacia la tapa. La columna se cargó con 100 ó 200 g de sustrato húmedo, según el caso, el cual fue previamente inoculado con  $2 \cdot 10^7$  esporas/g de sustrato. La humedad del sustrato inicial se ajustó al 50 por ciento.

El aire empleado para aerear el sistema se saturó con agua para evitar un secado posterior de la columna, y se pasó previamente por una columna de despojamiento de CO<sub>2</sub> para evitar alteraciones en la medición del CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación. El flujo de aire empleado normalmente, y salvo condiciones específicas reportadas, fue de 1,7 litros de aire/kilogramo de sustrato, por minuto. El tiempo de fermentación empleado en todos los casos fue de 36 h.

El crecimiento microbiano se determinó midiendo el CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación, mediante el cambio de la conductividad eléctrica de una solución de hidróxido de bario 0,1 N, a 30°C. El contenido de proteína cruda en el producto se determinó por el método de Kjeldahl.

Para el cálculo de las velocidades específicas de crecimiento máximas se empleó la regresión lineal.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En primer lugar procedimos a un análisis de tamizado realizado por quintuplicado, de la cáscara cítrica seca tal y como se comercializa. Este análisis dio como resultado un diámetro equivalente ( $D_e$ ) para la partícula de cáscara cítrica seca de 0,8 mm con una varianza de 0,013.

Posteriormente se procedió a moler en un molino común dicha cáscara, obteniéndose un  $D_e$  de 0,64 mm con una varianza de 0,0014. Mediante el estadígrafo de Fischer se determinó que existe diferencia significativa entre ambas varianzas, para un nivel de 99 por ciento de confianza. Este hecho nos permite trabajar con un sustrato más homogéneo en cuanto a la distribución del tamaño de la partícula en el sistema. De igual forma se determinó, mediante el estadígrafo de Student, que existe diferencia significativa entre los diámetros equivalentes empleados.

En la tabla 1 se ofrecen los resultados de la fermentación en estado sólido con la cáscara cítrica molida ( $D_e=0,64$  mm) y sin moler ( $D_e = 0,8$  mm), considerando, además, la adición o no de sulfato de amonio como fuente complementaria de nitrógeno (N).

Tabla 1

RELACION ENTRE LAS VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO MAXIMAS ( $\mu$ ) Y EL CONTENIDO FINAL DE PROTEINA CRUDA EN LA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO DE CASCARA CITRICA, CON RELACION AL DIAMETRO EQUIVALENTE DEL SUBSTRATO ( $D_e$ ) Y LA ADICION DE NITROGENO COMO SULFATO DE AMONIO (N)

$D$ (mm)	N	$\mu_1$ ( $h^{-1}$ )	$r_1$	$\mu_2$ ( $h^{-1}$ )	$r_2$	proteína cruda (%)
0,80	0,00	0,31	0,9940	0,00	-	5,1
0,80	0,63	0,32	0,9887	0,10	0,9754	12,0
0,64	0,00	0,62	0,9598	0,06	0,9158	5,3
0,64	0,63	0,83	0,9754	0,18	0,9560	9,0

Tal y como se ha reportado anteriormente, existe un crecimiento diaúxico (Rodríguez León *et al.*, 1985), observándose que al emplear cáscara con un  $D_e$  menor, las velocidades específicas de crecimiento en ambas fases logarítmicas fueron mayores, tanto en el caso en que se adicionaba la fuente complementaria de nitrógeno como cuando no se adicionaba. En dicha tabla también se reportan los coeficientes de correlación obtenidos para el cálculo de las distintas velocidades específicas de crecimiento.

En la figura 1 se ofrecen las curvas de crecimiento características obtenidas durante las fermentaciones, observándose el patrón representativo del crecimiento diaúxico antes mencionado.

El hecho de haber obtenido mayores velocidades específicas de crecimiento en el caso de utilizarse menores diámetros de partículas, indica una mayor facilidad en la utilización de las sustancias biodegradables por parte del microorganismo, a causa de una mayor área de contacto entre este y el sustrato. Es destacable que aun sin añadirse una fuente de nitrógeno complementaria, para el caso de  $D_e$  de 0,64 mm, se presenta la segunda fase de crecimiento, aunque con una velocidad específica de crecimiento francamente menor y mucho menos definida por existir una mayor dispersión de los puntos, tal y como puede observarse en el valor del coeficiente de regresión obtenido para este caso. Este hecho no se manifiesta en el caso de la

cáscara cítrica sin moler, en la cual, cuando no se adiciona la fuente complementaria de nitrógeno no existe la segunda fase del crecimiento. Es obvio que por ello podemos señalar que si bien es cierto que la diaúxia que se manifiesta en este sistema está relacionada con la selectividad del sustrato por parte del microorganismo y la influencia de la fuente complementaria de nitrógeno, tal y como se ha reportado (Rodríguez León *et al.*, 1985), el modelo, a su vez, se ve influido por las características del sistema.

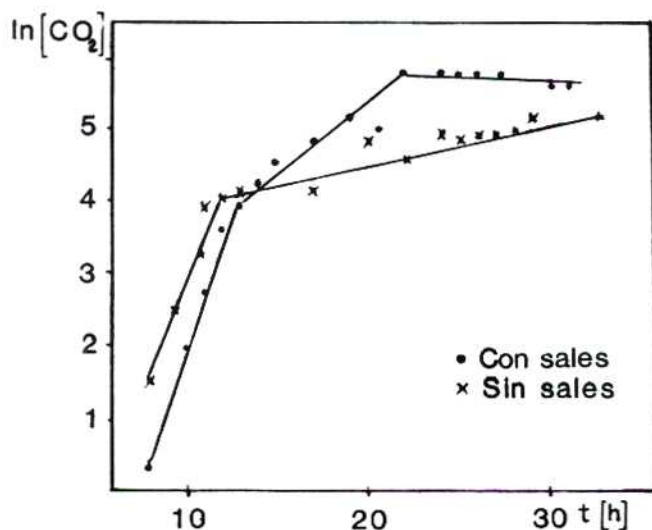


FIG. 1. Fermentación con un  $D_e = 0,64$  y  $1,67$  VKgM; con sales, y sin sales.

También se destaca en los valores reportados en la tabla 1, que a pesar de existir mayores velocidades específicas de crecimiento en el caso de  $D_e$  menores, no ocurre así con los valores de proteína cruda obtenidos en el producto final. Esta aparente contradicción podría explicarse como deficiencias de transferencia de oxígeno en las condiciones de un  $D_e$  menor, tanto por características del empaquetamiento de la columna como por una posible mayor demanda de  $O_2$  en el sistema ante un sustrato más asequible. De igual forma, este fenómeno podría estar relacionado con los efectos de la temperatura generada en el sistema a causa del metabolismo microbiano, y por tanto, no ya a deficiencias de transferencia de masa sino de calor, por la razón inicialmente mencionada.

Con vista a dilucidar el efecto que determina el desarrollo del proceso en las condiciones anteriores, decidimos realizar distintas experiencias variando el volumen de aire (l)/kilogramo de sustrato, por minuto (VKgM), todo ello considerando un sustrato con un  $D_e$  de 0,64 mm.

Los resultados obtenidos para estas condiciones se reportan en la tabla 2. En dicha tabla puede observarse que a mayores cargas específicas de aereación, 3,33 y 6,66 (VKgM), desaparece la segunda fase del crecimiento antes observada. Es por ello que podemos suponer que el factor que determina un patrón diaúxico de crecimiento, no es solamente la fuente complementaria de nitrógeno sino, además, el hecho de una mayor demanda de oxígeno que el suministrado originalmente. Sin embargo, relacionado con este hecho se observa otro fenómeno que

se presenta en el sistema, y es el de la variación de la temperatura en virtud de la actividad metabólica.

TABLA 2

RELACION ENTRE LAS VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO MAXIMAS ( $\mu$ ) Y EL CONTENIDO FINAL DE PROTEINA CRUDA, CON RELACION A LA CARGA DE AIRE EN EL SISTEMA (VKgM) Y LA ADICION DE NITROGENO COMO SULFATO DE AMONIO (N)

N	VKgM	$\mu_1$ ( $h^{-1}$ )	$r_1$	$\mu_2$ ( $h^{-1}$ )	$r_2$	proteína cruda (%)
0,63	1,67	0,83	0,9754	0,18	0,9560	9,0
0,63	3,33	0,44	0,9905	0,00	-	9,9
0,63	6,66	0,52	0,9971	0,00	-	12,0
0,00	1,67	0,62	0,9598	0,06	0,9158	5,3

En la figura 2 se muestra la variación de la temperatura en el centro de la columna a medida que transcurre la fermentación. Se determinó que la fase estacionaria del proceso ocurre siempre a una temperatura aproximada a los 45°C.

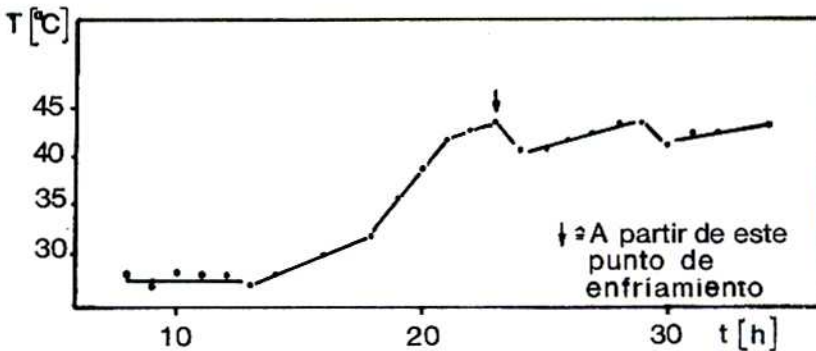


FIG. 2. Desarrollo de la temperatura durante la fermentación en estado sólido.

Al perfil de temperatura obtenido se le adaptó un modelo exponencial del siguiente tipo:

$$T = e^{(a + bt)} \tag{1}$$

donde:

- T – temperatura (°C)
- a, b – coeficientes del modelo
- t – tiempo (h)

En la tabla 3 se ofrecen los valores de los coeficientes del modelo (1) para las condiciones empleadas de VKgM, calculados mediante regresión lineal, con los coeficientes de regresión correspondientes.

TABLA 3

VALORES CORRESPONDIENTES A LOS COEFICIENTES (a, b) DEL MODELO MATEMATICO  $T = e^{(a + bt)}$ , APLICADO AL PERFIL DE TEMPERATURA DESARROLLADO DURANTE LA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO DE CASCARA CITRICA EN UNA COLUMNA EMPACADA

VKgM	a	b	r
3,33	2,560	0,050	0,9830
6,66	2,670	0,050	0,9884

Es interesante señalar que los coeficientes del modelo obtenido para las dos condiciones de VKgM reportadas, son prácticamente iguales. Basados en estos resultados y ante la posibilidad de que el crecimiento microbiano pudo haberse alterado a causa de la variación de la temperatura en el sistema, es necesario considerar que una mayor carga de aire en él (VKgM), además de favorecer la fermentación en cuanto a la demanda de oxígeno, pudo haber ejercido un efecto de enfriamiento, de manera que, en realidad, sea la temperatura generada en el sistema y no la demanda de oxígeno o la utilización de un sustrato específico, el factor que limite el crecimiento y determine las características del sistema.

Para dilucidar el efecto de la temperatura, se decidió realizar distintas corridas experimentales mediante control de esta, enfriando el aire utilizado según los requerimientos de cada corrida.

En la tabla 4 se reportan los valores obtenidos cuando se controló la temperatura en el centro de la columna entre 30 y 35°C y distintos flujos de aire. En estos resultados se observa que el factor de mayor importancia en el proceso es el control de la temperatura y no la carga de aire, pues este último, en caso de influir en los niveles empleados, es a causa de un efecto de enfriamiento más que de transferencia o demanda de oxígeno en el sistema. Esto se observa en los valores reportados acerca del contenido de proteína cruda en el producto final.

TABLA 4

RELACION ENTRE LA TEMPERATURA CONTROLADA EN EL SISTEMA Y LA CARGA DE AIRE (VKgM) EMPLEADA, CON RESPECTO AL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA EN EL PRODUCTO FINAL DE LA FERMENTACION DE CASCARA CITRICA

T°C	VKgM	proteína cruda (%)
Sin control	3,33	9,9
Sin control	6,66	12,0
Con control	6,66	11,4
Con control	3,33	11,5

Un hecho que deseamos destacar es que en todas las corridas realizadas se obtiene un porcentaje de proteína cruda en el producto final que no rebasa los valores de 12 por ciento. Esto nos induce a plantear que es conveniente proceder al análisis de otros factores, no menos importantes, como por ejemplo, el porcentaje de humedad, el pH, la posibilidad de mayores niveles de nitrógeno etcétera, pero considerando la influencia de los factores aquí analizados.

## CONCLUSIONES

El aumento de la temperatura durante el proceso de fermentación en estado sólido de la cáscara cítrica seca es uno de los factores fundamentales en cuanto al desarrollo del proceso, ejerciendo este factor una influencia mucho más crítica que el tamaño de la partícula o la carga de aire, teniendo en consideración los niveles aquí reportados.

## REFERENCIAS

- AIDOO, K. E.; R. HENDRY y J. B. WOOD (1982). *Solid substrate fermentation*. Adv. Appl. Microbiol. 28: 201-237.
- CANNEL, E. y M. MOO-YOUNG (1980). *Solid-state fermentation systems*. Process Biochem. 15 (5): 2-7; (6): 24-28.
- CARRIZALEZ, V.; H. RODRIGUEZ e I. SARDIÑAS (1981). *Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures*. Biotechnol. Bioeng. 23: 321-333.
- GOLOVLEVA, L. A.; E. L. GOLOVLEV; D. N. CHERMENSKY; K. GANBAROV y T. A. BRUSTOVETS-KAYA (1983). *Solid state fermentation of plant raw materials*. Proc. Finnish-Soviet Symp. Bioconversion of Plant Raw Materials by Microorganism, Universidad de Helsinki, pp. 22-43.
- HESSELTINE, C. W. (1977). *Solid state fermentation*. Part I. Process Biochem. 12 (6): 24-27.
- REIMBAULT, M. y D. ALAZARD (1980). *Culture method to study fungal growth in solid fermentation*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 199-209.
- RODRIGUEZ LEON, J. A.; J. ECHEVARRIA; F. J. RODRIGUEZ; N. SIERRA; A. DANIEL y O. MARTINEZ (1985). *Solid state fermentation of citrus dried peel*. En proceso editorial.
- SENEZ, J. C. (1983). *New developments in the field of protein enrichment of foods and feeds (P.E.F.F.)*. Acta Biotechnol. 3: 299-308.
- VIESTURS, U. E.; M. J. BEKERS; A. F. APSITE y J. J. LAUKEVICS (1983). *Modern processes and technology of bioconversion of the plant raw materials*. Proc. Finnish-Soviet Symp. Bioconversion of Plant Raw Materials by Microorganism, Universidad de Helsinki, pp. 118-142.
- ZADRAZIL, F. y H. BRUNNERT (1982). *Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with Sporotrichum pulverulentum Nov. and Dichomitus squalens (Karst.) Reid*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 45-51.