

DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE POR FERMENTACION SOLIDA

ROUSSOS S.(*), AQUIAHUATL A., CASSAIGNE J., FAVELA E., GUTIERREZ M., HANNIBAL L.(*), HUERTA S., NAVA G., RAIMBAULT M.(*), RODRIGUEZ W., SALAS J-A., SANCHEZ R., TREJO M. & VINIEGRA-GONZALEZ G.

La pulpa de café, rica en proteína, representa uno de los subproductos agrícolas más abundante en México y América Latina. Sin embargo su aprovechamiento en la alimentación animal se reduce notablemente debido a la presencia de compuestos tóxicos, difíciles de degradar, tales como cafeína, fenoles, taninos, ácidos clorogénico, caféico y tánico (Bressani, 1979).

La hipótesis del presente trabajo, concierne la posibilidad de utilizar la Fermentación Sólida (FS) como una alternativa de mejoramiento de la calidad nutricional de la pulpa de café, utilizando cepas de hongos filamentosos seleccionadas, no por su capacidad de sintetizar proteínas de "novo", sino por su habilidad para degradar sustancias tóxicas específicas (Aquiahuatl y col. 1987).

En estudios previos (Roussos, 1985) se presentan microorganismos con la habilidad de descomponer compuestos orgánicos complejos. Como es el caso de compuestos lignocelulósicos que son degradados por microorganismos aislados del suelo, madera y frutos. Estos microorganismos son utilizados posteriormente en la FS de paja y salvado de trigo, de cascara de remolacha y de bagazo de caña.

En relación a la degradación de cafeína y polifenoles por microorganismos, ya se ha reportado que *Fusarium oxysporum* aparentemente resiste la toxicidad y crece a bajas concentraciones de cafeína. Por otra parte *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza en su metabolismo un sistema enzimático para la oxidación de metilpurinas, parece tener xantina dehidrogenasa y uricasa, enzimas con alta especificidad para degradar compuestos muy parecidos a la cafeína como son las metilxantinas (Bergmann y col. 1962).

Depto. Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa (UAM-I); Apdo Postal 55-532; 09340 México DF

(*) ORSTOM: Institut Français de Recherche Scientifique pour le
Développement en Coopération, 213, rue Lafayette, 75010 Paris, France

Kurtzman y Schwimmer, (1971), han considerado los métodos biológicos como alternativas de extracción de la cafeína del café. Los autores encontraron que cepas de *Bacillus coagulans*, *Penicillium roqueforti* y especies de *Stemphylium*, presentan capacidad para degradar la cafeína. En estos casos la cafeína es utilizada como única fuente de nitrógeno en presencia de sacarosa. Schwimmer y Kurtzman (1972) reportan la decafeinización de infusiones de café con *Penicillium crustosum*, con una concentración inicial de cafeína de 0.45-0.59 mg/ml.

Por otra parte, los polifenoles y los taninos pueden ser degradados por microorganismos presentes en la microflora del suelo, ya que utilizan los compuestos fenólicos como fuente de carbono, entre los géneros mas interesantes se encuentran: *Penicillium*, *Fusarium*, *temphylium*, *Trichoderma*, *Trichosporum*, *Aureobasidium*, entre otros (Black y Dix, 1976; Mishustin y Erofeev, 1966; Shoda y col., 1980; Itoh y col. 1980; Takahashi y col. 1981).

Peñaloza, (1981), estudió el posible mejoramiento del valor nutritivo de la pulpa de café, mediante la FS para incrementar su uso en la alimentación de animales monogástricos. Otros investigadores Aguilar (1983) y Guzmán (1983), trabajaron con FS de la pulpa de café, variando los niveles de la fuente de nitrógeno con *Aspergillus niger* sin obtener una desaparición completa de la cafeína de la pulpa.

Por otra parte trabajos de Guzmán y Martínez-Carrera (1985) en México, Rolz y col. en Guatemala (1988) demostraron la factibilidad de producir varios hongos comestibles (champiñones) como son *Pleurotus* y *Auricularia* sobre pulpa de café a escalas de producción comercial (Martínez-Carrera, 1989).

El presente trabajo comprende un análisis de la disponibilidad de la pulpa de café a nivel mundial y nacional, una descripción breve de la composición química de la pulpa de café y de sus principales compuestos tóxicos. Finalmente, se presenta la descripción detallada de la degradación de la cafeína de la pulpa de café por los hongos filamentosos.

DISPONIBILIDAD DE LA PULPA DE CAFE COMO MATERIA PRIMA

1. La producción de café Mundial y Nacional

En el ámbito mundial, se encontró que tan sólo para el ciclo 1986-87 se obtuvo una producción total de 80,962,000 sacos de 60 kg de café verde, es decir de 4,857,720 ton. (tabla I).

A nivel Nacional, para el ciclo 1986-87, México produjo 5,100,000 sacos de 60 kilos (306,000 ton). Con base en la tabla I, a partir del ciclo 1979-80 hasta el ciclo 1986-87 el promedio que México representa, para la producción mundial de café, es de 5.14% tabla II.

Tabla I: Producción Mundial de Café Verde (INMECAFE)

Ciclo	Continente (miles de sacos de 60kgs)				Total
	América	Africa	Asia	Oceanía	
1975-76	48,278	18,739	5,447	0.645	73,109
1976-77	34,787	19,440	6,029	0.651	60,907
1977-78	46,595	16,542	6,941	0.772	70,850
1978-79	52,504	17,990	7,696	0.751	78,941
1979-80	54,468	18,026	8,517	0.850	81,861
1980-81	55,314	21,427	8,753	0.863	86,354
1981-82	67,226	20,110	9,868	0.925	98,189
1982-83	53,241	20,374	8,449	0.654	82,778
1983-84	62,921	17,640	8,485	0.943	90,049
1984-85	59,156	20,578	9,807	0.756	90,357
1985-86	66,266	21,765	9,750	0.806	98,647
1986-87	48,137	21,331	10,588	0.906	80,962

Esto nos indica que México ocupa el cuarto o quinto lugar de producción mundial de café y solo lo superan: Brasil, Colombia, Costa de Marfil e Indonesia. Sin embargo se duda del lugar exacto que ocupa México, ya que la producción de café de Costa de Marfil, Indonesia y México son del mismo orden de magnitud y dependiendo de los ciclos la producción hay variación de un país a otro.

Tabla II: Promedio de Producción de café verde de México y Mundial
(sacos de 60 kgs; fuente INMECAFE)

Ciclo	Producción Mundial	Producción Nacional	% que México representa
1979-80	81,861,000	4,100,000	5.008
1980-81	86,354,000	4,100,000	4.748
1981-82	98,189,000	4,200,000	4.277
1982-83	82,778,000	4,560,000	5.508
1983-84	90,049,000	4,970,000	5.519
1984-85	90,357,000	4,410,000	4.880
1985-86	98,647,000	4,805,000	4.870
1986-87	80,962,000	5,100,000	6.299
Promedio total 5.14%			

2. La producción de pulpa de café en México

Para la estimación de la cantidad de pulpa de café producida por año a nivel mundial se pueden tomar en cuenta los balances de materia realizados por varios investigadores (Bressani y col.1972; Aguirre,1966; Zuluaga, 1981 y 1989). De estos trabajos resulta que el café verde representa en promedio el 52% en base seca (b.s.) del café cereza y representa el 26% b.s. de la pulpa de café. Es decir por cada 100 kg de café oro se producen, además 50 kg de pulpa de café.

Con respecto a estas consideraciones, y según los datos de las tablas I y II, la producción mundial de café verde fue de 4,857,720 toneladas para el ciclo 1986-87 y la producción de pulpa de café fue de 2,428,860 toneladas (b.s.). Estas cantidades fueron destinadas en una minoría a la obtención de abono orgánico para el mismo cafetal, y en su mayoría fueron manejados como desecho agrícola y tiradas por lo general al medio ambiente.

En lo referente a la producción Nacional, la tabla III se puede observar la cantidad de pulpa de café (b.s.) que aproximadamente produjeron los estados de la República Mexicana para el ciclo 1986-87 (INMECAFE).

Tabla III Producción aproximada de Pulpa de Café en México

Estado	sacos de 60 kgs	tons de café verde	pulpa de café en tons
Chiapas	1,688,583	101,314	50,657
Veracruz	1,516,083	90,964	45,482
Oaxaca	600,300	36,018	18,009
Puebla	716,452	42,987	21,493
Guerrero	222,333	13,399	6,699
Hidalgo	122,283	7,336	2,668
S.Luis P.	82,033	4,921	2,460
Nayarit	123,133	7,387	3,693
Jalisco	8,817	529	264
Tabasco	12,650	759	379
Colima	8,050	483	241
Querétaro	1,150	69	34
Total	5,069,300	304,158	152,079

Esto representa para el ciclo 1986-87, tan sólo para los cuatro estados principales productores de café, Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla, una producción aproximada de 135,641 toneladas de pulpa de café, es decir, el 91% del total Nacional. Esto significaría un interés particular en el caso de instalación de una industria para el aprovechamiento integral de este substrato, debido a que son los estados de Chiapas y Veracruz que podrían facilitar la mayor cantidad de materia prima (pulpa de café); los dos estados siguientes en importancia serían Oaxaca y Puebla, ambos cercanos a Chiapas y Veracruz, respectivamente.

DESCRIPCION GENERAL DE LA PULPA DE CAFE

1. Características generales

La Pulpa de Café es la parte carnosa que se encuentra entre la cáscara y los granos o semillas, llamada también mesocarpio, está formada por una capa de células esponjosas y tiene un espesor aproximado de 5 mm.(Zuluaga,1989). La pulpa de café representa aproximadamente un 40% del peso en base fresca de la cereza de café

(Tauk, 1986) y un 26% en base seca, siendo el primer producto que resulta del procesamiento del café.

2. Composición

La composición química de la pulpa de café es ampliamente desarrollada en estas memorias por Zuluaga (1989). Sin embargo hay que mencionar que en la pulpa de café se encuentran sustancias químicas atractivas para la alimentación animal (azúcares libres, proteínas, hemicelulosa, celulosa,) ; estas son estrechamente ligadas con otras (cafeína y compuestos fenólicos) las cuales pueden ser tóxicas para ciertos animales (pollos, porcinos, bovinos).

3. Compuestos tóxicos de la pulpa

El número de sustancias con un posible efecto antifisiológico en la pulpa de café no se ha determinado con exactitud, pero basados en el análisis químico de la pulpa de café, se han identificado: Cafeína, ácido caféico, Fenoles libres o monómeros, Fenoles poliméricos es decir taninos hidrolizables y condensados, que están en cantidades variables (Bressani, 1979); así como cantidades relativamente altas de Potasio.

. La cafeína

La cafeína (1,3,7 Trimetilxantina) de un peso molecular de 194,20 gr/mol es una purina llamada también metilxantina. El contenido promedio de cafeína en la pulpa de café varía de 0.6 a 1.3% b.s. (Bressani y col., 1973; Bressani, 1974), de 1.14% b.s. (Tauk, 1986).

. Taninos, Fenoles y Polifenoles

Con respecto a taninos los valores reportados son de 4.5% (Aguirre, 1966), 1.44% (Jaffe y Ortiz, 1952), 2.4% (Molina y col., 1974) y 3.7% (Zuluaga y col. 1975).

Tabla IV: Contenido promedio de compuestos fenólicos en la pulpa de café fresca según Ramírez-Martínez (1988)

Compuestos fenólicos	(promedio g/kg m.s.)	% Total
Acido protocatèquico	0.21	1.65
Catequina	0.31	2.45
Acido clorogénico	5.30	41.84
Epicatequina	2.73	21.55
Acido ferùlico	0.11	0.87
Acido clorogénico I	0.71	5.60
Acido clorogénico II	2.48	19.57
Acido clorogénico III	0.55	4.34
Rutina	0.27	2.13
Total	12.67	100.00

En lo referente a los ácidos clorogénico y caféico las cifras son 2.71% y 0.31% (Molina y col., 1974) mientras otros autores dan valores de 2.3% y 1.6% (Bressani y Elias, 1976) respectivamente.

Estudios mas recientes realizados por Ramírez-Martínez en Venezuela reportan valores mucho mas altos. En la tabla IV se reportan estos valores obtenidos por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

. El Potasio y el Acido salicílico

Es evidente por los valores de concentración en la pulpa de café, que el contenido de potasio en este material es alto, cerca de 3.20 g% (Zuluaga, 1989), estas concentraciones pueden representar un obstáculo para el uso de la pulpa de café como alimento para ciertos animales. Por otro lado, otros investigadores han encontrado 11.1% de ácido salicílico en la fracción de cenizas de este material (Aguirre, 1966), tambien limitando su utilización.

DEGRADACION DE LA CAFEINA POR LOS HONGOS FILAMENTOSOS

De los compuestos tóxicos de la pulpa de café el que destaca por su toxicidad para la alimentación animal es la cafeína (Bressani, 1979). Por esta razón en el Depto de Biotecnología de la UAM, se han iniciado una serie de investigaciones para aislar nuevos microorganismos capaces de crecer sobre este sustrato y degradar específicamente la cafeína contenida.

1. Aislamiento e identificación de los microorganismos

En la figura 1 se muestran los diferentes pasos que se han seguido para aislar de un ecosistema natural a los microorganismos "silvestres" con las características deseadas. En este caso con capacidad de crecer en un medio a base de cafeína como única fuente de nitrógeno. A continuación se detalla la metodología seguida:

a. *Recolección de muestras.* Para obtener microorganismos capaces de crecer sobre pulpa de café, es necesario buscarlos en su ecosistema natural, es decir en la finca o en el beneficio directamente. Por esta razón se recolectaron muestras de tierra, hojas y madera podridas, frutos de café dañados por las plagas o en vía de descomposición natural y colonizados por un micelio de mohos. Se trataron aproximadamente 36 muestras de Xalapa Ver., y de Soconusco Chis. principales regiones cafetaleras de México.

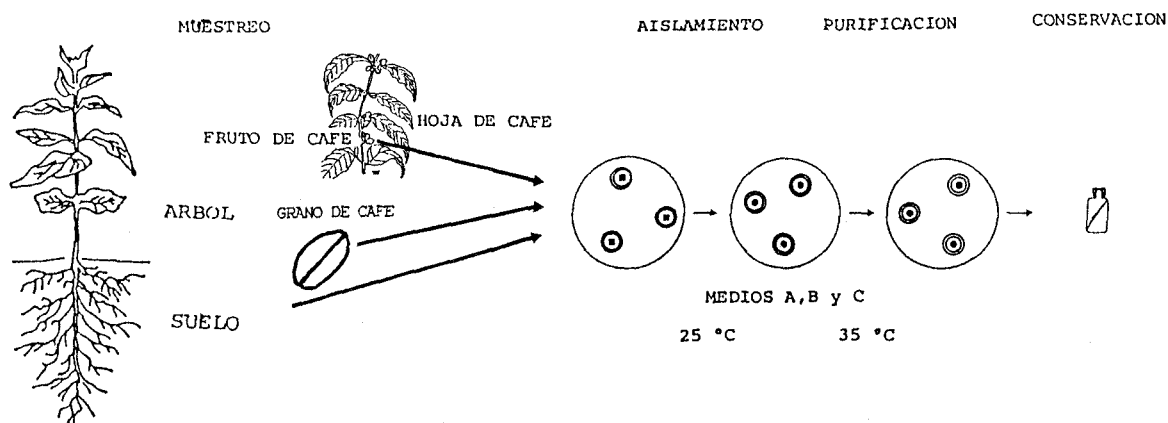


Fig. 1: Esquema de la estrategia de muestreo, aislamiento, purificación y conservación de los hongos filamentosos capaces de degradar la cafeína.

b. *Aislamiento de Microorganismos*. En la superficie de un medio de cultivo solidificado a base de café, se depositaron pedazos de muestras traídas del campo y se incubaron a 25°C o a 35°C por una semana. Alrededor de las muestras, aparecen casi siempre varias colonias de hongos filamentosos. Se aislaron de esta manera alrededor de 500 cepas (Aguilahuatl y col.1987), exclusivamente de hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras se eliminaron de los cultivos por medio de antibióticos o de selección previa.

c. *Purificación de las cepas*. La confirmación de la pureza de las cepas se realizó con observaciones macroscópicas de la colonia y microscópicas del micelio. Hoy en día se dispone de una colección de mas de 350 cepas aisladas en cultivos puros (Aguilahuatl y col.1988).

d. *Conservación de las cepas*. Para la conservación de los microorganismos, las cepas se colocan en frascos con 5 ml de medio selectivo, en refrigeración (+5°C) durante varios meses (Roussos,1989)

e. *Identificación y Taxonomía*. Considerando unicamente características morfológicas del micelio y de las formas de reproducción sexual o asexual (esporas, conidias, filalidas, vesículas) según las claves de identificación de hongos de Answorth (1973), se confirmó la pertenencia de las cepas aisladas a grupos taxonómicos bien definidos (tabla V).

Con respecto a las cepas aisladas, los géneros que se presentan de acuerdo a sus características morfológicas, son principalmente *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Zygomycete*. Se observa el efecto preponderante que la temperatura de incubación ejerce a nivel de la selección de los microorganismos. A 35°C se aislaron microorganismos "termotolerantes" y el género *Aspergillus* representa en promedio mas de 70% de los aislados. En esta temperatura de aislamiento no se obtuvieron cepas de *Penicillium*, al contrario si se utiliza una temperatura mas baja (25°) la repartición multigénero es mas variada y representativa de los ecosistemas naturales (Tabla V).

Tabla V : Identificación y distribución taxonómica a nivel del género de los hongos aislados a 25 y 35°C, a partir de muestras provenientes de Chiapas y de Veracruz.

GENEROS	CHIAPAS		VERACRUZ	
	25°C	35°C	25°C	35°C
Fusarium	27.16 %	9.09 %	9.43 %	4.17 %
Zygomycete	23.46 %	10.60 %	37.73 %	9.72 %
Aspergillus	20.99 %	68.17 %	27.64 %	75.00 %
Geotrichum	9.88 %	7.57 %	13.21 %	6.94 %
Penicillium	8.64 %	- - -	13.21 %	- - -
Trichoderma	3.70 %	1.52 %	1.89 %	1.39 %
Mucor	2.47 %	- - -	- - -	1.39 %
Rhizopus	2.47 %	1.52 %	1.89 %	1.39 %
Acremonium	1.23 %	- - -	- - -	- - -
Drechslera	- - -	1.52 %	- - -	- - -
TOTAL	100	100	100	100

Penicillium se conoce ya como un género que metaboliza la cafeína, (Kurtzman y Schwimmer, 1971; Schwimmer y col. 1971). Por otro lado *Trichoderma* y *Aspergillus* son otros de los géneros que se han encontrado con esta capacidad, el primero se ha reportado como una cepa que degrada los compuestos fenólicos, del segundo se ha encontrado mucha información sobre el enriquecimiento proteico de la pulpa de café por FMS (Peñaloza, 1981; Peñaloza y col. 1985; Gusman A.E., 1983; Aguilar M.D. 1983; de Leon R. 1988). Un género interesante para los objetivos de este trabajo.

f. *Fisiología y bioquímica*. Se investigaron las condiciones ambientales extremas de su crecimiento, para conocer mejor a los microorganismos aislados. Estos trabajos se realizaron únicamente con las cepas preseleccionadas por su alto rendimiento de degradación de la cafeína.

2. Selección de los mejores hongos filamentosos

Con objeto de obtener los mejores microorganismos para la detoxificación de la pulpa de café para la FS la selección de las cepas aisladas se llevó a cabo en cultivos líquidos o en cajas de petri considerando principalmente la aptitud para degradar la cafeína de cada cepa.

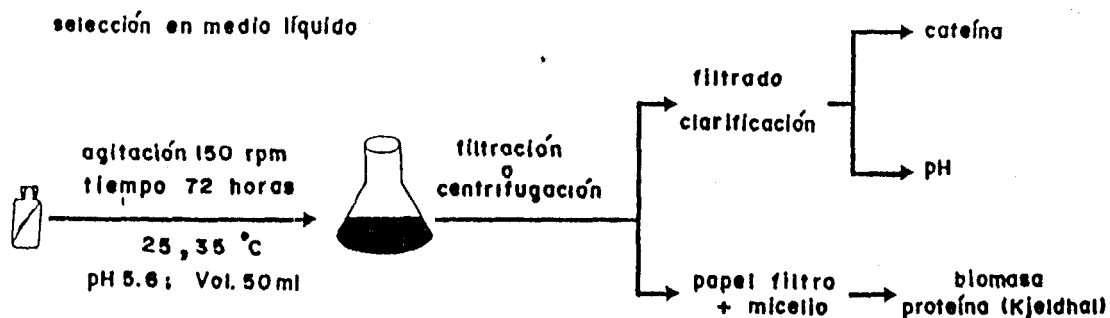


Fig. 2 : Tratamiento para los microorganismos aislados a fin de seleccionar aquellos con alta capacidad a degradar la cafeína en medio líquido agitado.

. Cultivos en medio líquido agitado

La degradación de la cafelna se estudió utilizando un medio líquido a base de cafelna (Aquiahuatl y col.1988). Las condiciones de incubación fueron de 3 a 4 días a 25 y 35°C en un baño maría con temperatura controlada y agitación de los cultivos, en matraces de 250 ml. En la fig.2, se presenta el esquema del tratamiento para los 350 microorganismos aislados.

De los 350 microorganismos aislados, se preseleccionaron 8 cepas (2 *Penicillium* y 6 *Aspergillus*) con alta capacidad a degradar la cafelna (de 90-100%). Hay que mencionar que las cepas retenidas fueron aisladas sobre medios de cultivo a base de extracto de café a 25°C (tabla VI).

Tabla VI : Rendimientos de esporulación (le) y crecimiento apical de hongos filamentosos que degradan la cafelna de la pulpa de café. Resultados obtenidos sobre PDA.

CEPA	IDENTIFICACION	le	CRECIMIENTO APICAL (mm/h)	
		Esporas/g Sps	25°C	35°C
V26A25	<i>Penicillium</i> sp	5,4x10 ⁹	0.15	0,11
V33A25	<i>Penicillium</i> roqueforti	9.3x10 ⁹	0.14	0.10
V12A25	<i>Aspergillus</i> oryzae	1.2x10 ⁹	0.24	0.26
C23B25	<i>Aspergillus</i> sp	4.8x10 ⁹	0.22	0.32
C16A25	<i>Aspergillus</i> niger	3.4x10 ⁹	0.24	0.29
C11B25	<i>Aspergillus</i> sp	8.8x10 ¹⁰	0.16	0.31
C28B25	<i>Aspergillus</i> sp	8.8x10 ⁹	0.19	0.31
C17B25	<i>Aspergillus</i> sp	1.5x10 ¹¹	0.23	0.26

. Cultivos en medio sólido en cajas Petri o en columnas

Para discriminar entre las 8 cepas y decidir por el microorganismo a utilizar en los procesos de FS de la pulpa de café, fué necesario considerar otras características que debían reunir para las FS, como son:

- esporulación importante (le), para producir inóculos abundantes
- crecimiento apical elevado, para invadir la superficie del sustrato
- tiempo de germinación corto, para disminuir la contaminación
- crecimiento a pH bajos, para prevenir posibles contaminaciones
- degradación total de la cafeína en las condiciones de FS

En las tablas VI e VII se presentan los resultados obtenidos:

Tabla VII: Caracterización fisiológica de las cepas preseleccionadas (Tiempo de germinación de las esporas, pH inicial de los cultivos, % degradación de la cafeína)

Cepa	% Germinación (hrs)		pH inicial			% Degradación
	25°C	35°C	2.0	3.0	4.8	
V26A25	12:00	12:30	-	+	+	98
V33A25	11:30	12:30	-	+	+	90
V12A25	10:30	8:00	-	+	+	100
C23B25	11:30	9:00	Nd	Nd	Nd	92
C16A25	11:00	9:00	Nd	Nd	Nd	99
C11B25	11:00	9:00	Nd	Nd	Nd	15
C28B25	11:15	9:00	Nd	Nd	Nd	98
C17B25	11:15	9:00	Nd	Nd	Nd	100
(-) No creció ; (+) Creció ; (Nd) No se Determinó						

Los índices de esporulación (le) son muy altos y casi del mismo orden de magnitud para todas las cepas. Se obtienen en promedio 10,000,000,000 de esporas de *Penicillium roqueforti* por gramo de sustrato inicial. El crecimiento apical es diferente en cada microorganismo a 25 o a 35°C. Los *Penicillium* crecen mejor a bajas temperaturas, al contrario los *Aspergillus* prefieren temperaturas mas elevadas (35°C). Si se considera el tiempo de germinación se observa un fenómeno semejante. Todas las cepas crecen sobre medios de cultivo muy ácidos, toleran concentraciones altas en cafeína y la degradan completamente despues de 4 días de cultivo en medio liquido agitado (Tabla VII).

A partir de estos resultados y tomando en consideración trabajos previos con una cepa de *Penicillium* para la degradación de la cafeína (Kurtzman y Schwimmer, 1971; Schwimmer y col. 1971, Schwimmer y Kurtzman, 1972), se decidió por una cepa de *P. roqueforti* para la detoxificación de la pulpa de café por FS.

DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE POR FERMENTACION SOLIDA

Las técnicas de FS con hongos filamentosos se utilizan en el Oriente lejano desde hace varios siglos para la preparación de alimentos tales como Miso, Shoyu, tempeh, Ragl (Raimbault, 1980). En México se desarrollan investigaciones desde hace varios años en la UAM-I en el marco de la cooperación internacional con la ORSTOM (Francia) sobre el uso y las aplicaciones de FS para el aprovechamiento de diferentes subproductos agrícolas tropicales: yuca, bagazo de caña y pulpa de café entre otros.

El método de FS esta basado en el acondicionamiento de la pulpa de café, uniformemente inoculada por una suspensión de esporas de *P. roqueforti*, a fin de llevar el medio de cultivo sólido a una humedad inicial de 72%. Con este proposito se utilizaron fermentadores de tipo columna empacada (Raimbault y Alazard, 1980) y se estudiaron las condiciones óptimas de fermentación a nivel laboratorio (influencia de la fuente de nitrógeno, de la temperatura, de la humedad, de la aireación, del pH y del tamaño del inóculo sobre la evolución del crecimiento). Para la producción a nivel planta piloto de lotes de 15 Kg (b.s.) de pulpa de café fermentada para las pruebas de evaluación nutricional se utilizó un fermentador vertical estático (Zymotis) descrito antes por Roussos (1985).

1. Fisiología de crecimiento y degradación de la cafeína en FS

La composición de los cinco medios de cultivo (A-E) que se utilizaron para ver el efecto de la adición de nitrógeno mineral sobre el crecimiento y la degradación de la cafeína de la pulpa de café se presenta en la tabla VIII. A un Kg de pulpa de café se añade 1 litro de cada medio. La mezcla se esterilizó a 110°C por una hora y se inoculó de manera homogénea con dos litros de una suspensión conteniendo 1×10^{10} esporas de *P.roqueforti*. El sustrato inoculado se empacó en los fermentadores de laboratorio (20 g) y la fermentación se llevó a cabo controlando los siguientes parámetros: aireación y temperatura para cada fermentador.

Tabla VIII : Detoxificación de la pulpa de café con *P.roqueforti* por FS: Efecto de la adición de Nitrógeno mineral.

Composición			Resultados al final del cultivo		
Medio	Urea g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄ g/l	pH	Humedad %	Cafeína %
A	3.50	7.50	7.80	73.4	100
B	1.75	3.75	8.10	78.0	100
C	0.00	3.75	5.26	76.6	100
D	1.75	0.00	8.54	74.7	100
E	0.00	0.00	8.21	75.6	0

Después de 48 horas de fermentación *P.roqueforti* creció abundantemente, sobre todo en los medios A, B, C y menos en los medios D y E. En el medio E en que no se agregó una fuente de nitrógeno mineral, se observó una degradación de 100% de la cafeína de la pulpa (tabla VIII). Es decir que para *P.roqueforti*, la presencia de nitrógeno mineral en los demás medios de cultivo inhibe la degradación de la cafeína de la pulpa. Los valores de pH aumentaron hasta alcanzar valores de 8 después de 48 h de

fermentación, tal vez debido a que la cafeína se transforma en urea antes de ser metabolizada.

Esta observación importante sobre la regulación de la degradación de la cafeína de la pulpa de café por *P.roqueforti* es la primera vez que se pone en evidencia de una manera clara. Anteriormente varios investigadores utilizaron *A.niger* para el enriquecimiento proteico de la pulpa de café adicionando nitrógeno mineral al sustrato obteniendo rendimientos satisfactorios en proteína sin obtener una degradación completa de la cafeína (Peñaloza,1981; Peñaloza y all.1985; Gusman A.E.,1983; Aguilar M.D.1983; de Leon R.1988).

2. Decafeinización de la pulpa de café a nivel laboratorio

Considerando las observaciones anteriormente descritas se optimizaron las principales factores que afectan el crecimiento de *P.roqueforti* y la decafeinización de la pulpa de café por FS. En la fig.3 se presentan las cinéticas de degradación de la cafeína, de la evolución del pH y de la humedad durante la FS en reactores de tipo columna.

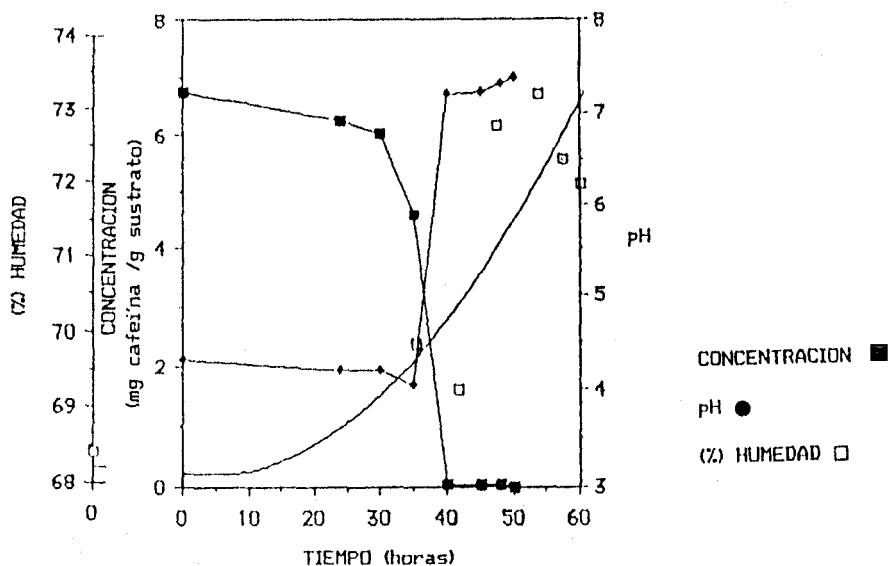


Figura 3 : Cinéticas de degradación de la cafeína, de la evolución del pH y de la humedad durante la FS de la pulpa de café en fermentadores de laboratorio del tipo columna.

Para el crecimiento de *P.roqueforti* sobre pulpa de café se requiere una humedad mínima inicial de 70%. Las esporas germinan después de 11 horas de incubación a 25°C. La inoculación homogénea y abundante permitió obtener un crecimiento rápido del micelio y una colonización en la superficie del sustrato. Después de 30 h de fermentación empieza a disminuir la concentración de la cafeína y desaparece rápidamente a las 40 h de incubación. Los valores del pH siguen bajos las primeras 30 h. Después aumentan rápidamente para alcanzar valores alcalinos (Fig.3). Este fenómeno está directamente relacionado con la degradación de la cafeína en urea antes de ser utilizada por *P.roqueforti* (Aquihuatl y col.1988).

3. Decafeinización de la pulpa de café a nivel Planta Piloto

Los resultados obtenidos en el laboratorio fueron confirmados por los estudios realizados a nivel planta piloto, utilizando un nuevo fermentador estático de tipo zymotis (Prebois y col. 1985) con una escala de extrapolación de 1/1,000 según la técnica anteriormente descrita. Los resultados obtenidos para 20 Kg de pulpa de café inoculada con *P.roqueforti* y fermentada en el Zymotis se presentan en la tabla IX.

Tabla IX : Detoxificación de la pulpa de café con *P.roqueforti* por FS a nivel Planta Piloto con 20 Kg de pulpa en Zymotis.

Tiempo Hrs	pH	Humedad %	% Degradación Cafeína
0	4.44	69.1	0
12	4.41	68.5	0
27	4.58	70.5	13
35	4.51	69.7	22
48	4.51	69.7	73

El microorganismo se desarrolló rápidamente sobre el sustrato. La degradación de la cafeína se inició a partir de las 20 horas y después de 48 de FS se removió el 73% de la cafeína de la pulpa. Hay que mencionar que la cuantificación de la cafeína se realizó en HPLC para todas las muestras, de esta forma se pudo seguir la desaparición de la cafeína con mucha precisión y fácil manejo.

Se fermentaron de esta manera varios lotes de pulpa de café para la evaluación nutricional de este producto. Los primeros resultados sobre la utilización como aditivo de la pulpa de café fermentada reportados por Tapia y col.(1989) demuestran un cierto efecto positivo a partir de una concentración de 1.5% en la dosis diaria por animal.

CONCLUSIONES

En México la producción de café se localiza en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla, principalmente. Siamo el quinto país productor de café a nivel mundial con una producción de 304,158 toneladas por ciclo anual. En la industrialización de café, también llamada beneficiado, la pulpa (mesocarpio) representa el principal desperdicio; tan solo para el periodo 1986-1987 se produjeron en México alrededor de 152,079 toneladas de pulpa (p.s.).

La pulpa de café representa un desecho agroindustrial muy abundante y de bajo valor nutricional debido a la presencia de sustancias tóxicas como la cafeína y los polifenoles. Se puede mejorar su valor nutritivo a través de una fermentación sólida(FS) con hongos filamentosos capaces de detoxificar la pulpa de café utilizando la cafeína como fuente de nitrógeno y los polifenoles como fuente de carbono para su crecimiento.

El aislamiento y purificación de los hongos filamentosos resultó ser muy práctica ya que permitió seguir una secuencia lógica del aislamiento y posteriormente de la purificación, de manera que la selección de las cepas siguió el mismo orden.

Los criterios de selección de las cepas fueron muy importantes ya que de estos dependió si la(s) seleccionadas cumplieran con las características de metabolizar la cafeína, alto índice de esporulación y rendimientos de crecimiento elevados sobre pulpa de café.

El crecimiento de los aislados en un medio con extracto de café, confirma la posibilidad de desarrollo de las cepas sobre pulpa de café, además de que se observa un decremento en la concentración de la cafeína inicial presente en esta. La metodología para el análisis de la cafeína, con la utilización de equipo como es la Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) ha sido muy sencilla y rápida, además de confiable y específica.

Los generos encontrados como degradadores de cafeína son también citados por la literatura (*Penicillium*, *Aspergillus*) y consolidan nuestros resultados.

Los resultados de FS de la pulpa de café, obtenidos en el laboratorio, se reprodujeron satisfactoriamente en la planta piloto. A este nivel la desaparición de la cafeína no fue total, indicando que faltan todavía trabajos para optimizar las condiciones de operación.

Trabajos mas recientes realizados en este laboratorio reportan que una misma cepa de *Aspergillus* sp. degrada la cafeína de la pulpa bajo ciertas condiciones y la misma cepa produce concentraciones muy altas de enzimas pectinolíticas. Seria pues interesante probar esta cepa para detoxificar la pulpa y producir las pectinasas durante el mismo proceso.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar M. D.P. 1983. Estudios sobre la utilización de carbohidratos, por *Aspergillus niger* en sistemas de fermentación sólida, usando pulpa de café como sustrato y diferentes niveles de fuente de nitrógeno. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 111 p.

Aguirre F. 1966. La utilización industrial del grano de café y de sus subproductos. Investigaciones tecnológicas del ICAITI No. 1. 1966, Guatemala, C.A.

Ainsworth G.C. 1973. Introduction and keys to the higher taxa. in: The Fungi. An Advanced Treatise. Volumen 4a. A Taxonomic Review Keys. Academic Press, Nueva York

Aquilahuatl M.A., Raimbault M., Roussos S. & Trejo M.R. 1987. Aislamiento, purificación y fisiología de cepas de hongos filamentosos que crecen en extracto de café para detoxificar la pulpa

de café por fermentación sólida. XVIII Congreso Nacional de Microbiología. Acapulco, Gro. (Abril 1987). México

Aquilahuatl M.A., Raimbault M., Roussos S. & Trejo M.R. 1988. Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: isolation, identification and physiological studies. in Raimbault M (Ed), Proceeding of seminar "Solid state fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials" ORSTOM-Montpellier 25-27 July 1988. pp.13-26

Bergmann F., Ungar-Waron H., Kwietny-Govrin H., Goldberg H. & Leon S. 1962. Some specific reactions of the purine-oxdizing system of *Pseudomonas aeruginosa*. Bioch. Biophys. Acta, 155:512-522.

Black R.L.B. & Dix N.J. 1976. Utilization of ferulic acid by microfungi, from litter and soil. Trans. Br. Mycol. Soc., 66 (2):313-317.

Bressani R., Estrada E. & Jarquin R. 1972. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química de aminoácidos. Turrialba, 122:299-304

Bressani R., Estrada E., Elias L.G., Jarquin R., & de Valle L.U. 1973. Pulpa y pergamino de café. IV. Efecto de la pulpa de café deshidratada en las dietas de ratas y pollos. Turrialba, 123: 403-409

Bressani R. 1974. Composición química de los subproductos de café. In Informe final C.R. IICA p.13. Reunión internacional sobre la utilización de los subproductos agrícolas e industriales. Turrialba. 11-14 Junio 1974. Costa Rica.

Bressani R. & Elias L.G. 1976. Utilización de desechos de café en alimentación de animales y materia prima industrial. EXPICA 78, El Salvador 3-8 Mayo 1976, documento INCAP, Guatemala, 25 p.

Bressani R., 1979. Factores antifisiológicos de la pulpa de café. In: Braham J. E. & Bressani R. (Eds.) Pulpa de café; composición, Tecnología y Utilización. Ottawa, Canada, International Development Research Centre, p. 143-152.

De León R., 1988. Brief description of solid state fermentation processes at ICAITI. in Raimbault M. (Ed), Proceeding of seminar "Solid state fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials" ORSTOM-Montpellier 25-27 July 1988 (France). p.139-143

Guzmán A.E. 1983. Efectos de nivel y naturaleza de fuentes de nitrógeno sobre el mejoramiento de la calidad químico nutricional de

la pulpa de café por fermentación sólida usando *Aspergillus niger*. Tesis. Universidad San Carlos de Guatemala, 85 p.

Guzmán G. & Martínez D. 1985. Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. Ciencia y Desarrollo, 65:41-48

Itoh M., Takahashi S., Iritani M. & Kaneko Y. 1980. Degradation of three isomers of cresol and monohydroxybenzoate by Euromycetes. Agric. Biol. Chem. 44 (5): 1037-1042.

Jaffe, W. & Ortiz D.S. 1952. Notas sobre el valor alimenticio de la pulpa de café. Agro. (Venezuela), 23: 31-37,

Kurtzmann R.H. & Schwimmer S. 1971. Caffeine removal from growth media by microorganisms. Experientia, 127(4):481-482

Martínez-Carrera D. 1989. Producción de hongos comestibles sobre pulpa de café a nivel comercial. In Roussos y col. (Eds) Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café. Xalapa 12-15 Abril 1989, México. pp 177-184

Mishustin E.N. & Erofeev N.S. 1966. Nature of the toxic compounds accumulating during the decomposition of straw in soil. Microbiol. 35 (1): 126-129.

Molina M.R., de la Fuente M., Batten M.A. & Bressani R. 1974. Decaffeination: A Process to Detoxify Coffee Pulp. Agricult. and Food Chemist. 122(6):1055-1059

Peñaloza W. 1981. Fermentación sólida de la pulpa de café. Tesis Univ. San Carlos de Guatemala. 50 p.

Peñaloza W., Molina M.R., Gómez Brenes & Bressani R. 1985. Solid-State Fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. Appl. and Environ. Microbiol. 149 (2):388-393

Prébols J.P., Raimbault M. & Roussos, S. 1985. Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide. Brevet français No. 76.06.677.

Raimbault, M., 1980. Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse d'Etat. Univ. Paul SABATIER, Toulouse, 291 p.

Raimbault, M. Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. 9:199-209

Raimbault M. & Roussos S. 1985. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Brevet français No. 85.08555.

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

Rolz C., de León R., de Arriola M.C.. 1988. Solid substrate growth of white rot fungi on coffee pulp. Acta Biotechnol., 13:211-223

Roussos S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat Université de Provence. 193 p.

Roussos S. 1989. El papel del Microbiólogo en los procesos biotecnológicos. Interface 32:7-10

Schwimmer S., R. H. Kurtzman. and Heftmann E. 1971. Caffeine Metabolism by *Penicillium roqueforti*. Arch. Biochem. Biophys., 1147:109-113

Schwimmer S., R.H. Kurtzman. 1972. Fungal decaffeination of roast coffee infusions. J. Food Science. 137:921-923

Shoda, M., K. Maruta, S. Uda, 1980. Isolation and properties of phenol utilizing microorganisms with special reference to catechol 1,2-oxygenase. Agric.Biol.Chem. 44(8):1841-1846

Takahashi, S., M. Itoh, K. Tsubaki, Y. Kaneko. 1981. Taxonomical Identification of phenol and o-cresol assimilating fungus *Aurebasidium pullulans* and its growth characteristics in phenol medium with methanol or formaldehyde. Agric.Biol.Chem., 45(8):1809-1815

Tapia I.M., Herrera-Saldana R., Viniegra G.G., Gutierrez M. & Roussos S. 1989. Pulpa de café fermentada: su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes. In Roussos y col. (Eds) Memorias I Sem.Intern. Biotecnol.AgroIndust.Café. Xalapa 12-15 Abril 1989, México. pp 153-175

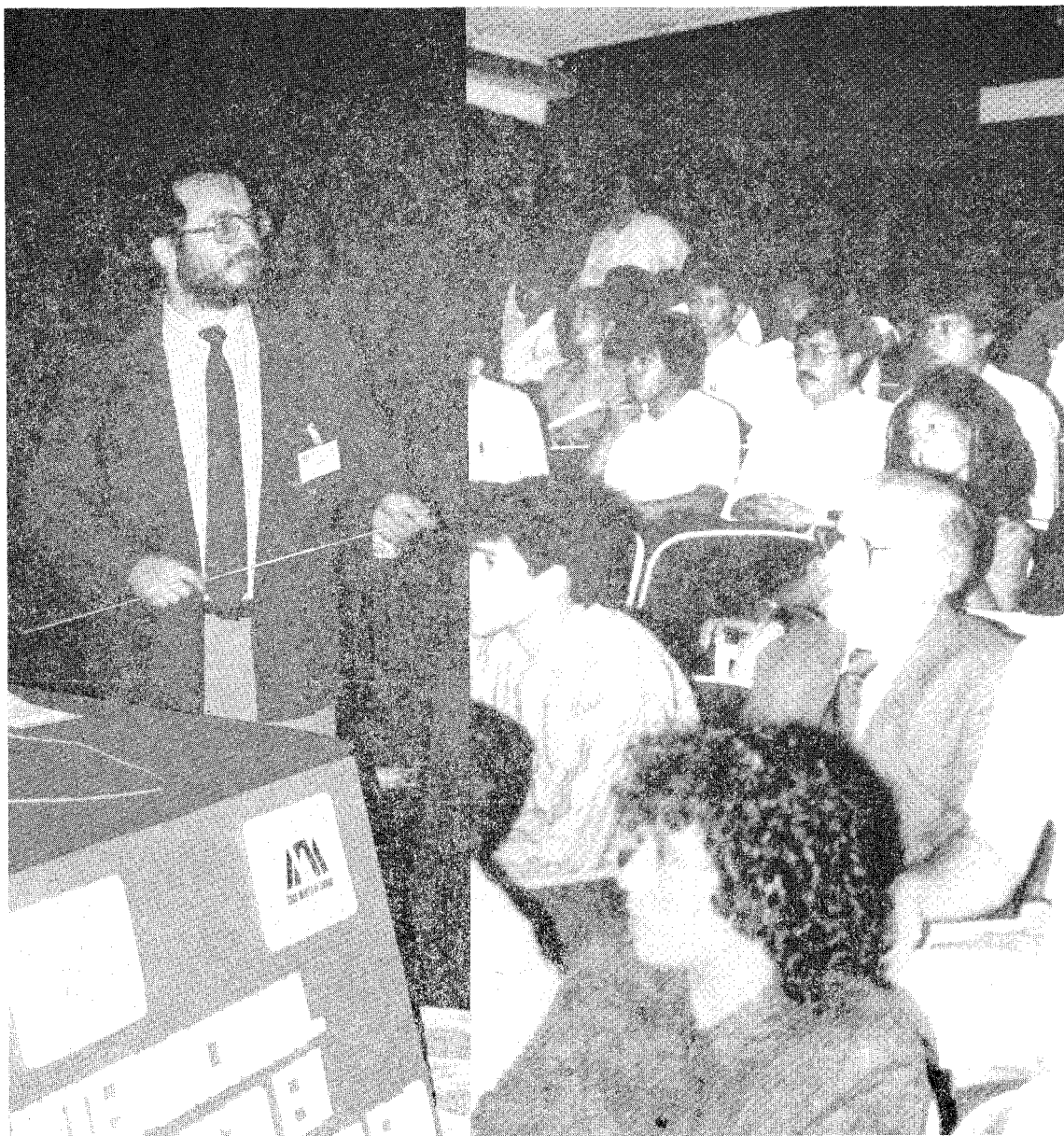
Tauk, S.M. 1986. Estudo decomposição da polpa de café a 45°C através do uso de microrganismos isolados da polpa. Turrialba, 136 (3): 271-280

Woolfolk C.A. 1975. Metabolism of N-Methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. J.Bacteriol. 123 (1):1088-1106

Zuluaga V.J., Bonilla C., Quijano R.M. 1975. Contribucion al estudio y utilización de la pulpa de café. VII Col.Intern.Quim.Café, Hamburgo 9-14 Junio, 1975, ASIC, Ed.Paris, p. 233-242.

Zuluaga V.J. 1981. Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (*Coffea arabica* L.). Thèse Doct.Sciences, Univ.Neuchatel, Suisse, 93 p.

Zuluaga V.J. 1989. Utilización Integral de los subproductos del café. In Roussos y col. Eds. Memorias I Sem.Intern. Biotecnol. AgroIndust.Café. Xalapa 12-15 Abril 1989 . México. pp 63-76



El Dr. Sevastian Roussos en la presentación del Trabajo:
Detoxificación de la pulpa del café



I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera

Compiladores
S. Roussos
R. Licona Franco
M. Gutiérrez Rojas

Xalapa, Ver., México, del 12 al 15 de abril de 1989