

# Enrichissement en protéines du tourteau de coprah : sélection de champignons filamenteux en FMS

## *Protein enrichment of copra cake: selection of filamentous fungi in SSF*

S. ROUSSOS<sup>(1)</sup>, L. HANNIBAL<sup>(1)</sup>, A. DURAND<sup>(2)</sup>, M. DIEZ<sup>(2)</sup>, G. SAUCEDO<sup>(3)</sup>, D. MONTET<sup>(4)</sup> et J. GRAILLE<sup>(4)</sup>

**Résumé.** — Les résultats ont montré que 11 souches sur 51 testées peuvent être retenues. Elles appartiennent aux espèces *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium* sp., et *Penicillium roquefortii*. Le rendement moyen d'enrichissement en protéines est de 20%. Toutefois l'objectif n'est pas totalement atteint. Une optimisation des conditions de culture, en particulier, de la composition des milieux de culture, s'impose afin d'augmenter ces rendements protéiques et atteindre 50%.

**Mots clés.** — Tourteau de coprah, fermentation en Milieu Solide (FMS), champignons filamenteux, protéines

**Abstract.** — Results showed that 11 out of the 51 strains tested can be used. They belong to the species *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium* sp. and *Penicillium roquefortii*. The mean protein enrichment yield is 20%. Nevertheless, the objective was not entirely achieved. Optimization of culture conditions, especially culture media composition, is necessary to further increase these protein yields to 50%.

**Keywords.** — Copra cake, solid state fermentation, filamentous fungi, proteins.

### INTRODUCTION

La fragilité de l'économie agricole de nombreux pays du Sud impose des recherches soutenues en vue d'obtenir une valorisation post-récolte maximale de toutes les ressources agricoles tropicales. La transformation des produits et sous produits agricoles par Fermentation en Milieu Solide (FMS) offre de bonnes alternatives pour valoriser les produits et protéger l'environnement (Viniestra *et al.* 1991, Lonsane *et al.* 1992). Plusieurs déchets agricoles tropicaux ont été utilisés comme substrat pour la culture en FMS de microorganismes (Tabl. I) en vue de les stabiliser et de les enrichir en protéines pour en faire un aliment pour le bétail (Baldensperger *et al.* 1985; Peñaloza *et al.* 1985; Raimbault *et al.* 1985; Gonzalez-Blanco *et al.* 1990; Saucedo, 1991).

Face à la nécessité de diversifier les sources de protéines et d'énergie pour l'alimentation animale, y compris en élevage moderne, les recherches s'orientent vers la mise en valeur de matières premières disponibles localement (Senez *et al.* 1980; Barreto *et al.* 1989; Montet *et al.*, 1983).

Le cocotier et le palmier à huile sont les principales espèces oléagineuses pérennes des pays tropicaux. Les résidus du traitement de leurs fruits pour l'extraction de l'huile, le tourteau de coprah et de palmiste, sont des sources d'énergie et

### INTRODUCTION

The fragility of the agricultural economy in many countries of the South has made sustained research a necessity for ensuring maximum post-harvest valorization of all tropical agricultural resources. Agricultural product and by-product processing by Solid State Fermentation (SSF) offers good alternatives for valorizing products and protecting the environment (Viniestra *et al.*, 1991; Lonsane *et al.*, 1992). Several tropical agricultural waste products have been used as a substrate for SSF culture of microorganisms (Table I) with a view to stabilizing them and enriching them in proteins for use as animal feed (Baldensperger *et al.*, 1985; Peñaloza *et al.*, 1985; Raimbault *et al.*, 1985; Gonzalez-Blanco *et al.*, 1990; Saucedo, 1991).

Faced with the need to diversify protein and energy sources for animal feed, including in modern animal husbandry, research turned to the profitable use of locally available raw materials (Senez *et al.*, 1980; Barreto *et al.*, 1989; Montet *et al.*, 1983).

Coconut and oil palm are the main perennial oilseed species in tropical countries. Process waste resulting from oil

(1) ORSTOM, Laboratoire de Biotechnologie, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier cedex (France)

(2) INRA, Plateforme de Développement en Biotechnologie; BP 1540 ; 21034 Dijon cedex (France)

(3) Departamento de Biotecnología ; UAM, Iztapalapa, AP 55-535, CP 09340 México, D.F. (Mexique)

(4) CIRAD-CP ; Laboratoire de Lipotechnie, UR Chimie Technologie; BP 5035; 34032 Montpellier cedex (France)

(1) ORSTOM, Laboratoire de Biotechnologie, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier cedex (France)

(2) INRA, Plateforme de Développement en Biotechnologie; BP 1540 ; 21034 Dijon cedex (France)

(3) Departamento de Biotecnología ; UAM, Iztapalapa, AP 55-535, CP 09340 México, D.F. (Mexique)

(4) CIRAD-CP ; Laboratoire de Lipotechnie, UR Chimie Technologie; BP 5035; 34032 Montpellier cedex (France)

de protéines économiquement importantes dans les pays où ils sont produits (Tabl. II). Toutefois, leur utilisation en alimentation animale, en particulier pour les monogastriques, est limitée du fait de leur faible teneur en protéines (inférieure à 25% de la MS) et surtout de leur forte teneur en cellulose (Tabl. III) qui est supérieure à 15% de MS (Thorne *et al.* 1992; Grillet, 1993). De plus les protéines de tourteau de coprah contiennent peu d'acides aminés essentiels tels que Lysine, Méthionine et Cystine (Tabl. IV). Cependant leur disponibilité à faible coût dans les pays où l'élevage des monogastriques (volailles et porc) tend à s'intensifier conduit à rechercher les modes d'utilisation les plus adaptés pour équilibrer la ration des animaux en protéines en y incorporant de la farine de poisson ou bien en y ajoutant directement les acides aminés déficitaires (Thorne *et al.*, 1992).

La synthèse des protéines par les microorganismes constitue une alternative intéressante pour assurer le remplacement des sources protéiques (tourteau de soja, farine de poisson) et améliorer le contenu en acides aminés essentiels du tourteau de coprah. Dans le cadre des recherches sur la production d'aliments fermentés enrichis en protéines, des chercheurs de l'ORSTOM (Raimbault et Germon, 1976; Raimbault et Alazard, 1980) ont mis au point une technique de FMS. Le développement contrôlé en FMS d'une souche d'*Aspergillus niger*, sélectionnée pour ses capacités de croissance, a permis d'améliorer de 2 à 18% la teneur en protéines microbiennes du manioc (Tabl. V), accroissant ainsi ses qualités nutritionnelles (Raimbault *et al.* 1985; Tapia *et al.* 1989). Les résultats obtenus en laboratoire ont été reproduits à l'échelle semi-pilote de 20 Kg (Senez *et al.* 1980). Par ailleurs l'équipe INRA-Dijon a mis au point un nouveau type de réacteur en vue de l'enrichissement en protéines des pulpes de betterave par FMS (Durand et Chereau 1988). Ce réacteur, d'une capacité d'une tonne, répond parfaitement aux critères d'automatisation d'un certain nombre d'opérations, extrapolation possible au niveau industriel, études des bilans, estimation du coût de fonctionnement, production d'aliments pour des tests sur animaux (Durand *et al.* 1983; Durand *et al.*, 1988).

Grâce à une association entre le CIRAD-CP, l'INRA, l'Université Autonome Métropolitaine de Mexico et l'ORSTOM, le MESR a accordé une aide de 24 mois pour l'étude de l'enrichissement en protéines et probiotique du tourteau de coprah par FMS. Les premiers résultats de sélection de champignons filamenteux ainsi que la description de la technique utilisée sont présentés dans ce premier article. A notre connaissance il n'y a pas de travaux antérieurs sur l'enrichissement de tourteaux de coprah par FMS.

## MATERIEL ET METHODES

### Substrats

Trois types de tourteaux de coprah, avec une humidité voisine de 10%, ont été utilisés pour cette étude. Le tourteau A provient de Côte-d'Ivoire (tourteau d'extraction par solvant); les tourteaux B et C proviennent d'Indonésie et ont été obtenus par pression discontinue ou par action de solvants respectivement.

### Microorganismes

La liste des microorganismes testés est donnée dans le tableau VI. Il s'agit de champignons filamenteux provenant de collections internationales et de souches sauvages isolées à l'ORSTOM à partir de différents échantillons de sols ou de débris végétaux.

*extraction from the fruits, copra cake and palm kernels, are economically important sources of energy and proteins in the countries where they are produced (Table II). However, their use as animal feed, especially for non-ruminant animals, is limited due to their low protein content (less than 25% of DM) and especially because of their high cellulose content (Table III), which is greater than 15% of DM (Thorne et al., 1992; Grillet, 1993). Moreover, copra cake proteins contain few essential amino acids such as Lysine, Methionine and Cystine (Table IV). However, they are cheaply available in countries where non-ruminant animal farming (poultry and pigs) is tending to intensify, and this has led to a search for the most appropriate ways of using them to balance the protein diet of animals by incorporating fish meal or by directly adding the missing amino acids (Thorne et al., 1992).*

*Protein synthesis by microorganisms is a useful alternative for replacing protein sources (soybean cake, fish meal) and improving the essential amino acid content of copra cake. In their research on the production of protein enriched fermented animal feed, ORSTOM researchers (Raimbault and Germon 1976; Raimbault and Alazard, 1980) developed an SSF technique. Controlled SSF development of an *Aspergillus niger* strain, selected for its growth ability, resulted in a 2 to 18% increase in cassava microbial protein content (Table V), thereby increasing its nutritional qualities (Raimbault et al, 1985; Tapia et al., 1989). The results obtained in the laboratory were reproduced on a 20 kg semi-pilot scale (Senez et al., 1980). In addition, the INRA-Dijon team has developed a new type of reactor for protein enrichment of sugar beet pulp by SSF (Durand and Chereau, 1988). This reactor, with a 1-tonne capacity, complies perfectly with the automation criteria for a certain number of operations, with the possibility of scaling up to an industrial level, input-output analyses, estimation of operating costs, feed production for tests on animals (Durand et al., 1983; Durand et al., 1988).*

*An association between CIRAD-CP, INRA, the Mexico City Independent Metropolitan University and ORSTOM was granted aid by the French Ministry of Education, Science and Research for 24 months to study protein and probiotic enrichment of copra cake by SSF. This first article gives the initial results of filamentous fungus selection and a description of the technique used. To our knowledge, there has been no previous work on copra cake enrichment by SSF.*

## MATERIAL AND METHODS

### Substrates

*Three types of copra cake were used, with a moisture content of around 10%. Cake A came from the Ivory Coast (cake from solvent extraction); cakes B and C came from Indonesia and were obtained by discontinuous pressure or by solvent action respectively.*

### Microorganisms

*The list of microorganisms tested is given in table VI. They were filamentous fungi from international collections and wild strains isolated by ORSTOM from different soil or plant debris samples.*

TABLEAU I. — Enrichissement en protéines de substrats agricoles tropicaux par des champignons filamenteux en FMS. — (Protein enrichment of tropical agricultural substrates by filamentous fungi in SSF)

Substrat (Substrate)	Microorganisme (Microorganism)	Auteur (Author)
Ecart de banane (Banana waste)	<i>Aspergillus niger</i>	Baldensperger <i>et al.</i> , (1985)
Son de blé (Wheat bran)	<i>Aspergillus awamori</i> ; <i>Aspergillus niger</i>	Srinivas et Lonsane (1993)
Manioc (Cassava)	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Rhizopus arrhizus</i>	Raimbault <i>et al.</i> (1985); Soccol <i>et al.</i> , (1993)
Bagasse de canne à sucre (Sugarcane bagasse)	<i>Aspergillus terreus</i>	Gonzalez-Blanco <i>et al.</i> , (1990)
Déchets de pomme de terre (Potato waste)	<i>Aspergillus niger</i>	Senez <i>et al.</i> , (1980), Peñaloza <i>et al.</i> , (1987)
Pulpe de café (Coffee pulp)	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>P. ostreatus</i>	Martinez Carrera <i>et al.</i> (1987)
Banane (Banana)	<i>Aspergillus niger</i>	Senez <i>et al.</i> , (1980)
Pulpe d'orange (Orange pulp)	<i>Aspergillus niger</i> et <i>Rhizopus sp.</i>	Barreto <i>et al.</i> , (1989)
Pulpe de pomme (Apple pulp)	<i>Aspergillus foetidus</i>	Hours <i>et al.</i> (1988)
Pulpe de citron (Lemon pulp)	<i>Aspergillus sp</i>	Maldonado <i>et al.</i> , (1986)

TABLEAU II. — Production mondiale du tourteau de coprah (QUID, 1992). — (World copra cake production -QUID, 1992)

Principaux pays producteurs (Main producing countries)	Quantité (10 <sup>3</sup> t) (Quantity -10 <sup>3</sup> t)
Philippines (Philippines)	1830
Indonésie (Indonesia)	1340
Inde (India)	370
Sri-Lanka (Sri Lanka)	151
Papouasie-Nouvelle-Guinée (Papua New Guinea)	127
Vietnam (Vietnam)	124
Malaisie (Malaysia)	120
Côte-d'Ivoire (Ivory Coast)	75
Mozambique (Mozambique)	69
Thaïlande (Thailand)	65

TABLEAU III. — Composition moyenne en protéines, cellulose et cendres des différents tourteaux (en % de MS), d'après Grillet 1992. — (Average protein, cellulose and ash composition of the different presscakes -as a % of DM-, according to Grillet 1992)

Tourteaux (Presscake)	Protéines (Proteins)	Cellulose (Cellulose)	Cendres (Ash)
Coprah (Copra)	20-22	14-16	6-8
Arachide décortiquée (Shelled groundnut)	48-56	4-16	4-7
Colza (Rapeseed)	32-28	11-12	6-8
Coton (délinté) (Cotton -delinted)	45-55	7-11	6-8
Soja (Soybean)	45-50	5-7	5-7
Tournesol (décortiqué) (Sunflower -hulled)	48-53	12-13	6-7
Lin (Linseed)	30-35	9-11	6-8

TABLEAU IV. — Teneur en acides aminés de quelques tourteaux et champignons filamenteux. — (Amino acid contents of a few presscakes and filamentous fungi)

Tourteaux (Presscakes)	Protéines (% poids sec) (Proteins -% dry weight)	Acides aminés en % de protéines brutes (Amino acids as a % of raw proteins)			
		Lys	Met	Try	Thr
Soja (Soybean)	48	6,3	1,4	1,3	3,9
Arachide (Groundnut)	50	3,4	1,0	1,0	2,7
Tournesol (Sunflower)	30	3,6	2,5	1,3	3,6
Coprah (Copra)	23,1	2,03	1,56	0,7	2,46
<i>Aspergillus niger</i>	SCP	6,3	1,9	nd	4,2
<i>Rhizopus sp.</i>	SCP	4,8	2,4	nd	

TABLEAU V. — Enrichissement en protéines de quelques substrats agricoles par FMS en % de matière sèche (Senez *et al.*, 1980). — (Protein enrichment of some agricultural substrates by SSF, expressed as a % of dry matter -Senez *et al.*, 1980)

Substrats (Substrates)	Composition initiale (Initial composition)		Produit final (End-product)	
	Protéines (Proteins)	Carbohydrates (Carbohydrates)	Protéines (Proteins)	Carbohydrates (Carbohydrates)
Manioc (Cassava)	2,5	90	18	30
Banane (Banana)	6,4	80	20	25
Déchet de banane (Banana waste)	6,5	72	17	33
Pomme de terre (Potato)	5,0	90	20	35
Déchet de pomme de terre (Potato waste)	5,0	65	18	28



TABLEAU VI. — Liste détaillée des champignons filamenteux utilisés provenant de collections internationales et de la collection ORSTOM. — (Detailed list of the filamentous fungi used, from international collections and the ORSTOM collection).

Microorganisme ( <i>Microorganism</i> )	Numéro de référence ( <i>Reference number</i> )
<i>Aspergillus niger</i>	An 10, An 22, An 31, CH1, CH2, CH3, CH4, F38SFAX
<i>Aspergillus awamori</i>	Aa20, RE3, NRRL 3112
<i>Aspergillus nidulans</i>	J1
<i>Aspergillus oryzae</i>	V12 café ( <i>V12 coffee</i> ), Ao8
<i>Aspergillus sp.</i>	C11 café ( <i>C11 coffee</i> ), F1, C23B25, c21
<i>Aspergillus foetidus</i>	NRRL 341
<i>Aspergillus koji</i>	Koji
<i>Aspergillus carbonarius</i>	AMC
<i>Penicillium sp.</i>	C16A25, Pn4, V26A25, Augustin
<i>Penicillium roquefortii</i>	RE10, V33 café ( <i>V33 coffee</i> )
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2275
<i>Penicillium italicum</i>	CECT 2294
<i>Trichoderma harzianum</i>	Th 15, Br 105, F470, Th 31
<i>Trichoderma polysporum</i>	AGI
<i>Rhizopus sp.</i>	NRRL, 21R, 22R
<i>Rhizopus stolonifer</i>	MUCL 185, MUCL 189
<i>Rhizopus oligosporus</i>	NRRL 2710, NRRL 199
<i>Rhizopus microsporus</i>	MUCL 9667, ATCC
<i>Rhizopus circicans</i>	NRRL 1475
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb

### Milieux de culture

Les souches ont été repiquées régulièrement sur milieu "Potato dextrose agar" (Difco PDA réf. 0013-01-4). Elles sont incubées pendant 7 jours à 29°C et conservées à 4°C pendant environ 6 mois.

Le comptage des microorganismes a été réalisé sur les milieux suivants: milieu "Plate count agar" (Difco PCA réf. 0479-01-1) pour les bactéries; milieu "Potato dextrose agar" (Difco PDA réf. 0013-01-4) additionné de 0,5 g/l de chloramphénicol pour les champignons filamenteux et milieu Sabouraud (Difco Sabouraud réf. 0109-17-1) additionné de 0,5 g/l de chloramphénicol pour les levures. Ces milieux ont été inoculés avec 0,2 ml de suspensions d'échantillons de tourteaux de coprah, convenablement dilués.

Les spores ont été obtenues à partir de culture de 7 jours sur milieu PDA inoculé dans la masse (Roussos, 1982).

Tous les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 30 minutes.

### Fermentation en milieu solide (FMS)

La méthode de culture utilisée est celle mise au point à l'ORSTOM (Raimbault et Alazard, 1980), adaptée pour notre étude: le tourteau de coprah est humidifié à 50% avec une solution minérale contenant les sels suivants (g/100 g de substrat poids sec):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0,36;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 5,00;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3,6; Urée: 0,9;  $\text{MgSO}_4$ : 0,3;  $\text{CaCl}_2$ : 0,3. Le pH de la solution n'est pas ajusté; il affiche une valeur de 7,45. Le substrat humidifié a été homogénéisé avec un batteur-malaxeur et autoclavé 20 min à 120°C. Après refroidissement il a été inoculé avec une suspension de  $2 \cdot 10^7$  spores par g de substrat poids sec (SPS). L'humidité du substrat a été ramenée à 70% à l'aide de la suspension de spores. Le matériel inoculé a été réparti dans des bioréacteurs de type colonne en verre de 4 cm de diamètre et de 20 cm de hauteur à raison de 70 g de produit à fermenter. Les colonnes ont été placées dans un bain marie thermostaté à 30°C et ont reçu une aération régulée de 40 ml/min/colonne pendant 48 heures. Pour la sélection des souches, nous avons utilisé un dispositif de FMS contenant 24 colonnes et réalisé des séries de 8 souches en triple exemplaire. La figure 1 présente une vue schématique du dispositif général de FMS équipé d'un dispositif d'analyse automatisé des gaz par CPG (Saucedo, 1991).

### Culture media

The strains were regularly transferred on Potato Dextrose Agar medium (Difco PDA ref. 0013-01-4). They were incubated for 7 days at 29°C and kept at 4°C for around 6 months.

The microorganisms were counted on the following media: Plate Count Agar medium (Difco PCA ref. 0479-01-1) for bacteria; Potato Dextrose Agar (Difco PDA ref. 0013-01-4) with 0.5 g/l of chloramphenicol for filamentous fungi and Sabouraud medium (Difco Sabouraud ref. 0109-17-1) with 0.5 g/l of chloramphenicol for yeasts. These media were inoculated with 0.2 ml of appropriately diluted copra cake sample suspensions.

Spores were obtained from 7-day cultures on the PDA medium inoculated into the agar (Roussos, 1982).

All the culture media were sterilized in the autoclave at 110°C for 30 min.

### Solid state fermentation (SSF)

The culture method used was that developed at ORSTOM (Raimbault and Alazard, 1980), adapted for our study as follows: the copra cake was moistened to 50% with a mineral solution containing the following salts (g/100 g of substrate dry weight):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.36;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 5.00;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.6; Urea: 0.9;  $\text{MgSO}_4$ : 0.3;  $\text{CaCl}_2$ : 0.3. The pH of the solution was kept the same at 7.45. The humidified substrate was mixed in a mixer-blender and autoclaved for 20 min at 120°C. After cooling, it was inoculated with a suspension of  $2 \cdot 10^7$  spores per gramme of substrate dry weight (SDW). Substrate humidity was increased to 70% with the spore suspension. The inoculated material was divided up and placed in glass column type bioreactors (4 cm in diameter, 20 cm long) at a rate of 70 g per column for fermentation. The columns were placed in a temperature regulated water bath at 30°C with regulated aeration at 40 ml/min/column for 48 hours. For strain selection, we used an SSF system comprising 24 columns, with series of 8 strains in triplicate. Figure 1 is the diagrammatic representation of the general SSF system equipped with an automatic GC gas analysis device (Saucedo, 1991).

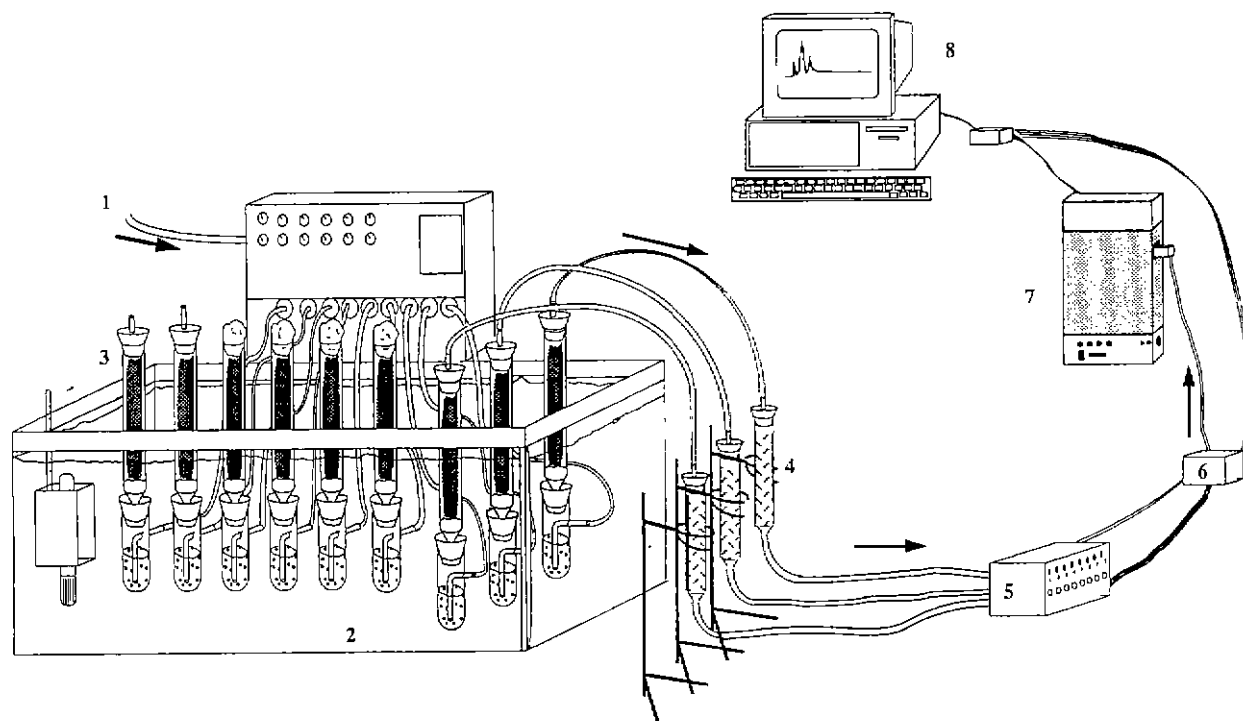


FIG. 1. — Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz. — (Automatic solid state fermentation gas analyzer using a gas chromatograph)

- |   |   |
|---|---|
| 1. Entrée air (Air intake)                              | 5. Echantillonneur (Sampler)  |
| 2. Bain-thermostaté (Temperature controlled water bath) | 6. Boîtier de commande de l'injection automatique (Automatic injection control box) |
| 3. Colonnes de fermentation (Fermentation columns)      | 7. Chromatographe en phase gazeuse (Gas chromatograph)                              |
| 4. Colonnes en silica gel (Silica gel columns)          | 8. Ordinateur (Computer)  |

### Contrôle et suivi de la fermentation

Le système automatisé d'analyse des gaz mis au point au laboratoire a été réalisé en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (Saucedo *et al.* 1993). L'appareil est connecté à un microordinateur muni d'un programme d'intégration des chromatogrammes. Le système permet de suivre la respiration sur 8 colonnes de fermentation simultanément. Les résultats sont immédiatement disponibles sous forme de fonction : concentration en gaz (%) =  $f(\text{temps})$ . Ces résultats sont stockés sous un format texte (ASCII) permettant le transfert des données pour leur traitement ultérieur. Ainsi les cinétiques de production de  $\text{CO}_2$  ou de consommation d' $\text{O}_2$  peuvent être rapportées aussi bien au débit d'air traversant la colonne de fermentation qu'à la quantité de matière sèche initiale (Saucedo *et al.* 1993).

### Traitement et analyses des échantillons

En début et en fin de la FMS des échantillons représentatifs ont été prélevés pour les observations microscopiques et les analyses. La figure 2 illustre le traitement et les analyses subies par ces échantillons avant d'être congelés puis lyophilisés. Ils ont été ensuite réduits en poudre très fine et conservés à la température ambiante dans des pots fermés.

### La matière sèche

Elle est calculée par différence de pesée après séchage de l'échantillon pendant 24 h à  $105^\circ\text{C}$ .

### Fermentation control and monitoring

The automatic gas analysis system developed in the laboratory involved gas chromatography (Saucedo *et al.*, 1993). The equipment was connected up to a microcomputer loaded with a chromatogram integration programme. The system simultaneously monitored the respiration in 8 columns. The results were immediately available in function form: gas concentration (%) =  $f(\text{time})$ . The results were stored in text format (ASCII) enabling data transfer for subsequent processing. Thus  $\text{CO}_2$  production or  $\text{O}_2$  consumption kinetics can be related as much to the air flow through the fermentation column as to the initial amount of dry matter (Saucedo *et al.*, 1993).

### Sample processing and analysis

Representative samples were taken at the beginning and end of the SSF process for microscopic observation and analyses. Figure 2 shows the treatments and analyses undergone by these samples before being frozen then freeze-dried. They were then reduced to very fine powder and kept at room temperature in sealed pots.

### Dry matter

This was calculated from weight differences after drying the sample for 24 hrs at  $105^\circ\text{C}$ .

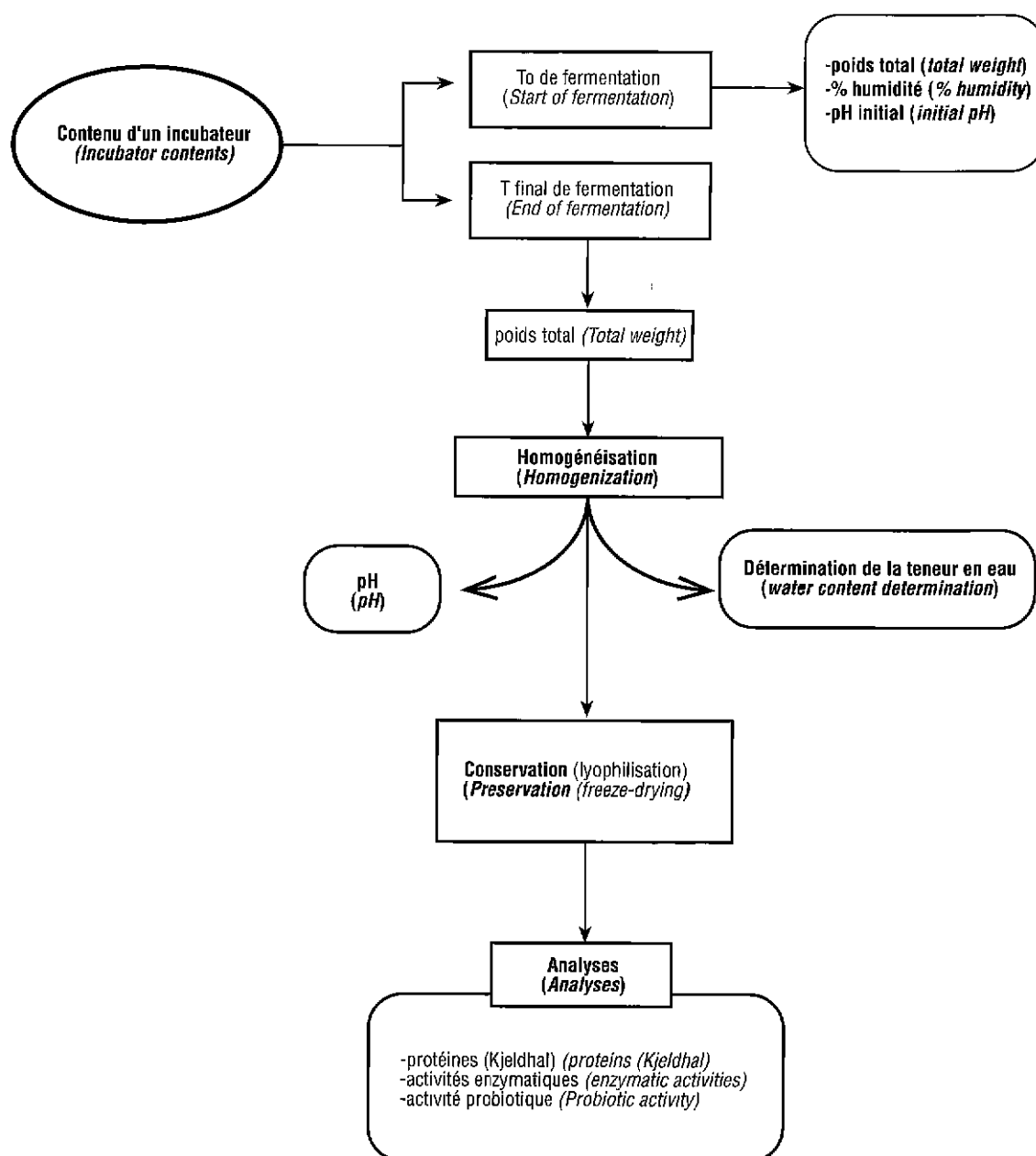


FIG. 2. — Traitement des échantillons de tourteau de coprah fermenté en vue de la réalisation des analyses. — (Fermented copra cake sample treatment for analysis)

### Le pH

La détermination du pH se fait directement sur 5 g de l'échantillon de la fermentation remis en suspension dans 100 ml d'eau distillée.

### Les protéines

Elles ont été évaluées par le dosage de l'azote total en utilisant la méthode de carbonisation totale (CHN) avec un appareil LECO SP 428 (USA). A l'azote total on a soustrait la quantité d'azote ammoniacal déterminé par colorimétrie en utilisant le dosage des  $\text{NH}_4$  avec l'appareil automatique Alliance Evolution II (France). Les résultats obtenus ont été multipliés par un facteur de 5,3 pour le tourteau non fermenté et par un facteur 6,25 pour les produits fermentés (Rham, 1982)

### pH

This was determined directly on 5 g of the fermentation sample suspended in 100 ml of distilled water.

### Proteins

These were evaluated by total nitrogen titration using the total carbonization method (CHN) with a LECO SP 428 apparatus (USA). The quantity of ammonium nitrogen determined by colorimetry using  $\text{NH}_4$  titration with the Alliance Evolution II automatic apparatus (France) was extracted from the total nitrogen. The results obtained were multiplied by a factor of 5.3 for the unfermented copra cake and by a factor of 6.25 for the fermented products (Rham, 1982).

## Expression des résultats de la FMS

Les résultats sont exprimés en fonction de la matière sèche initiale (MSI). Il faut cependant tenir compte de la perte de poids (sec) due à la respiration des champignons filamenteux.

## RESULTATS

### Microflore naturelle des tourteaux de coprah

Trois milieux de culture différents ont été utilisés pour le comptage de la microflore naturellement présente sur le tourteau de coprah. La distribution des populations de bactéries, de levures et de champignons filamenteux est sensiblement égale dans les trois échantillons étudiés (Fig. 3). Les bactéries représentent 98,7% de la microflore totale alors que les levures et les champignons sont présents à une très faible concentration et totalisent seulement 1,3% de la microflore présente dans les trois lots de tourteau de coprah. On note cependant pour le tourteau de coprah provenant de Côte-d'Ivoire, une très faible concentration des populations de champignons (95 Unités Formant Colonie -UFC- par gramme de tourteau poids sec). Ces populations microbiennes présentes dans le tourteau de coprah sont extrêmement faibles en comparaison avec celles des substrats agricoles tropicaux tels que la pulpe de café, le manioc et la bagasse de canne à sucre pour lesquels la microflore totale avoisine  $10^8$  colonies formées par gramme de substrat poids sec (Roussos 1985; Gaime-Perraud *et al.*, 1993). Cette différence doit être due au mode d'extraction de l'huile de coprah par pressage ou par solvant. Le séchage immédiat du tourteau empêche également une prolifération incontrôlée des microorganismes à la surface de ce substrat.

### Composition biochimique du tourteau de coprah

Les tourteaux de coprah, issus d'un procédé par voie sèche, proviennent d'Indonésie et de la Côte d'Ivoire. Ils ont été obtenus par pressage (tourteau B) suivi d'une extraction des matières grasses par addition de solvant (Tourteaux A et C). La composition comparée de ces trois tourteaux révèle une différence nette au niveau de la matière grasse et du contenu protéique (Fig. 3). Le tourteau B, obtenu par pressage, contient environ 12% de matière grasse (MG) et 13% de protéines pour 100 g de matière sèche (MS). Les tourteaux A et C sont relativement riches en protéines, contenu moyen 23% MG (%MS), et pauvres en matières grasses totales, seulement 3%. Cette différence significative justifie le procédé d'extraction par solvant permettant la récupération totale des matières grasses de coprah et la concentration en protéines des tourteaux. Cependant le contenu protéique du tourteau de coprah reste faible comparé à celui des autres tourteaux (Grillet, 1992).

### Sélection de champignons filamenteux en FMS

Les champignons filamenteux pour se développer doivent trouver dans leur environnement tous les matériaux nécessaires à la constitution de leur mycélium et une source d'énergie leur permettant d'effectuer toutes les biotransformations. Ces éléments sont surtout un substrat organique carboné, une source d'azote assimilable, et de l'eau. Pour leur approvisionnement en énergie, les champignons filamenteux ont besoin d'une source de carbone, d'oxygène et de sels minéraux. Pour notre étude, le substrat carboné est essentiellement constitué d'hydrates de

## Expression of SSF results

*The results were expressed as a function of initial dry matter (IDM). However, it is necessary to take into account the (dry) weight loss due to the respiration of the filamentous fungi.*

## RESULTS

### Natural microflora of copra cake

*Three different culture media were used to count the microflora naturally present in copra cake. The distribution of bacteria, yeast and filamentous fungus populations was largely the same in the three samples studied (Fig. 3). Bacteria accounted for 98.7% of the total microflora, whilst yeasts and fungi were present in very low concentrations and only amounted to 1.3% of the microflora in the three copra cake samples. However, there was a very low concentration of fungus populations in the copra cake from the Ivory Coast (95 Colony Forming Units (CFU) per gramme of cake dry weight). These microbial populations in the copra cake are extremely low compared to those in tropical agricultural substrates such as coffee pulp, cassava and sugarcane bagasse, for which total microflora approaches  $10^8$  colonies formed per gramme of substrate dry weight (Roussos 1985; Gaime Perraud *et al.*, 1993). This difference must be due to the copra oil extraction method by pressing or solvent. Immediate drying of copra cake also prevents uncontrolled proliferation of microorganisms on the surface of the substrate.*

### Biochemical composition of copra cake

*The copra cakes obtained by the dry process came from Indonesia and the Ivory Coast. They were obtained by pressing (cake B) followed by oil extraction through solvent addition (cakes A and C). A comparison of the composition of these three cakes revealed a clear difference in fat and protein contents (Fig. 3). Cake B, obtained by pressing, contained approximately 12% fat and 13% proteins for 100 g of dry matter (DM). Cakes A and C were relatively rich in proteins, mean content 23% fat/DM, and poor in total fats, only 3%. This significant difference vindicates the use of the solvent extraction process with total recovery of the fats in the copra and the protein concentrations in the presscakes. However, the protein content of copra cake remains low compared to that of other presscakes (Grillet, 1992).*

### Selection of filamentous fungi in SSF

*In order to develop, filamentous fungi need to find all the materials necessary for the formation of their mycelium in their environment, along with an energy source enabling them to achieve all their biotransformations. These elements are primarily an organic carbon substrate, a source of assimilable nitrogen and water. For their energy supply, filamentous fungi need a source of carbon, oxygen and mineral salts. In our study, the carbon substrate was essentially carbohydrates and copra cake fibres. This substrate was involved in both biomass*

**Composition chimique  
(Chemical composition)**

**Composition microbiologique  
(Microbiological composition)**

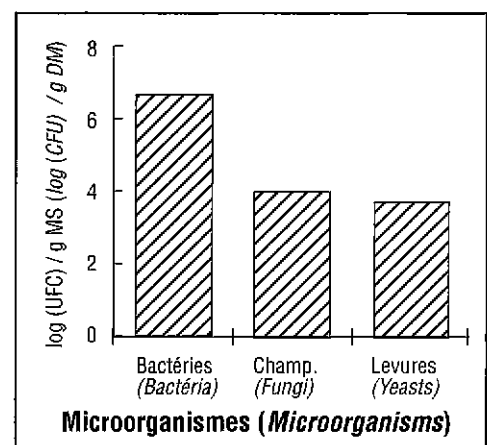
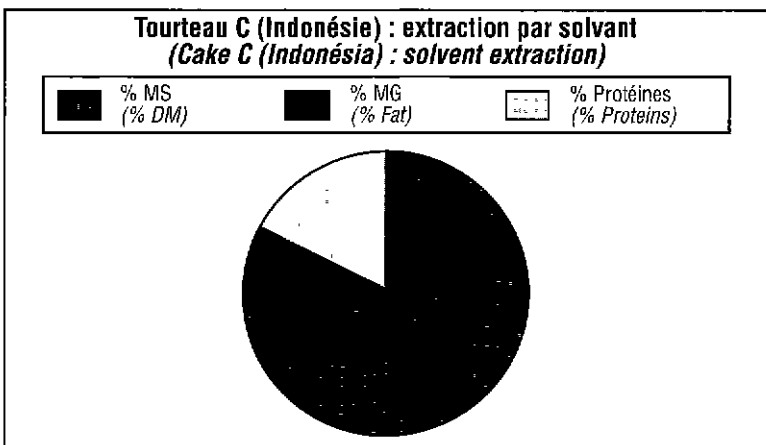
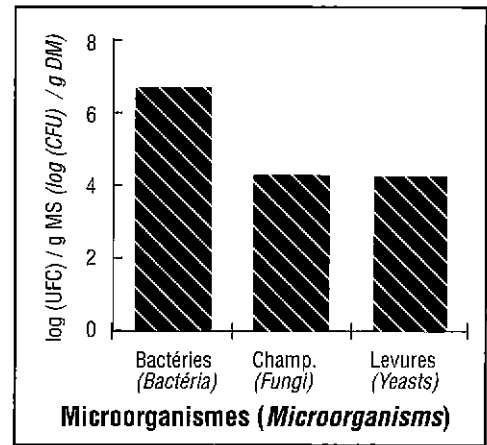
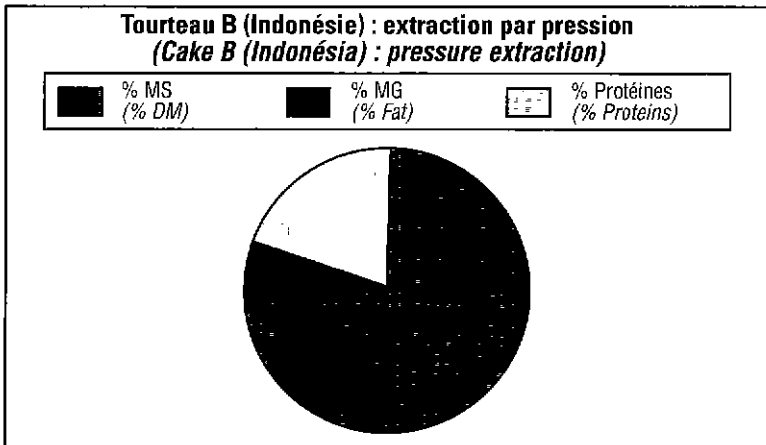
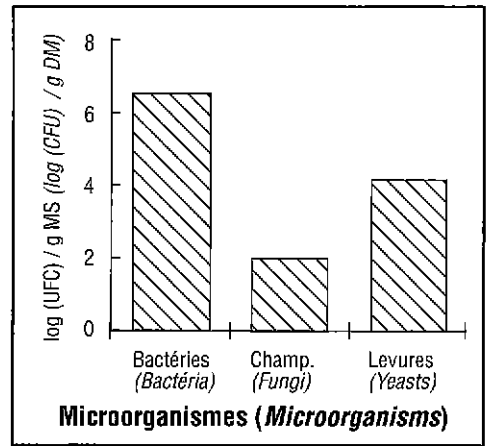
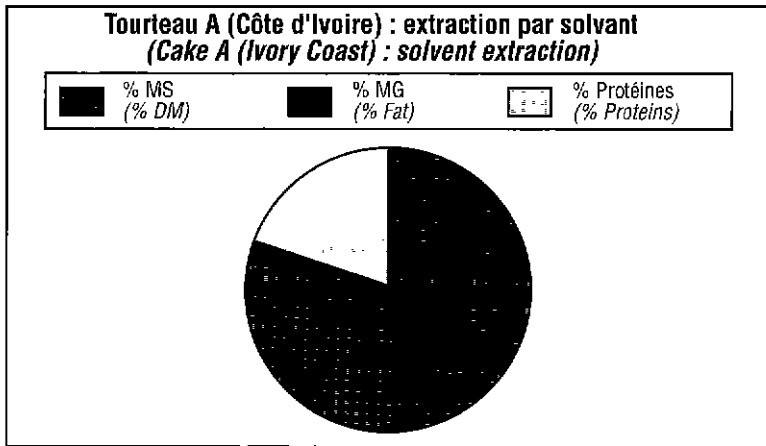


FIG. 3. — Composition chimique et microbiologique de trois tourteaux de coprah — (Chemical and microbiological composition of three copra cakes)



carbone et des fibres du tourteau de coprah. Ce substrat intervient à la fois pour la constitution de la biomasse et pour la production d'énergie. La source d'azote est apportée par le mélange de sulfate d'ammonium et de l'urée contenus dans la solution minérale qui a été rajoutée au tourteau de coprah avant la fermentation. Par ailleurs, les teneurs en  $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$  issus de la fermentation solide sont directement liées à l'activité microbienne. Pour cette raison nous avons utilisé principalement la production de  $\text{CO}_2$  total ainsi que l'enrichissement en protéines du tourteau de coprah comme critères dominants pour la sélection de meilleures souches.

Cinquante et une souches de champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Beauveria*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Trichoderma* ont été testées au cours de cette première étape de sélection. Toutes ces souches se sont bien développées sur le tourteau de coprah en FMS bien que présentant des profils respirométriques différents. Cela est sans doute dû à leurs différences physiologiques.

## Production de $\text{CO}_2$

La production de  $\text{CO}_2$  a été retenue comme critère de sélection étant donné qu'il reflète indirectement la croissance des champignons cultivés sur des substrats en milieu solide. Les souches des genres *Trichoderma*, *Rhizopus* ainsi que la souche de *Beauveria bassiana* ont été écartées après le premier passage de sélection car elles présentent des inconvénients; soit elles sont très lentes à germer (*Trichoderma*), la phase de latence pouvant durer 20 h; soit la préparation de l'inoculum ou plutôt la récolte des spores est problématique ou encore mal maîtrisée, c'est le cas des *Rhizopus*; quant à la souche de *Beauveria*, la production même de spores est à mettre au point.

Les cinétiques comparées de la production globale de  $\text{CO}_2$  pour les différentes souches de champignons filamenteux sélectionnées montrent une nette différence de production de  $\text{CO}_2$  entre différentes souches (Fig. 4). Cette production de  $\text{CO}_2$  varie de 40 à 220 ml/g MSI suivant la souche. En particulier *Penicillium* sp (N°45) produit la quantité la plus importante de  $\text{CO}_2$  alors qu'*Aspergillus niger* (N°16) produit les quantités les plus faibles.

L'étude du métabolisme respiratoire permet de suivre la croissance des champignons filamenteux au cours de la FMS de façon non destructive. Les profils respirométriques, production de  $\text{CO}_2$  en fonction du temps de fermentation, pour les différentes souches sélectionnées sont présentés dans la figure 5. Pour l'ensemble des souches on note clairement les quatre principales phases de croissance: phase de latence, phase de croissance exponentielle, phase stationnaire et phase de lyse de mycélium. La phase de latence correspond au temps de germination de spores. Généralement cette phase dure entre 6 et 12 heures. A l'exception d'*Aspergillus carbonarius* qui a une phase de latence très courte, 3 heures seulement, les autres souches se situent différemment (Fig. 5). Il est important de noter que pour l'ensemble des souches retenues, la phase stationnaire est atteinte à des temps variables qui sont compris entre 14 h et 35 heures de fermentation en milieu solide. Cette phase correspond à une stabilisation de la production du  $\text{CO}_2$  et de la consommation d' $\text{O}_2$ . Sa durée est très courte pour certaines souches. Pendant cette phase on observe un arrêt de la croissance du champignon (Rambault et Alazard, 1980). Selon ces auteurs, cette activité respiratoire traduit une consommation du substrat pour maintenir la biomasse synthétisée en état d'activité ou pour produire des métabolites secondaires. Quoi qu'il en soit, dans l'optique de l'enrichissement en protéines du tourteau de coprah, cette consommation du substrat sans augmentation de la biomasse est un phénomène indésirable qui conduit à une diminution rapide du rendement de la transformation. Afin de l'éviter, il est important d'arrêter la fermentation au début de la phase stationnaire.

*formation and energy production. The nitrogen source was provided by the mixture of ammonium sulphate and urea contained in the mineral solution added to the copra cake before fermentation. The  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  contents derived from solid state fermentation were directly linked to microbial activity, hence we mostly used total  $\text{CO}_2$  production and copra cake protein enrichment as the dominant criteria for selecting the best strains.*

*Fifty-one filamentous fungus strains belonging to the Aspergillus, Beauveria, Penicillium, Rhizopus and Trichoderma genera were tested during this initial selection stage. All these strains developed well on copra cake in SSF, though with different respirometric profiles. This was no doubt due to their physiological differences.*

## $\text{CO}_2$ production

*$\text{CO}_2$  production was adopted as a selection criterion, since it indirectly reflects the growth of the fungi grown on substrates in a solid medium. The strains of the Trichoderma and Rhizopus genera, and the Beauveria bassiana strain were discarded after the first selection step, since they involved certain drawbacks: either they were too slow to germinate (Trichoderma), with a latency phase of up to 20 hours, or inoculum preparation or rather spore collection was problematical or still not totally mastered, which was the case with Rhizopus; as regards the Beauveria strain, actual spore production remains to be mastered.*

*The comparative kinetics of overall  $\text{CO}_2$  production for the selected filamentous fungus strains revealed a marked difference between the different strains (Fig. 4), varying from 40 to 220 ml/g IDM depending on the strain. In particular, Penicillium sp. (No. 45) produced the largest amount of  $\text{CO}_2$ , and Aspergillus niger (No. 16) the smallest amounts.*

*Filamentous fungus growth during SSF was monitored non-destructively by a study of respiratory metabolism. The respirometric profiles,  $\text{CO}_2$  production depending on fermentation time, for the different strains selected are given in figure 5. For the strains as a whole, the main four growth phases were clearly seen: latency, exponential growth, stationary growth and mycelium lysis. The latency phase corresponds to the time taken for spores to germinate, usually between 6 and 12 hours. Apart from Aspergillus carbonarius, which has a very short latency phase (only 3 hours), the other strains differ (figure 5). It is important to note that the stationary phase for the strains as a whole occurred after periods varying from 14 to 35 hours of solid state fermentation. This phase corresponds to stabilization of  $\text{CO}_2$  production and  $\text{O}_2$  consumption. It was very short for some of the strains. Fungus growth was seen to halt during this phase (Rambault and Alazard, 1980). According to these authors, this respiratory activity reflects substrate consumption to keep the synthesized biomass active or produce secondary metabolites. Whatever the case, this substrate consumption without biomass increase is an undesirable phenomenon for copra cake protein enrichment, which leads to a rapid drop in transformation yield. To avoid this, it is important to stop fermentation at the start of the stationary phase.*

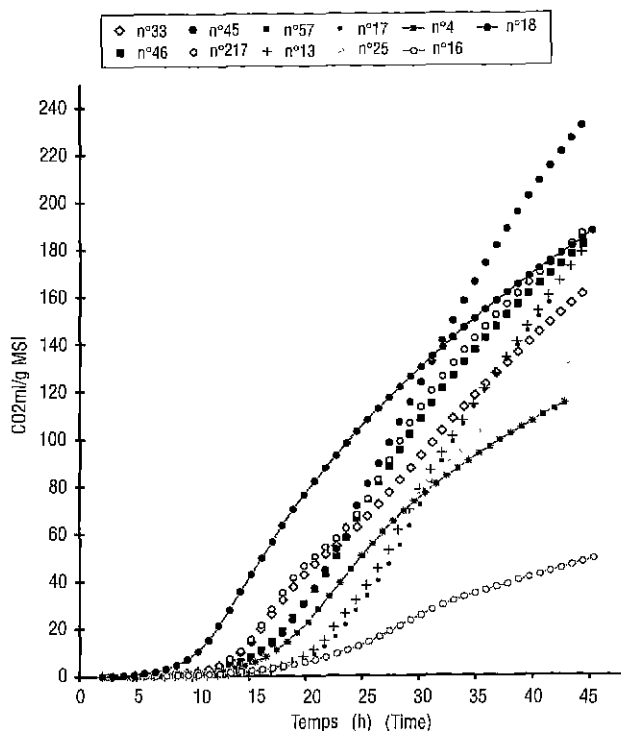


FIG. 4. — Comparaison de la production totale de  $\text{CO}_2$  pour les différentes souches de champignons filamenteux sélectionnées, cultivées sur tourteau de coprah à  $30^\circ\text{C}$  — (Comparison of total  $\text{CO}_2$  production for the different filamentous fungus strains selected, grown on copra cake at  $30^\circ\text{C}$ ).

- Evolution de la matière sèche au cours de la fermentation

Elle est calculée par différence de pesée après séchage de l'échantillon pendant 24 h à  $105^\circ\text{C}$ . Cette mesure est indispensable en fermentation solide; la dégradation des substrats carbonés produisant de l'eau, la perte de poids sec due à la respiration ainsi que le transfert de l'eau par le courant d'air provoquent des variations de l'humidité au cours de la fermentation. La perte de poids du substrat a été variable suivant les souches (7-35%) après 45 heures de FMS. Elle s'explique par le dégagement de  $\text{CO}_2$  produit lors de la respiration du champignon.

- Evolution de la biomasse

Nous ne retiendrons que les résultats des protéines calculés à partir de la composition élémentaire de l'azote auquel on a soustrait la quantité d'azote ammoniacal. Le dosage des protéines par la méthode de Lowry ayant donné des résultats variables dus probablement à des interférences provenant de sucres et d'autres composés du tourteau. Les dosages des protéines pour les différents échantillons analysés obtenus après 45 heures de FMS montrent que les souches 25, 45, 46, 18 et 17 (Tabl. VII) sont les plus performantes (Fig. 6). Elles pourraient donc être retenues comme meilleures souches si l'on ne prend en compte que le critère des protéines produites.

En prenant en compte les deux critères de sélection simultanément ( $\text{CO}_2$ , protéines), on remarque globalement que

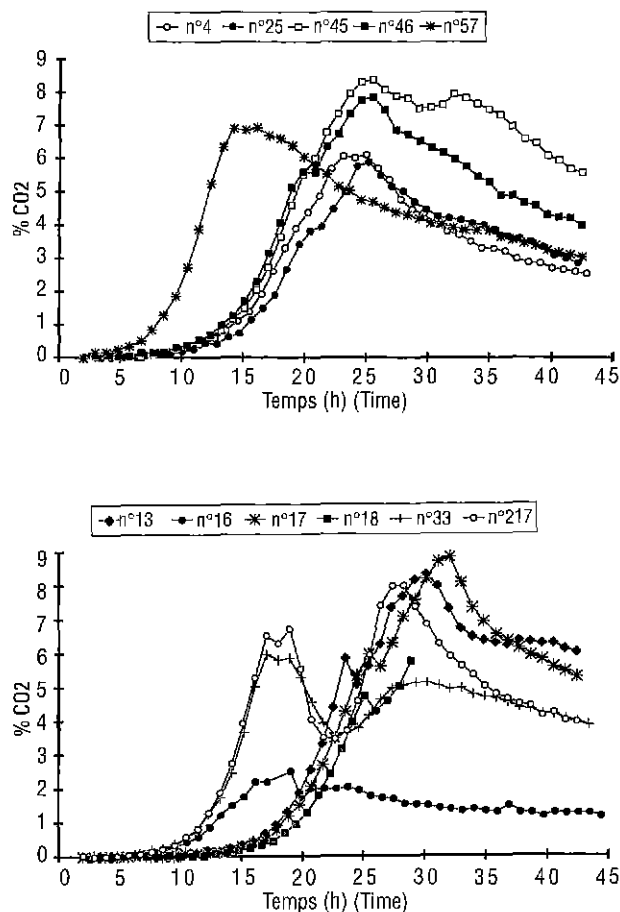


FIG. 5. — Profil respirométriques (production de  $\text{CO}_2$ ) des différentes souches de champignons filamenteux sélectionnées, cultivées sur tourteau de coprah à  $30^\circ\text{C}$  — (Respirometric profile - $\text{CO}_2$  production- of the different filamentous fungus strains selected, grown on copra cake at  $30^\circ\text{C}$ ).

- Changes in dry matter during fermentation

This is calculated from weight differences after sample drying for 24 hrs at  $105^\circ\text{C}$ . This is essential in solid state fermentation; as the breakdown of carbon substrates produces water, dry weight loss due to respiration and water transfer by the air flow lead to humidity variations during fermentation. Weight loss from the substrate varied depending on the strains (7-35%) after 45 hours' SSF. This can be explained by the release of  $\text{CO}_2$  produced during fungus respiration.

- Biomass evolution

We only took into account the protein results calculated from the elementary nitrogen composition from which the amount of ammonium nitrogen was subtracted. Protein titration by the Lowry method gave variable results, probably due to interference from sugars and other copra cake compounds. The protein titrations for the different samples analyzed obtained after 45 hours of SSF revealed that strains 25, 45, 46, 18 and 17 (Table VII) were the most effective (Fig. 6). They could therefore be chosen as the best strains if protein production were the only criterion.

If both selection criteria ( $\text{CO}_2$ , proteins) were taken into account at the same time, it was generally seen that the strains

TABLEAU VII. — Principales caractéristiques des souches sélectionnées, cultivées pendant 45 heures sur tourteau de coprah en fermentation solide. — (Main characteristics of selected strains grown for 45 hours on copra cake in solid state fermentation)

N° souche (Stain No)	Microorganisme (Microorganism)	Référence (Reference)	CO <sub>2</sub> ml/g MSI (48 h) (CO <sub>2</sub> ml/g IDM -48 hours)	Protéines % MSI (Proteins -% IDM)	Germination (heures) (Germination -hours)
16	<i>Aspergillus niger</i>	C23B25	51.9	31,15	8
17	<i>Aspergillus niger</i>	CH1	177,99	31,32	12
217	<i>Aspergillus niger</i>	F38SFAX	190.12	30,27	8
33	<i>Aspergillus awamori</i>	RE3	164.25	29,85	7
13	<i>Aspergillus sp.</i>	C11B25	184.2	31,29	12
18	<i>Aspergillus sp.</i>	CH2	187,19	31,81	14
57	<i>Aspergillus carbonarius</i>	AMC	187,2	28,58	3
4	<i>Penicillium sp.</i>	Agustin	114,4	31,4	8
45	<i>Penicillium sp.</i>	V26A25	237	33,5	8
46	<i>Penicillium roquefortii</i>	V33A25	185,3	32,39	6
25	<i>Penicillium italicum</i>	CECT2294	136.25	33,74	9

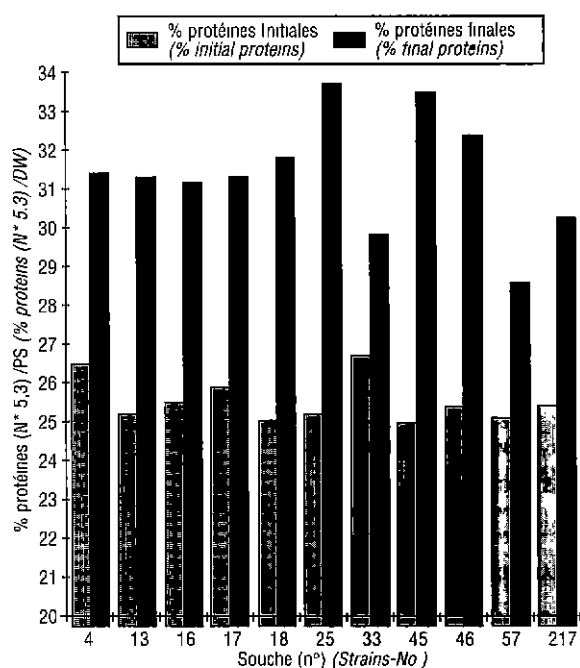


FIG. 6. — Histogramme de l'enrichissement en protéines du tourteau de coprah par les champignons filamenteux sélectionnés, cultivés sur tourteau de coprah à 30 °C pendant 48 heures. — (Histogram of copra cake protein enrichment by the filamentous fungi selected, grown on copra cake at 30°C for 48 hours)

les souches les plus productrices de CO<sub>2</sub> sont également celles présentant des teneurs en protéines les plus élevées (Angokai, 1993); c'est le cas des souches 45, 46 et 18. La souche 25 produit beaucoup de protéines et peu de CO<sub>2</sub>. Cette souche est caractérisée par un temps de latence long et une vitesse faible de la croissance exponentielle. Nous l'avons écarté pour ces deux raisons. En revanche, les souches 45, 46 et 18 paraissent être intéressantes et feront l'objet d'une optimisation des conditions de culture.

Au vu de ces résultats, nous pouvons affirmer que le volume total de CO<sub>2</sub> produit ainsi que la quantité de protéines produites au cours de la fermentation sont des critères efficaces pour sélectionner des champignons filamenteux dans l'optique d'enrichir le tourteau de coprah en protéines

## CONCLUSION

Les teneurs en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> issues de la fermentation solide sont directement liées à l'activité microbienne et à la production de biomasse. Les analyses de gaz permettent de

producing most CO<sub>2</sub> also had the highest protein contents (Angokai, 1993); this was the case with strains 45, 46 and 18. Strain 25 produced many proteins and little CO<sub>2</sub>. This strain is characterized by a long latency phase and slow exponential growth. We discarded it for these two reasons. However, strains 45, 46 and 18 appeared to be interesting and will be used in endeavours to optimize culture conditions.

Given these results, we can state that the total volume of CO<sub>2</sub> and total quantity of proteins produced during fermentation are effective criteria for selecting filamentous fungi for protein enrichment of copra cake.

## CONCLUSION

The CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> contents resulting from solid state fermentation are directly linked to microbial activity and biomass production. Gas analyses can be used to monitor the

suivre les différentes phases de la fermentation, *in situ*, en continu et de façon non destructive. Parmi les souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, 11 souches ont été présélectionnées. Elles appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Le rendement moyen d'enrichissement en protéines est de 20%. Toutefois l'objectif n'est pas totalement atteint. Une optimisation des conditions de culture, en particulier de la composition des milieux de culture, s'impose afin d'augmenter davantage ces rendements protéiques et d'atteindre 50%.

*different fermentation phases in situ on a continuous and non-destructive basis. Eleven Penicillium and Aspergillus strains were preselected. The mean protein enrichment yield was 20%. Even so, the target was not fully reached. Culture conditions, particularly medium composition, need to be optimized to further increase these protein yields to 50%.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANGOKAI M.A —Enrichissement en protéines du tourteau de coprah par fermentation en milieu solide Mémoire DESS Nutrition et Alimentation dans les pays en développement. Université de Montpellier II, Juin 1993 43 p
- [2] BALDENSPERGER J., LE MER J., HANNIBAL L., QUINTO P J —Solid state fermentation of bananas wastes *Biotechnol.Let.* (1985), 7,743-748
- [3] BARRETO de MENEZES T J, SALVA J G., BALDINI V.L., PAPINI R S., SALES A.M —Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. *Process Biochem* (1989) 167-171
- [4] DURAND A. —Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de microorganismes filamenteux (1983) Les Colloques de l'INRA N° 18, 263-277
- [5] DURAND A, CHEREAU D. —A new pilot reactor for solid state fermentation application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol.Bioeng* (1988) 31: 476-486
- [6] GAIME-PERRAUD I., ROUSSOS S., MARTINEZ CARRERA D. —Endogen microflora of fresh coffee pulp. *Micologia Neotropical Aplicada* (1993) 6: 95-103
- [7] GONZALEZ-BLANCO P, SAUCEDO-CASTAÑEDA G., VINIEGRA-GONZALEZ G —Protein enrichment of sugar cane by-products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus* *J. Ferm.Bioeng.* (1990) 5 351-354
- [8] GRILLET C —Les tourteaux de coprah et de palmiste : composition, valeur alimentaire, dégradabilité Mémoire de Mastere, CIRAD-EMVT, Maisons Alfort, Avril 1992, 126 p.
- [9] HOURS R A, VOGET C E., ERTOLA R.J —Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biol.Wastes* (1988). 221-228
- [10] LONSANE B.K., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALEZ G, KILDHIAL N P., RAMAKRISHNA M M., KRISHNAIAH M.M. —Scale-up strategies for solid state fermentation system State of the Art. *Process Biochem.* (1992), 27: 259-273
- [11] MALDONADO M C., NAVARRO, CALLIERI A S —Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as the carbon source *Biotechnol Let* (1986), 7 501-504
- [12] MONTET D., RATOMAHENINA R. BA A., PINA M, GRAILLE J., GALZY P. —Production of single cello protein from vegetable oils *J Ferment.Technol.* (1983) 61: 417-420
- [13] PEÑALOZA W., MOLINA M., GOMEZ R., BRESSANI R —Solid state fermentation : an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl Environ. Microbiol* (1985), 388-393
- [14] RAIMBAULT M. GERMON J C —Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides (1976). Brevet Anvar N° 76.06.677
- [15] RAIMBAULT M., ALAZARD D —Culture method to study fungal growth in solid fermentation *Europ.J Appl.Microbiol. Biotechnol.* (1980), 9 : 199-209
- [16] RAIMBAULT M., REVAH S., PINA F, VILLALOBOS P. —Protein enrichment of cassava by solid state fermentation using molds isolated from traditional foods *J Ferment Technol* (1985), 63 : 395-399
- [17] RHAM O —La proportion d'azote dans les protéines et le facteur de calcul protéine / azote *Lebensm.Wiss. Technol.* (1982) 15 : 226-231
- [18] ROLZ C., DE LEON R, DE ARRIOLA M.C. —Solid Substrate Growth of white rot fungi on coffee pulp. *Acta Biotechnol* (1988) 8 211-223
- [19] ROUSSOS S., RAIMBAULT M. —Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I- Screening des souches cellulolytiques *Ann. Microbiol.* (1982), 133 : 455-464.
- [20] ROUSSOS S., GARCIA J-L, RAIMBAULT M —Valorisation de la cossette de betterave par culture de *Trichoderma harzianum*. *Rev. Ind. Agric. Alim.* (1985.), 100 : 449-452.
- [21] ROUSSOS S., RAIMBAULT M VINIEGRA-GONZALEZ G., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B K. —Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micol. Neotrop. Apl.* (1991) 4 83-98
- [22] SAUCEDO-CASTAÑEDA G —Contrôle du métabolisme de *Schwanniomycetes castellii* cultivé sur support solide. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II, 1991, 212 p.
- [23] SAUCEDO-CASTAÑEDA G, TREJO-HERNANDEZ M.R. LONSANE B K., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., DUFOUR D., RAIMBAULT M. —On-line monitoring and control system for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations in aerobic and anaerobic solid state fermentations. *Process Biochemistry* (1993) 29 :13-24
- [24] SENEZ J.C., RAIMBAULT M, DESCHAMPS F —Protein enrichment of starchy substrates for animal feeds by solid state fermentation. *World Animal* (1980): 36-39
- [25] SOCCOL C R, RODRIGUEZ LEON J., MARIN B., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. —Growth kinetics of *Rhizopus arrhizus* in solid state fermentation of treated cassava *Biotechnol Techniques* (1993), 7 563-568
- [26] SRINIVAS M.R S, LONSANE B K —Ability of fungal and bacterial cultures to produce alpha-galactosidase in solid state fermentation system. *Micol.Neotrop Apl* (1993), 6 1-14
- [27] TAPIA I M, HERRERA-SALDAÑA R., VINIEGRA G.G., GUTIERREZ M., ROUSSOS S —Pulpa de café fermentada: su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes in *Memorias I Seminario Internacional de Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera* (Roussos, Licóna, Gutiérrez Eds). Inmecafe, Xalapa, 12-15 Avril 1989: 153-175
- [28] THORNE P J, WISEMAN J., COLE D.J.A., MACHIN D.H —Amino acid composition and aspects of protein quality in expeller coprah meals for pig feeding. *Trop. Sci* (1992), 32 :145-151
- [29] VINIEGRA GONZALEZ G, ROUSSOS S., RAIMBAULT M. Fermentation en milieu solide comme moyen de valorisation des produits agricoles tropicaux au Mexique *Revue ORSTOM Actualités* 34 (1991) 23-25



## RESUMEN

### **Enriquecimiento de proteínas de la torta oleaginosa de copra: Selección de hongos filamentosos de FMS**

S. ROUSSOS, L. HANNIBAL, A. DURAND, M. DIEZ, G. SAUCEDO, D. MONTET y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1994, 49, N° 5, p. 235-247

Los resultados han señalado que se pueden retener 11 cepas de las 51 probadas. Pertenecen a las especies *Aspergillus sp*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium sp.* y *Penicillium roquefortii*. El rendimiento medio de enriquecimiento de proteínas es del 20%. No obstante el objetivo no fue totalmente alcanzado. Una optimización de las condiciones de cultivo especialmente de la composición de los medios de cultivo se impone para incrementar aún más estos rendimientos proteicos y alcanzar el 50%.

**Palabras claves.** — Torta oleaginosa de copra ; fermentación en medio sólido, hongos filamentosos, proteínas.

