

99 2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETOXIFICACION DE LA PULPA DE
CAFE POR FERMENTACION SOLIDA**

FALLA DE CREAM



EXAMEN INTERMEDIOS
FAC. DE QUIMICA

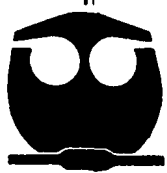
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

MA. GRACIELA NAVA SALINAS



**FACULTAD DE
QUIMICA**

MEXICO, D.F.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	Pag.
RESUMEN -----	8
CAPITULO I.	
1.1. El café en el mundo -----	9
1.2. El café en México -----	9
1.3. La Toxicidad de la pulpa de café -----	10
1.4. Presentación del plan de tesis -----	10
CAPITULO II.	
ANALISIS BIBLIOGRAFICO	
2.1. La industrialización del café -----	11
2.1.1. El cultivo	
2.1.2. La cosecha	
2.1.3. El procesamiento	
2.2. La pulpa de café -----	13
2.2.1. Composición química	
2.3. Aplicaciones biotecnológicas de la pulpa de café -----	14
2.3.1. Producción de enzimas	
2.3.2. Producción de biogas	
2.3.3. Medios de cultivo para microorganismos	
2.3.4. Recuperación de cafeína	
2.3.5. Alimentación animal	
2.4. Factores antifisiológicos de la pulpa de café -----	16
2.4.1. Cafeína.	
2.4.2. Polifenoles	

2.5. Tratamientos para mejorar la pulpa de café - 18

2.5.1. Métodos Físicos

2.5.2. Métodos Químicos

2.5.3. Métodos Biológicos

2.6. Fermentación en medio sólido (FMS). ----- 22

2.6.1. Generalidades

2.6.2. Procesos de FMS.

2.6.3. Paramatros de la FMS.

CAPITULO III.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Fermentación en medio sólido ----- 26

3.1.1. Microorganismos

3.1.2. Mantenimiento de cepas

3.1.3. Preperación de inculo

3.1.4. Preparación de suspensión de esporas

3.1.5. Cuantificación de esporas y conc. de inculo

3.2. Medios y Condiciones de cultivo ----- 27

3.2.1. Medios de fermentación líquida

3.2.2. Medios de fermentación sólida

3.3. Métodos de Cultivo ----- 28

3.3.1. Descripción del equipo

3.4. Condiciones de ferementación sóloda ----- 29

3.5. Tratamiento de las muestras ----- 30

3.6. Analisis de las muestras ----- 31

3.6.1. Determinación de humedad

3.6.2. Determinación de pH

3.6.3. Determinación de cafeína por HPLC.

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Selección de las cepas -----	32
4.2. Cinética de la degradación de cafeína por FMS- 33	
4.2.1. Degradación de la cafeína por <u>P. roquefortii</u> . en FMS	
4.2.2. Degradación de la cafeína por <u>A. niger</u> . en FMS	
4.3. FMS de la pulpa de cafe adicionandole al medio de cultivo nitrógeno mineral -----	38
4.3.1. Degradación de cafeína en pulpa de café con nitrógeno mineral por <u>P. roquefortii</u> .	
4.3.2. Degradación de cafeína en pulpa de café con nitrógeno mineral por <u>A. niger</u> .	
4.4. Comparación de crecimiento -----	43
4.4.1. <u>P. roquefortii</u> . y <u>A. niger</u> . sin fuente de nitrógeno mineral.	
4.5. Condiciones únicas de la decafeinización de la pulpa de café por FMS -----	45

CAPITULO V

CONCLUSIONES-----	46
-------------------	----

CAPITULO VI.

BIBLIOGRAFIA-----	47
-------------------	----

DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE POR FERMENTACION SOLIDA

RESUMEN

La industria agro-alimentaria es una de las industrias que generan gran cantidad de desechos, generalmente orgánicos, que pueden ser utilizados para la alimentación animal como fuente de proteínas y fibras. La pulpa de café constituye un desecho agro-industrial muy abundante, es rica en proteína y fibra, sin embargo, posee un bajo valor nutricional debido a la presencia de sustancias tóxicas como son la cafeína, los taninos y los fenoles libres.

Existen cepas de hongos filamentosos capaces de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno para su crecimiento, por lo cual, al emplear dichas cepas en una fermentación en medio sólido (FMS) se puede eliminar la cafeína presente en la pulpa de café y así mejorar su calidad nutricional.

El proceso de FMS se desarrolló utilizando dos cepas de hongos filamentosos: La cepa V33A25 identificada como *Penicillium roquefortii* y la cepa CH4 identificada como *Aspergillus niger*. La pulpa de café seca molida y tamizada (malla 35/45), se empleó como sustrato, adicionándole para fines de comparación, una solución mineral con nitrógeno, y otra solución mineral en donde el sustrato fue la única fuente de nitrógeno. Se esterilizó a 121°C por 15 min se inoculó con una suspensión de 2×10^7 esporas/g de sustrato peso seco (SPS) obteniéndose una humedad inicial del 70% y un pH de 4.3. El medio inoculado se colocó en columnas de FMS y se incubó a 25 y 35°C con una aireación de 4 l/h/columna.

Durante el proceso se realizó una cinética en donde se evaluaron la concentración de cafeína así como el pH y la humedad del producto fermentado. Se observó que al adicionar fuente de nitrógeno mineral al medio de cultivo, ésta es utilizada de preferencia por ambos microorganismos para su crecimiento. Por otra parte *Penicillium roquefortii* utiliza el 99.85% de cafeína cuando al medio de cultivo no se le adiciona fuente de nitrógeno mineral, mientras que *Aspergillus niger* no crece fácilmente en el medio por lo que su degradación de cafeína es nula. Además se observó que la evolución del pH en el medio de cultivo es un parámetro indirecto para seguir la disminución de cafeína durante el proceso de FMS.

En la FMS *Penicillium roquefortii* degrada la cafeína presente en la pulpa de café en casi un 100% siempre y cuando no se le adicione al medio de cultivo una fuente de nitrógeno mineral.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. EL CAFE EN EL MUNDO

En el ámbito mundial se reporta que en el ciclo de 1986-87 se obtuvo una producción mundial de 4 857 720 Ton de café (Tabla I).

1.2. EL CAFE EN MEXICO

A nivel nacional para el ciclo de 1986-87 México produjo 306,000 Ton de café (Tabla I)

TABLA I. PROMEDIO DE PRODUCCION MUNDIAL Y NACIONAL DE CAFE VERDE

Ciclo	Producción Mundial (Ton)	Producción Nacional (Ton)	% Que Representa México
1979-80	4 911 660	246 000	5.008
1980-81	5 180 640	246 000	4.748
1981-82	5 891 340	252 000	4.277
1982-83	4 966 680	273 000	5.508
1983-84	5 402 940	289 200	5.519
1984-85	5 421 420	264 600	4.880
1985-86	5 918 820	288 300	4.870
1986-87	4 857 720	306 000	6.299

El promedio total de la producción en México en el período de 1979-80 a 1986-87 fue del 5.14% (37).

En México, como en otros países de América Latina, uno de los principales desechos agroindustriales es la pulpa de café, la cual, en su mayor parte, se elimina de los beneficios arrojándola a los ríos. Esto constituye un contaminante importante en las regiones cafetaleras, considerando que en el período comprendido de 1986 a 1987 tan sólo en los cuatro principales estados productores de café Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla, se obtuvo una producción aproximadamente de 135,641 Ton de pulpa de café, lo que equivale al 90% del total nacional (26).

Uno de los usos que se le ha dado a la pulpa de café, ha sido como acondicionador y abono del suelo en la misma plantación de café, sin embargo, esta alternativa se lleva a cabo en pequeña escala (6).

1.3. LA TOXICIDAD DE LA PULPA DE CAFE

En nutrición animal se informa que uno de los primeros inconvenientes es la renuencia de los animales al consumo de este material, cuando es parte principal de la ración (10), además de observarse efectos adversos que se asocian a sustancias con posible actividad antifisiológica como son: cafeína, taninos y fenoles libres (8).

La fermentación en medio sólido (FMS), mediante el uso de microorganismos que presentan la capacidad de metabolizar los compuestos tóxicos presentes en la pulpa de café, representa una opción muy interesante en la reutilización de estos desechos, así como en la eliminación de su toxicidad.

Existen microorganismos que presentan habilidad para descomponer compuestos orgánicos complejos, algunos tóxicos y que tienen importancia práctica, ya que pueden ser utilizados como un método biológico de degradación.

La problemática actual de contaminación por desperdicios agro-industriales ha provocado el desarrollo de una gran cantidad de estudios sobre el aprovechamiento de éstos (37).

1.4. PRESENTACION DEL PLAN DE TESIS

De los compuestos tóxicos de la pulpa de café el que destaca por su toxicidad para la alimentación animal es la cafeína (8). Por ello esta investigación está dirigida a eliminar la cafeína presente en la pulpa de café por medio de un proceso biotecnológico empleando la FMS, como una alternativa en el mejoramiento de su calidad nutricional; utilizando cepas de hongos filamentosos previamente seleccionadas por su alta capacidad de degradar cafeína.

ANALISIS BIBLIOGRAFICO

2.1. INDUSTRIALIZACION DEL CAFE

A érica central y varias regiones del mundo como México, el café es uno de los principales productos agrícolas de exportación que contribuye de manera significativa en la economía nacional.

El proceso mediante el cual es industrializado el café se llama beneficio, y por medio de éste el café cereza es preparado para su conservación, torrefacción y almacenamiento (10).

2.1.1 CULTIVO

El cafeto requiere para su cultivo un terreno profundo, algo arenoso, clima caliente y húmedo con temperatura media de 23 a 30°C por lo que es un cultivo típicamente tropical; la siembra se realiza generalmente en los meses de enero a febrero (44).

2.1.2 COSECHA

La época de cosecha depende de la región, altitud y latitud; en América Central se cosecha desde finales de agosto hasta el mes de marzo, dependiendo esencialmente de la altitud sobre el nivel del mar, de la plantación del café.

El café de tierra cálida madura más temprano que el de tierra fría; los frutos se cosechan al llegar a su madurez.

La cosecha se efectúa mediante dos métodos.

1.- Cosecha selectiva: en donde el recolector dispone de dos recipientes, uno de ellos recibe la "cereza" madura y sana y el segundo los frutos que deben ser eliminados.

2.- Cosecha homogénea: en donde todos los frutos maduros, verdes o secos son recogidos y llevados conjuntamente al beneficio (43).

2.1.3 PROCESAMIENTO DEL CAFE

El tratamiento del café involucra diferentes operaciones que tienen como objetivo liberar el grano de café de los diferentes tejidos que lo recubren: pulpa de café, mucilago y cascarrilla, este proceso llamado "beneficio" puede ser realizado mediante dos vías, húmeda o seca (13).

a) Vía Húmeda

Es utilizada principalmente en México, América Central, Colombia y Kenia. Los granos son llevados a los beneficios y sumergidos en tanques con agua, con el doble propósito de remover los granos dañados y eliminar las materias extrañas; la vía húmeda comprende las etapas siguientes:

El despulpado: En esta etapa se separan la cáscara y la pulpa de café desprendiéndola de los granos por medio de máquinas despulpadoras de disco o cilindro que operan con agua para facilitar el desprendimiento de la pulpa del grano y arrojar ésta por un conducto hacia otro lugar.

La remoción del mucilago: Una vez separados los granos de la pulpa son transportados por agua a tanques de fermentación en donde se lleva a cabo una fermentación natural, no controlada, con el fin de remover el mucilago (capa delgada altamente viscosa que se adhiere fuertemente al grano y es rica en pectina además de muy higroscópica lo que constituye un obstáculo para el secado del grano) (7).

El lavado: Una vez realizada la fermentación los granos son lavados intensamente con grandes cantidades de agua para eliminar los restos del mucilago y los productos de fermentación, este lavado se lleva a cabo en lavadoras a contracorriente.

El secado: Después del lavado, los granos contienen de 50 a 60 % de humedad, por lo que son colocados en tolvas metálicas o en montículos en las partes más bajas de los patios para que se escurran y se elimine al aire el exceso de agua; posteriormente se colocan en secadores rotatorios logrando en el grano un contenido de 11 a 12% de humedad.

b) Vía Seca

Es utilizada principalmente en Brasil y África Occidental; comprende las siguientes etapas:

El secado: Una vez realizada la cosecha, las cerezas son lavadas y extendidas en los patios de los plantíos para su secado al aire libre y al sol durante 2 a 3 semanas removiéndolas constantemente. El secado también puede realizarse en máquinas secadoras rotatorias; en este caso, la operación no necesita más de 2 a 3 días.

El descascarillado o trillado: Se lleva a cabo en máquinas matoradoras que desprenden la pulpa y cascarrilla juntas para obtener el llamado café verde o café oro.

Pulido, tostado y granulado: En ambos procesos, la operación siguiente es el pulido del café oro, que tiene como fin mejorar la presentación del café de exportación; consiste en dar brillo al grano, se procede a la torrefacción en donde se tuesta el grano para conferirle al café sus cualidades aromáticas y gusto placentero; finalmente el café tostado es molido hasta el grado deseado y es empaquetado para su distribución (1,7).

2.2 LA PULPA DE CAFE

La pulpa de café es el principal subproducto de la industria cafetalera; se origina en el proceso de la vía húmeda, en el paso del despulpado, éste subproducto representa aproximadamente 29% en b.s. del fruto del café (1).

2.2.1 COMPOSICION QUIMICA

En la tabla II, se reportan los valores representativos de los componentes de la pulpa de café, en la cual destaca el alto contenido de agua 79.4%, que representa una de las principales desventajas para su manejo y utilización (17).

Tabla II: COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE (%)

	Fresca	Deshidratada	Fermentada naturalmente y deshidratada.
Humedad	78.7	12.6	7.9
Materia seca	23.0	87.4	92.1
Extracto estereo.	0.4	2.5	2.6
Fibra cruda	3.4	21.0	20.8
Proteínas N x 6.25	2.1	11.2	10.7
Cenizas	1.6	6.3	6.8
Extracto libre de nitrógeno	15.8	44.4	49.2

La materia seca contiene 11.2% de proteína cruda, se reporta que la proteína de la pulpa de café aunque deficiente en aminoácidos azufrados, presenta una composición similar a las proteínas de la harina de soya y a la harina de algodón (tabla III). Particularmente el alto contenido de lisina puede ser de interés en comparación con la proteína de maíz.

TABLA III. CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LA PROTEINA DE LA PULPA DE CAFE. (g/10g N)

Aminoácido	pulpa de café	Maíz	Harina de soya	Harina de semilla de algodón
Lisina	6.8	1.7	6.3	4.3
Histidina	3.9	2.8	2.4	2.8
Arginina	4.8	3.1	7.2	11.2
Treonina	4.8	3.3	3.9	3.5
Cistina	1.0	1.0	1.6	1.8
Metionina	1.3	1.6	1.3	1.4
Valina	7.4	5.0	5.2	4.9
Isoleucina	4.2	4.3	5.4	3.8
Leucina	7.7	16.7	7.7	5.9
Tirosina	3.6	5.0	3.2	2.7
Fenilalanina	4.9	5.7	4.9	5.2
Hidroxiprolina	0.5	-	-	-
Ac. Aspartico	8.7	-	-	-
Serina	6.3	-	-	-
Ac. Glutámico	10.8	-	-	-
Prolina	6.1	-	-	-
Glicina	6.7	-	-	-
Alanina	5.4	-	-	-

Bressani y col. Turrialba 22:299, 1972.

Sin embargo el nitrógeno no proteico que incluye cafeína, niacina, nitrógeno inorgánico, representa el 40% de la proteína cruda. Por consiguiente la menor concentración de aminoácidos puede deberse a que solamente alrededor del 60% del nitrógeno proviene de la proteína (9, 14).

2.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA PULPA DE CAFE

Algunas alternativas reportadas para la utilización de la pulpa de café son:

2.3.1. PRODUCCION DE ENZIMAS

La pulpa de café contiene aproximadamente un 75% en b.s. de carbohidratos, un 17.7% b.s. de celulosa, un 10% de pectina además de un 2.3% en b.s. de hemicelulosa (17), por lo que puede ser utilizada como sustrato en la producción de enzimas inducibles como son las pectinasas y celulasas (37).

2.3.2. PRODUCCION DE BIOGAS

Por fermentación anaerobia de la pulpa de café, puede producirse gas biológico usándose el residuo de la fermentación como fertilizante orgánico. Se reporta que 30 Kg de pulpa mezclada con estiércol de vaca, producen 670 l de metano en 72 días (11).

2.3.3. MEDIOS DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS

Cuando se somete la pulpa de café a un prensado, se obtiene un jugo que posee un alto porcentaje de azúcares, el cual, ha sido empleado en fermentaciones con *Torulopsis* y *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose etanol (35).

2.3.4. RECUPERACION DE CAFEINA

Los estudios de Molina y col (32) demuestran la factibilidad de extracción y recuperación de la cafeína, alcaloide de alto precio en el mercado, el cual tiene varias aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica. La extracción de la cafeína de la pulpa de café se efectúa por percolaciones sucesivas con agua, que remueve el 99% de la cafeína. La aplicación de este proceso en la industria está limitado por el costo de energía y el gran volumen de agua requerido (14, 32). Además de que en la actualidad, con los procesos de cafés solubles descafeinizados, se obtiene también cafeína.

2.3.5. ALIMENTACION ANIMAL

En nutrición animal se han efectuado varios experimentos que tienden a la incorporación de la pulpa de café en raciones para diferentes tipos de animales como: peces, pollos, rumiantes, cerdos y otros. Se informa que uno de los principales inconvenientes es el rechazo de los animales al consumo de la pulpa cuando ésta es parte principal de la ración; debido posiblemente a la baja palatalización así como a factores adversos en la digestión y metabolismo en los animales.

Una de las especies en las que se ha estudiado el desarrollo logrado en base a una ración con 30% de pulpa de café es el pez *Tilapia aurea*; en este pez se encontró un aumento ponderal, sin observarse toxicidad alguna, haciendo notar que la pulpa de café fue totalmente digerida (5).

Sin embargo en cuanto a bovinos alimentados a base de pulpa, se ha reportado que raciones que contienen más del 20% de ésta, se caracterizan por rendimientos bajos. Además de que los animales presentaron síntomas como: timpanismo, inflamación de las extremidades, aparición de llagas y úlceras en la piel.

Como posibles sustancias responsables de estos efectos se señala a la cafeína y los taninos; por lo que se recomiendan niveles máximos del 20% de pulpa de café en remplazo de otros nutrientes para la alimentación de bovinos (10).

El alto contenido de fibra condiciona el uso de la pulpa en la alimentación de cerdos (28); se observó en éstos una relación inversa entre ganancia de peso, conversión alimenticia y consumo de alimento con respecto al nivel de la pulpa de café en la formulación; con 24% de pulpa, los animales presentan dermatitis entre las piernas y la parte ventral así como aumento en el contenido de glucosa y ácidos grasos libres en el suero sanguíneo, siendo estos efectos atribuidos a la cafeína. Mientras que en cerdos alimentados con una ración que contiene un 16% de pulpa en remplazo de maíz-soya no se observan efectos adversos (28).

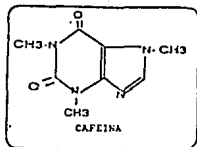
Con respecto a pollos se demostró que la cafeína incorporada en niveles de 0.05 a 0.1% en raciones para gallinas ponedoras y gallos tiene un efecto nocivo sobre la función de reproducción (5).

2.4. FACTORES ANTIFISIOLÓGICOS DE LA PULPA DE CAFÉ

Los principales factores considerados como antifisiológicos en la pulpa de café son la cafeína y los polifenoles.

2.4.1. CAFEÍNA

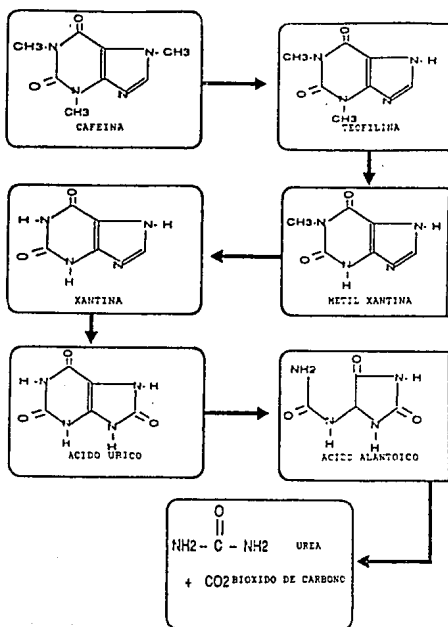
Se encuentra presente en la pulpa de café en concentraciones que varían de 0.6 a 1.3% b.s. es el componente tóxico más importante de la pulpa de café. Es una purina metilada estructuralmente conocida como 1,3,7 Trimetilxantina ($C_8H_{10}N_4O_2$) PM 194.20 g/mol (23) Su estructura se representa en la fig. 1



La cafeína actúa como estimulante del sistema nervioso central y del músculo cardíaco, estimula la secreción gástrica de ácido y eleva el nivel de glucosa y ácidos grasos libres en el plasma (23). Siendo también notoria la presencia de diuresis con una mayor excreción de nitrógeno y un aumento de la actividad física con un mayor gasto de energía en ratas y rumiantes alimentados con pulpa de café (8). Estos efectos son la principal causa de pérdida de peso por parte de los animales alimentados con pulpa de café.

El metabolismo de las metilxantinas, como la cafeína, en los microorganismos parece involucrar alguna oxidación directa a metilalantoinas (19) o una dimetilación seguida de una deshidrogenación a ácido úrico, el cual, es metabolizado a alantoinas, por lo que de ácido úrico pasa a ácido alantóico y finalmente a urea y bióxido de carbono (10,19).

Las reacciones bioquímicas involucradas y los posibles compuestos intermedios en la degradación de la cafeína se representan en la fig 2.



2.4.2. POLIFENOLES

Los polifenoles se dividen en:

Fenoles libres, siendo los principales el ácido caféico (0.28 a 2.56% b.s) y el ácido clorogénico (0.18 a 3.1% b.s)

Taninos: pueden ser hidrolizables y condensables se encuentran en la pulpa de café en concentraciones que varían de 1.8 a 8.5% b.s. (14, 17).

El papel de éstos no está todavía bien definido, aunque existe una posible acción de los fenoles libres en la interferencia con la digestibilidad de la proteína, probablemente debido a reacciones de éstos con aminoácidos y los grupos libres de las proteínas, disminuyendo su utilización (8).

2.5 TRATAMIENTOS PARA MEJORAR LA PULPA DE CAFE

Los métodos investigados para mejorar las características y las posibilidades para la utilización de la pulpa de café en nutrición animal pueden agruparse en: Físicos Químicos y Biológicos.

2.5.1. METODOS FISICOS

El secado de la pulpa puede ser necesario para reducir los costos de transporte, siendo aún el sistema más común el secado al sol; éste en condiciones normales no afecta el valor nutritivo de la pulpa (14). La percolación de la pulpa para la extracción de café aumenta en un 100% la ganancia en peso de las ratas así como la eficiencia del alimento; sin embargo, los resultados son menores a los del grupo control (14,32).

2.5.2. METODOS QUIMICOS

Se informa sobre investigaciones en las que se usó hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y bisulfito de sodio para el tratamiento de la pulpa intentando disminuir la actividad antinutricional de la pulpa de café sin obtener resultados positivos (14).

Los tratamientos físicos y químicos no han arrojado resultados satisfactorios, de ahí que los esfuerzos en los últimos años estén enfocados a utilizar tratamientos biológicos como alternativa para mejorar la pulpa de café (33).

2.5.3. METODOS BIOLÓGICOS

En estudios anteriores se han reportado microorganismos que presentan habilidad para descomponer compuestos orgánicos complejos como los lignocelulósicos, estos microorganismos fueron aislados del suelo, madera, frutos, etc. y utilizados en FMS de salvado de trigo y virutas de madera (33).

En relación a la degradación de cafeína y taninos por microorganismos, se ha reportado que *Fusarium oxysporum* aparentemente resiste la toxicidad y crece en bajas concentraciones de cafeína (45). Por otra parte *Pseudomonas aeruginosa* involucra en su metabolismo un sistema enzimático para la oxidación de metil purinas; parece tener xantina deshidrogenasa y uricasa, enzimas con alta especificidad para degradar metil-xantinas a metil-alantoinas (19,45).

Se han considerado los métodos biológicos como alternativas para la eliminación de la cafeína presente en la pulpa de café encontrando que cepas de *Bacillus coagulans*, *Penicillium roquefortii* y especies de *Stemphyllum*, presentan capacidad para degradar la cafeína utilizándola como única fuente de nitrógeno en presencia de sacarosa (39).

Por otra parte, en relación con los fenoles libres y los taninos se ha encontrado que pueden ser degradados por microorganismos presentes en la microflora del suelo, ya que utilizan los compuestos fenólicos como fuente de carbono. Entre los géneros más interesantes se reportan *Fusarium*, *Stemphyllum*, *Trichoderma*, *Trichosporum* y *Penicillium* entre otros. (31,40,27).

Penaloza realizó una investigación dirigida a la evaluación del posible mejoramiento del valor nutritivo de la pulpa de café mediante la FMS, para incrementar las posibilidades de aplicación en la alimentación de animales monogástricos; encontró que *A. niger* provoca un enriquecimiento proteico en la pulpa de café y que la FMS mejora la calidad nutritiva de ésta (29).

En el Departamento de Biotecnología de la UAM-I, se realizó un trabajo previo al presente, el cual consistió en la obtención de cepas con alta capacidad de metabolizar la cafeína. Dicho trabajo involucró las siguientes etapas:

- Aislamiento, purificación e identificación de las cepas que degradan la cafeína.

- Selección de la cepas en medio líquido.

La primera etapa consistió en la recolección, en cafetales, de muestras susceptibles de contener una microflora natural capaz de desarrollarse sobre la pulpa de café. Las muestras se tomaron de granos de café, de hojas, así como de la pulpa de café, de las regiones de Xalapa Ver. y de Soconusco Chis. El aislamiento de los microorganismos presentes se llevó a cabo en medios selectivos con diferente composición (Tabla IV).

TABLA IV. MEDIOS DE SELECCION DE CEPAS QUE DEGRADAN LA CAFEINA

MEDIOS (g/l)	A	B	C	D	E C/N = 10
EXTRACTO DE CAFE	40	40	--	--	--
EXTRACTO DE PULPA DE CAFE	--	--	40	--	--
SACAROSA	--	5	--	--	11.42
CAFEINA	--	--	--	2	2

LAS SALES MINERALES ADICIONADAS FUERON LAS SIGUIENTES PARA TODOS LOS MEDIOS

KH_2PO_4 :1.3 g/l

Na_2HPO_4 :0.12 g/l

MgSO_4 :0.30 g/l

CaCl_2 :0.30 g/l

Con agua de la llave a pH5.6 y esterilizado a 121°C por 15 min en autoclave

La purificación de los aislados obtenidos se realizó mediante 2 a 3 resiembras en forma sucesiva, en los mismos medios, siendo las condiciones de incubación de 2 a 5 días a 25 y 35°C. Para la conservación de las cepas, se sembraron en frascos inclinados con 5 ml de medio selectivo y se mantuvieron en refrigeración (2).

La selección de las cepas que degradan la cafeína en medio líquido se llevó a cabo en un medio que contenía 1.2 g/l de cafeína como única fuente de nitrógeno, además de sacarosa y una solución mineral, siendo las condiciones de incubación de 3 días a 25 y 35°C en baño maría con temperatura controlada y agitación de 200 rpm, en la figura 3 se muestra el esquema del tratamiento de los aislados (2).

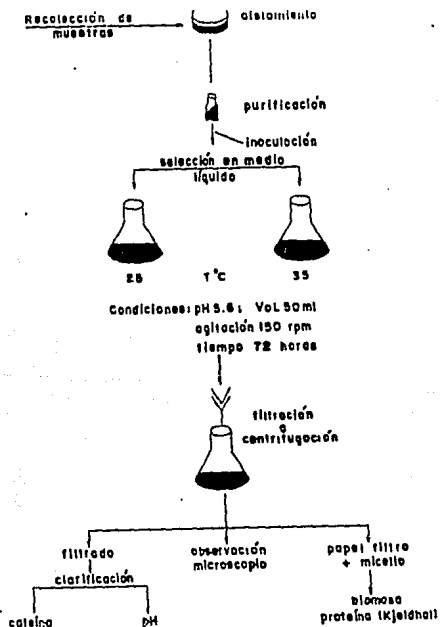


Fig. 3 Tratamiento de los aislados

El análisis bibliográfico y el trabajo experimental previo, han confirmado la posibilidad de encontrar las condiciones óptimas en las que cepas de hongos filamentosos con capacidad de degradar la cafeína, puedan eliminarla de la pulpa de café por medio de una FMS.

2.6. FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

2.6.1. GENERALIDADES

La fermentación en medio sólido (FMS) es aquella fermentación en la que el crecimiento microbiano y la formación de metabolitos ocurre sobre la superficie de un sustrato sólido. Difiere ampliamente de las fermentaciones líquidas, ya que no existe agua libre que se escurra y el agua requerida para el crecimiento de los microorganismos se encuentra absorbida en la matriz sólida del sustrato o del soporte (33).

La FMS ocurre espontáneamente en la naturaleza; la evidencia más común es el enmohecimiento del pan, frutas, vegetales y parte del biodeterioro de alimentos sólidos; por lo tanto, es un proceso natural cuyo origen está vinculado con el proceso más común que es el composteo o la descomposición de la materia orgánica en la naturaleza.

2.6.2. PROCESOS DE FERMENTACION SOLIDA

La literatura informa numerosos procesos de FMS desde los más simples, donde el material inoculado se envuelve en hojas de plátano para fermentar estáticamente, hasta complicados sistemas con agitación y ambiente gaseoso controlado (12,18,34,39); algunos de los equipos de FMS son:

1.- Fermentador de tambor rotatorio: Está constituido por un envase o recipiente en forma de tambor montado sobre un sistema de rodillos los cuales actúan como soporte y como aparatos de rotación; estos están usualmente equipados con entradas y salidas de aire.

La preparación del medio de cultivo sólido se efectúa mediante cocimiento del sustrato con vapor. La inoculación se realiza con una suspensión de esporas de hongos filamentosos y en seguida el sustrato inoculado se introduce a los fermentadores en donde se inicia la fermentación. Durante la fermentación los cultivos reciben una aireación controlada y se mantienen a temperatura constante. El crecimiento microbiano en fermentadores de este tipo es rápido y uniforme (33).

2.- Fermentadores de columna: Este tipo de fermentadores consiste en una columna de vidrio o plástico provista de dos entradas; una inferior y otra superior la primera permite la entrada de

aire, mientras la otra permite la salida de los gases efuentes de la fermentación, siendo la temperatura controlada en cuartos de incubación o por el paso de agua fría a través de una chaqueta o serpentín.

La humedad de la columna puede ser controlada mediante el uso de aire húmedo que proviene de un humidificador integrado a la columna, el cual entra a razón de 4 l/h/columna (42). Una unidad de fermentación consiste en 24 fermentadores de columna para nivel laboratorio (33).

2.6.3. PARAMETROS DE LA FERMENTACION SOLIDA

Los parámetros más importantes son: microorganismo, tamaño del inóculo, porcentaje de humedad, temperatura, forma y tamaño de partícula, agitación, aireación y pH.

- Microorganismo

En FMS, el relativamente bajo contenido de agua está calculado para favorecer únicamente el desarrollo de mohos. Dentro de los hongos filamentosos, los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus* se han usado extensamente por su capacidad de crecer en medios de cultivo caracterizados por una baja actividad de agua para la síntesis de amilasas y proteasas, en la producción de Koji, Tempeh y otros productos fermentados por FMS (*A. oryzae*, *A. soyae*, *R. oligosporus* y *R. oryzae*).

El *P. crustosum* utiliza eficientemente la cafeína como única fuente de nitrógeno (25), además puede consumir la mayoría de los componentes del jugo de pulpa de café (38), entre ellos el ácido clorogénico y la cafeína por lo cual puede ser de gran interés para la detoxificación de la pulpa de café.

- Tamaño de inóculo

La concentración del inóculo es también un factor importante; usualmente se requiere una alta concentración de esporas para la inoculación, tanto para asegurar una inoculación homogénea y un rápido crecimiento como para anular la competencia de otros microorganismos propios del sustrato. Raibault y Alazard (34) informaron que en fermentaciones con inóculos excesivos, muchas esporas no germinaban por lo que para cada proceso deberá determinarse el nivel óptimo de inoculación, el cual varía de 10^6 a 10^7 esporas/g de sustrato (34).

- Humedad

El contenido de agua del medio de cultivo se ajusta según los requerimientos de el o los microorganismos (12). Cuando el porcentaje de agua es muy bajo, los microorganismos no pueden crecer adecuadamente, al contrario cuando el porcentaje de agua es muy alto los espacios vacíos entre las partículas se llenan de agua, desalojando el aire y provocando disminución del oxígeno en la masa, lo cual favorece la contaminación bacteriana (36).

- Temperatura

El rango de temperatura comúnmente usado en FMS es de 20 a 45°C (45) y este rango depende del microorganismo utilizado. Se ha informado que las altas temperaturas inhiben la germinación de esporas, pero no afectan significativamente el desarrollo del micelio si no alcanzan valores extremos (34,36).

- Forma y tamaño de las partículas del sustrato

Durante el proceso de FMS el oxígeno es esencial, y para ello debe difundirse en las capas acuosas que rodean a las partículas sólidas o penetrar en los poros del sustrato. Por lo que el tamaño y la forma de las partículas determinan el grado de porosidad (33); se sugiere que la fracción porosa o los espacios libres deben llegar por lo menos al 30% del volumen total en la FMS (12).

- Aireación y agitación

El volumen de aireación del cultivo depende de la naturaleza del sustrato que se emplea, así como del requerimiento de oxígeno para la síntesis del producto (29). La transferencia de oxígeno entre las partículas depende de los espacios libres, la aireación y la agitación o mezclado, cuando los espacios vacíos son menores; sin embargo, estas operaciones son indispensables para eliminar el calor metabólico y el CO₂ producidos en el crecimiento y reabastecer con aire fresco los espacios libres (12).

- pH

Otro factor importante en los procesos de FMS es usar medios de cultivo con un pH ácido. Normalmente se trabaja en un rango de 3 a 4.5 por ser el más adecuado para el crecimiento de los

hongos filamentosos, además de limitar la contaminación bacteriana.

Al inicio de la fermentación y con el crecimiento exponencial del micelio se observa una rápida disminución del pH del medio de cultivo, dependiendo de las cantidades de urea y sales de amonio que intervengan en la fermentación. Se ha informado que la urea estimula el desarrollo fúngico cuando representa el 40 o 50% del nitrógeno total (34). Las sales de amoniaco permiten acidificar rápidamente el medio de cultivo y de esta manera se elimina la necesidad de controlar el pH (29).

MATERIALES Y METODOS

3.1. FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO (FMS)

3.1.1 MICROORGANISMOS

Se emplearon dos cepas de hongos filamentosos a fin de comparar resultados, éstas fueron: La cepa CH₄ identificada como *Aspergillus niger*, proporcionada por el Dr. Carlos Huitrón del Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biológicas de la UNAM (42); fué empleada como cepa control de crecimiento, ya que creció bien en la pulpa de café sin ser probada previamente en el medio selectivo

La cepa V₃₃A₂₅ identificada como *Penicillium roquefortii* proporcionada por el Depto. de Biotecnología de la UAM-1.; fué seleccionada de una serie de aislados de la flora natural presente en granos, flores, frutos y pulpa del café, de la región de Xico, Ver. (37). Esta cepa fué seleccionada por su alta capacidad para metabolizar la cafeína en un medio líquido, en donde la única fuente de nitrógeno fué la cafeína, así como por su alta esporulación. Fué el microorganismo aislado No.33 purificado y conservado en un medio A con extracto de café (40 g/l) a 25°C (2).

3.1.2. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Ambas cepas fueron conservadas en un medio de agar-extracto de café (40 g/l) y sales minerales (KH₂PO₄ 1.3g/l; Na₂HPO₄ 0.12g/l; MgSO₄ 0.30g; CaCl₂ 0.30g/l) con agua corriente pH 5.6 incubadas a 25°C y almacenadas a 4°C

3.1.3. PREPARACION DEL INOCULO

La suspensión de esporas para la inoculación se obtuvo en matraces de 250 ml con 17 g de masa sólida. El medio está constituido por 20g de harina de yuca, 1g de KH₂PO₄ 0.5g de urea; 2g de (NH₄)₂SO₄; 0.5g de CaCl₂; 7.5g de agar en 500 ml de agua a pH 5.6. El medio se esterilizó en autoclave, se inoculó con las esporas de un tubo inclinado del microorganismo, y se incubó por una semana a temperatura ambiente.

3.1.4. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS

Al matraz con desarrollo de esporas se le adicionaron 100 ml, de agua destilada y estéril y de 2 a 3 gotas de Tween 80; se agitó mecánicamente por 25 min y la suspensión obtenida se filtró a través de una gasa para eliminar el micelio. La concentración de esporas se estimó por cuenta microscópica directa, usando una cámara de Neubauer.

3.1.5 CUANTIFICACION DE ESPORAS Y CANTIDAD DE INOCULO

De la suspensión de esporas anterior, se hizo una dilución 1:25 con agua destilada, y se homogenizó perfectamente. Se procedió a llenar la cámara de Neubauer con esta suspensión usando una pipeta Pasteur; el conteo se realizó tomando 10 cuadros al azar y observando al microscopio con el objetivo de 40x; se obtuvo un promedio de esporas por cuadro, este promedio se multiplicó por el factor de conversión 25×10^{25} y por la dilución hecha inicialmente, obteniéndose una concentración conocida de esporas por ml de suspensión.

Usualmente un solo matraz proporciona aproximadamente 4×10^{10} esporas que es suficiente para inocular 2Kg de sustrato sólido (34).

La concentración de esporas necesaria para la fermentación se calcula considerando la cantidad de gramos de sustrato en peso seco en el medio. La concentración óptima de esporas por gramo de sustrato es de 2×10^7 (34).

3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.2.1. FERMENTACION EN MEDIO LIQUIDO

El primer paso fue la selección de la cepa que presentó mayor degradación de la cafeína en medio líquido sintético compuesto por cafeína pura como única fuente de nitrógeno, sacarosa como fuente de carbono y una solución mineral.

Se empleó el método espectrofotométrico para la determinación en la degradación de cafeína así como la selectividad de las cepas por dicha fuente de nitrógeno.

3.2.2. FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO (FMS)

En el proceso de fermentación sólida se emplearon dos medios de cultivo a fin de comparar el comportamiento de los microorganismos uno de ellos conteniendo fuente de nitrógeno mineral y otro sin contener fuente de nitrógeno mineral.

Composición del medio A sin fuente de nitrógeno mineral

Por cada 100 g de pulpa de café seca, molida y tamizada (malla 35/45) se añadieron

KH_2PO_4	1.95 gr.
$MgSO_2$	0.45 gr.
Na_2HPO_4	0.18 gr.

Siendo en este caso el sustrato quien proporcionó al medio la única fuente nitrógeno.

Composición del medio B con fuente de nitrógeno mineral

Por cada 100 g de pulpa de café seca, molida y tamizada (malla 35/45) se añadieron

KH_2PO_4	5.0 gr.
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	3.5 gr.
NH_2SO_4	7.5 gr.

En este caso la urea y el sulfato de amonio fueron la fuente de nitrógeno en igual proporción que la cafeína (38).

En ambos casos las sales minerales se disolvieron en cantidades apropiadas de agua corriente para tener el contenido de humedad requerido para la fermentación. Tomando en cuenta que la pulpa de café secada al sol posee una humedad del 10% y considerando los constituyentes sólidos del medio mineral así como de la pulpa de café necesaria, se calculó la cantidad de agua requerida para que el sustrato tuviera una humedad inicial del 70%.

Con la mitad de esta cantidad de agua se prepara la solución mineral y la otra mitad se añadió a la pulpa de café para formar una pasta. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min para evitar toda contaminación posterior por la microflora presente en la pulpa de café.

La pulpa de café impregnada y esterilizada se enfrió y se le añadió la solución mineral, se inoculó con las esporas en suspensión a una concentración de 2.7×10^7 esporas/g de SPS, se homogenizó perfectamente y se procedió a preparar las columnas

3.3. METODO DE CULTIVO

El medio sólido inoculado se repartió en los incubadores (columnas) a razón de 20 g/columna, colocándose en baños maría con termostatos a 25 y 35°C. Los incubadores fueron aireados con aire saturado de agua a un flujo de 4 l/h/columna realizándose una cinética de fermentación a las 0, 24, 30, 35, 40, 45, 48 y 50 horas. con determinaciones de humedad, pH y cafeína por el método de HPLC.

3.3.1. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

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

Las columnas se mantuvieron a temperatura controlada en un baño de agua de convección forzada. La fig. 4 muestra el equipo de incubación.

3.4. CONDICIONES DE FERMENTACION

La concentración de esporas empleada fue de 2.7×10^7 esporas/g de sustrato, las columnas se empacaron con 20 g de sustrato inoculado, el tamaño de partícula utilizado fue la fracción obtenida en la malla 35/45, las columnas fueron aireadas a razón de 4 l/h/columna e incubadas en un baño maría a 25 y 35°C realizándose una cinética de fermentación de 0, 24, 30, 35, 40, 45, 48 y 50 horas.

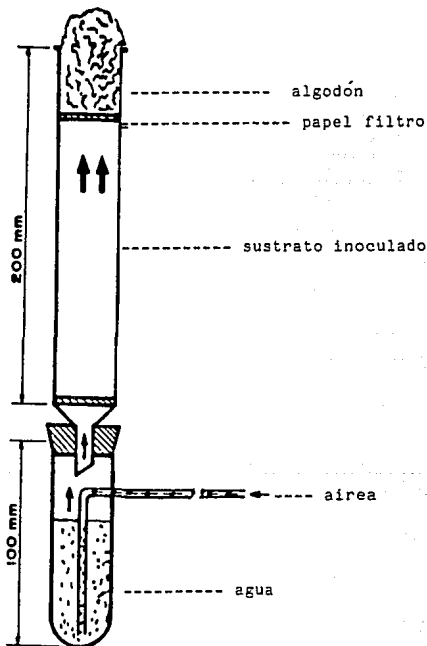


Fig. 4 . Equipo de incubacion

3.5. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

En los tiempos determinados se llevó a cabo el muestreo, tomando una muestra de cada columna de fermentación. El producto fermentado se homogenizó y se sometió al tratamiento indicado en el esquema de la fig 5

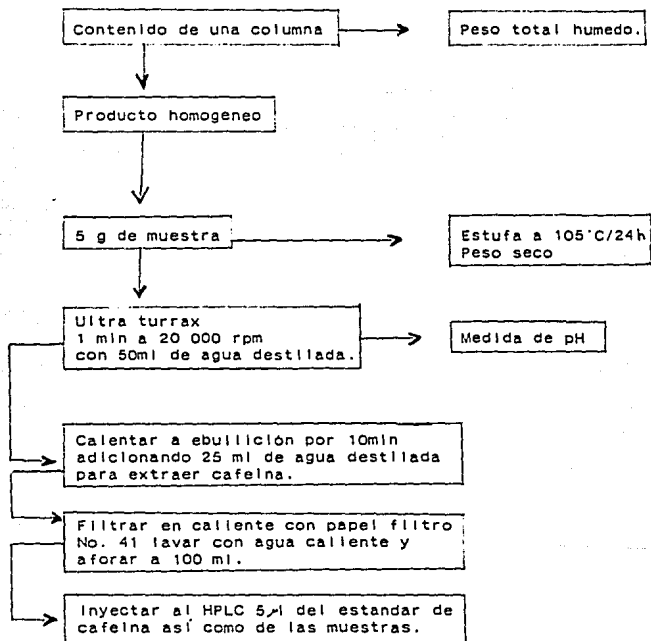


fig.5 Diagrama de tratamiento de las muestras de productos fermentados para su analisis.

3.6. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

3.6.1. DETERMINACION DE HUMEDAD

El contenido de humedad se determinó por el método gravimétrico en 5 g de muestra perfectamente homogénea.

3.6.2. DETERMINACION DE pH

Para la determinación del pH, se tomaron 5 g de muestra homogénea, se colocaron en un vaso de pp. al cual se le adicionaron 50 ml de agua destilada, se homogenizó en Ultra-Turrax durante 1 min aproximadamente a 20 000 rpm quedando una suspensión acuosa a la cual se le determinó el pH en un potenciómetro previamente calibrado, con soluciones estándar de buffer de pH 4 y pH 7; se empleó un electrodo de calomel marca CORNING obteniéndose la medición directa del pH.

3.6.3. DETERMINACION DE CAFEINA

La determinación de cafeína se realizó por el método del HPLC (16). Se preparó una solución estándar de cafeína (SIGMA) con una concentración de 1 mg/ml (la cafeína se disuelve en caliente).

Preparación de las muestras: se tomaron 5 g de la muestra fermentada y homogénea, se colocó en un matraz de 125 ml conteniendo 50 ml de agua destilada se mezcló en un Ultra-Turrax durante 1 min a 20 000 rpm, posteriormente se calentó a ebullición por 10 min para extraer la cafeína presente en la muestra. Finalmente la solución obtenida se filtró en papel Watman No 41, se lavó el filtrado y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Para su cuantificación se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Waters modelo 740, equipado con un inyector automático de muestras y un sistema de detección de luz UV a 254 nm, la columna empleada fue BONDAPAK C de sílica de, 30 cm.

La fase móvil estuvo constituida por 80% de una solución de ácido acético al 1% utilizando agua des-ionizada y 20% de Metanol marca MERCK para HPLC. El ácido acético al 1% y el metanol fueron filtrados por filtros Millipore antes de ser colocados en el cromatógrafo

La cromatografía fue corrida a 25°C a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min y un volumen de inyección de muestra y estándar de 5 µl

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. SELECCION DE CEPAS

De los 350 microorganismos aislados de muestras procedentes de Xalapa Ver, y de Soconusco Chis. principales regiones cafetaleras de México, se preseleccionaron 8 cepas con alta capacidad de degradar la cafeína (en un 60 a 100%); dicha preselección se realizó en un medio líquido en el cual la cafeína fué la única fuente de nitrógeno a fin de encontrar las cepas que presentaran mayor capacidad de degradar la cafeína en un medio sintético. Con respecto a la cuantificación de cafeína ésta se determinó por un método espectrofotométrico, siendo el espectro de absorción de la cafeína de 272 a 276 nm cuando se encuentra en un rango de 10 a 25 mg/l por lo que puede decirse que el método empleado es específico confiable y sencillo, pero sin olvidar que el método de análisis en HPLC es aún más fácil de manejar y mucho más preciso cuantificando rangos de concentraciones micrométricas de cafeína.

Los resultados de esta selección se reportan en la tabla V, en donde podemos observar que de estas 8 cepas seleccionadas, 3 son provenientes de muestras de Veracruz y 5 de Chiapas. Todas las cepas degradaron la cafeína en más de un 60%. En cuanto a la evolución del pH, se nota que a excepción de las cepas de *Penicillium sp.*; *A.fumigatus* y *A.niger* las cuales poseen un pH final muy bajo, todas las demás tuvieron un pH final superior a 6.

Las 8 cepas probadas en medio sintético toleraron una concentración de cafeína de 1.2g/l. De este análisis se destaca que una sola cepa la V33A25 identificada como *Penicillium roquefortii* consumió el 95.25% de la cafeína en medio líquido sintético en 5 días de fermentación a 25°C, presentando una velocidad de degradación de 0.126 mg de cafeína/ml al día. Por lo que fué la cepa seleccionada para emplearla como referencia en el proceso de FMS. Además de ser una cepa reportada en la bibliografía como degradadora de cafeína (38).

En esta etapa del trabajo participaron: Trejo. M-R; Aquilahuatl M-L; Salas J y Nava G.

TABLA V. LISTA DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ALTA CAPACIDAD PARA DEGRADAR
 CAFEINA EN UN MEDIO LIQUIDO. CONDICIONES DE CULTIVO a 25°C,
 pH 5.6, 150 rpm y 1.2 g/l de cafeína como única fuente de nitrógeno.

CEPA	NOMBRE	% CONSUMO DE CAFEINA	pH FINAL	VELOCIDAD DE DEGRADACION
				mg/ ml/ día
V ₁₂ ^A ₂₅	<i>Aspergillus oryzae</i> .	77.75	6.7	0.157
V ₂₆ ^A ₂₅	<i>Penicillium</i> sp.	62.13	7.2	0.126
V ₃₃ ^A ₂₅	<i>Penicillium roquefortii</i>	95.25	6.5	0.126
C ₁₆ ^A ₂₅	<i>Penicillium</i> sp.	61.66	2.5	0.123
C ₂₈ ^B ₂₅	<i>Aspergillus fumigatus</i> .	69.60	6.1	0.119
C ₁₁ ^B ₂₅	<i>Aspergillus</i> sp.	70.66	6.3	0.120
C ₂₃ ^B ₂₅	<i>Aspergillus niger</i> .	63.58	3.4	0.108
C ₁₇ ^B ₂₅	<i>Aspergillus fumigatus</i> .	60.50	2.4	0.103

4.2. CINETICA DE LA DEGRADACION DE CAFEINA POR FMS

Como ya se mencionó además de la cepa V33A25 identificada como *P. roquefortii* se trabajó también, como control de crecimiento, con una cepa que tuviera un buen crecimiento en un medio líquido conteniendo pulpa de café, pero que no hubiera sido probada en el medio selectivo por lo que se eligió la cepa CH₄ identificada como *Aspergillus niger* comúnmente utilizada en el laboratorio de biotecnología de la UAM-I para la producción de pectinasas, a fin de comparar las cinéticas de crecimiento de ambas cepas sobre pulpa de café en el proceso de FMS.

4.2.1. DEGRADACION DE CAFEINA POR *P. roquefortii* EN FMS

Para este estudio se utilizó un medio A en el cual la pulpa de café molida y tamizada fue la única fuente de carbono y de nitrógeno adicionándole sólo sales minerales sin nitrógeno. Los resultados de esta fermentación se reportan en la tabla VI.

En donde se observó que el pH inicial es de 4.3. Después de la germinación de las esporas (12h) y a la primera muestra se nota que el pH se acidifica ligeramente bajando hasta 4.0. A las 40 horas de fermentación el pH aumento drásticamente y alcanzó valores de 7 al final de la fermentación.

Por el contrario la humedad del sustrato fue aumentando gradualmente y paso de 70 a 75% proporcionándole un 5% de humedad al producto fermentado.

Durante la FMS el hongo se desarrollo bien sobre la pulpa de café, determinándose por HPLC que la degradación de cafeína se inicio a partir de las primeras 24h, (considerando que la concentración de cafeína presente en la muestra de tiempo cero es de 6.56 mg de cafeína/g de pulpa p.s. y ésta fue considerada como el 100% de cafeína presente en la pulpa de café), la mayor cantidad de cafeína fue hidrolizada a las 35h de fermentación presentándose el 96% de cafeína hidrolizada después de las 40h de fermentación de tal manera que la fermentación podría detenerse entre las 40 y 50 horas.

Si se compara la degradación de cafeína con los valores del pH ambas en función del tiempo fig.7 podemos notar que cuando el pH alcanza el punto más bajo de acidez éste corresponde a la mayor degradación efectiva de cafeína presente en la pulpa de café y en los tiempos siguientes éste va elevándose gradualmente conforme se elimina la cafeína

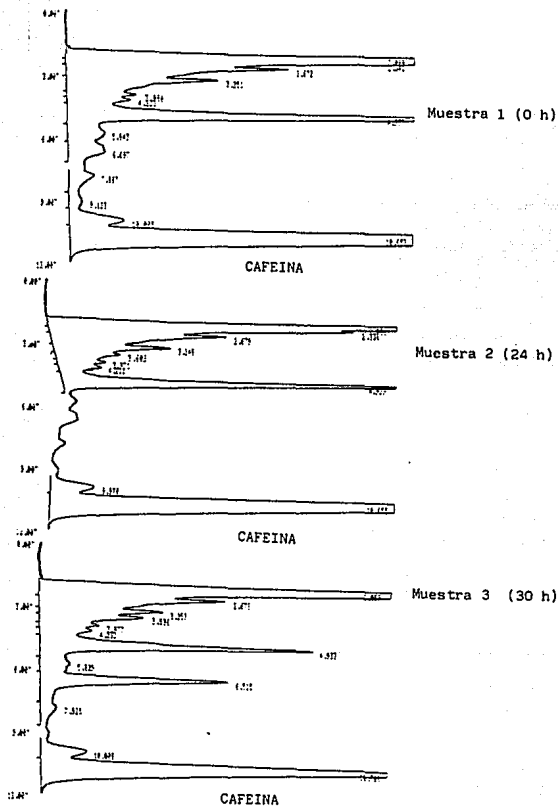
TABLA VI. CINETICA DE LA DEGRADACION DE CAFEINA POR Penicillium roquefortii.
"Medio A" a 25°C sin nitrógeno mineral.

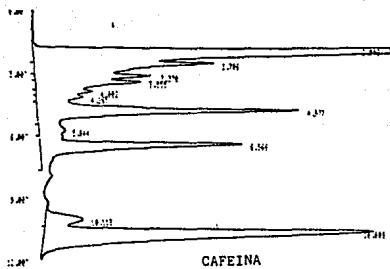
Tiempo (h)	Concentración (mg de cafeína/g de pulpa p.s)	pH	humedad (%)	Cafeína (%)
0	6.56*	4.30*	70.62*	100.00
	0.02**	0.00**	0.18**	
24	5.81	4.30	71.18	88.57
	0.01	0.03	0.24	
30	3.72	4.31	71.99	56.71
	0.06	0.03	1.03	
35	1.05	4.00	73.00	16.00
	0.00	0.01	0.31	
40	0.25	6.03	74.50	3.19
	0.01	0.06	0.71	
45	0.05	6.80	74.98	0.76
	0.02	0.18	0.26	
48	0.03	6.93	75.04	0.45
	0.00	0.08	1.34	
50	0.01	7.08	75.35	0.15
	0.05	0.03	0.09	

* Media

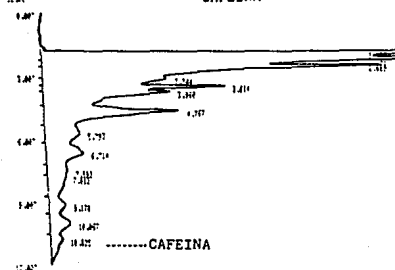
** Desviación Estándar

Fig. 6 DETERMINACION DE CAFEINA POR EL METODO DE HPLC.

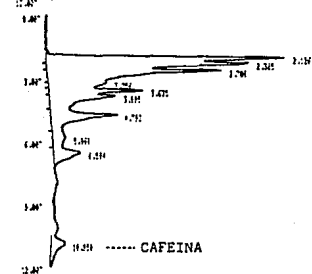




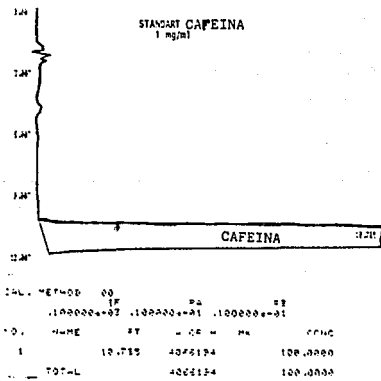
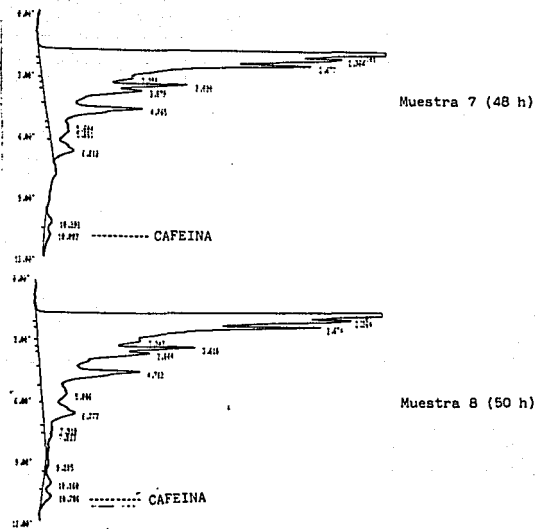
Muestra 4 (35 h)



Muestra 5 (40 h)



Muestra 6 (45 h)



De esta observación se puede decir que la evaluación del pH podría ser un indicador indirecto en la degradación de la cafeína durante el proceso de FMS.

En la fig.6 en donde se reportan los cromatogramas obtenidos de los análisis en HPLC de las muestras fermentadas, se observa muy evidentemente la disminución de la cafeína, a partir de las 24h, desapareciendo completamente del cromatograma a las 48h.

4.2.2. DEGRADACION DE LA CAFEINA POR *A.niger* EN FMS

Para realizar un control de crecimiento sobre pulpa de café de *P. roquefortii* se empleó una cepa no probada en el medio selectivo en este caso *A. niger*, utilizando las mismas condiciones de FMS que para el experimento anterior. El único parámetro que cambió en este caso fue la temperatura de incubación, para *A. niger* la cual fue de 35°C.

Los resultados obtenidos de la cinética de fermentación se reportan en la tabla VII. Se observó que el pH se mantuvo en un rango de 4.0 a 4.5, obteniéndose un desarrollo pobre de la cepa sobre la pulpa de café sin presentar eliminación de la cafeína, lo cual se esperaba, ya que la cepa se usó únicamente como control de crecimiento en la pulpa de café. La humedad del sustrato aumentó de una manera similar al experimento anterior.

4.3. FMS DE LA PULPA DE CAFE ADICIONANDOLE NITROGENO MINERAL

En los dos experimentos anteriores se observó que *Penicillium roquefortii* degradó la cafeína presente en la pulpa de café cuando en el medio de cultivo no existía fuente de nitrógeno mineral y que *Aspergillus niger* no degrada la cafeína presente en la pulpa de café ya que su desarrollo sobre la pulpa de café en la FMS fue muy pobre. Por lo que se quiso saber si la ausencia de fuente de nitrógeno en el medio provoca la falta de crecimiento de *A. niger* y saber de que manera estas condiciones en el medio influyen en *P. roquefortii*. En dicho caso el medio de cultivo de ambas cepas fue limitado por la ausencia de nutrientes nitrogenados.

Por lo que se determinaron los efectos de crecimiento y degradación de cafeína en ambas cepas, al adicionar una fuente de nitrógeno mineral en el medio de cultivo además de el proporcionado por la pulpa de café.

TABLA VII. CINETICA DE LA DEGRADACION DE CAFEINA POR Aspergillus niger.
 "Medio A" a 35°C sin nitrógeno mineral

Tiempo (h)	Concentración (mg de cafeína/g de pulpa p.s)	pH	Humedad (%)	Cafeína (%)
0	5.83 *	4.20*	70.02 *	100
	0.01 **	0.03**	0.00 **	
24	5.82	4.61	74.77	100
	0.13	0.01	0.06	
30	5.83	4.50	74.77	100
	0.21	0.00	0.21	
40	5.87	4.30	75.00	100
	0.15	0.06	0.13	
45	5.80	4.10	75.49	100
	0.18	0.03	0.05	
48	5.69	4.00	79.05	100
	0.32	0.01	0.02	
50	5.69	4.00	79.65	100
	0.09	0.02	0.14	

*Media

** Desviación estándar

Se emplearon las mismas cepas y un medio de cultivo B, el cual contenía una fuente de nitrógeno mineral a base de urea y sulfato de amonio. La pulpa de café con la solución mineral, fue sometida a un pretratamiento térmico a 121°C en autoclave por 15 min y después se inoculó con una suspensión de 2×10^7 esporas/g SPS.

4.3.1. DEGRADACION DE CAFEINA EN PULPA DE CAFE CON NITROGENO MINERAL POR *Penicillium roqueforti*

Una vez llevada a acabo la cinética de fermentación con este nuevo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de fermentación empleadas en el medio A se obtuvieron los resultados reportados en la tabla VIII.

Se puede observar que el pH subió de inmediato una vez de que las esporas germinaron, es decir después de 12 horas, para alcanzar valores desde 4.7 a 7.2 en las primeras horas de fermentación manteniéndose así durante toda la cinética. Con respecto al desarrollo del hongo sobre la pulpa de café, por observaciones microscópicas, se puede decirse que *P. roquefortii* creció bien invadiendo toda la superficie libre de la pulpa de café, sin presentar ninguna disminución de la cafeína.

Lo que significa que el hongo prefirió emplear el nitrógeno mineral para su metabolismo y no la cafeína de la pulpa de café. Por lo que podemos decir que para la degradación de la cafeína presente en la pulpa de café no debe adicionarse fuente de nitrógeno mineral al medio de cultivo, obligando así al microorganismo a utilizar los carbohidratos y pectinas como fuente de carbono y a la cafeína como fuente de nitrógeno para su crecimiento.

4.3.2. DEGRADACION DE CAFEINA EN PULPA DE CAFE CON NITROGENO MINERAL POR *Aspergillus niger*

Los resultados obtenidos en la cinética de *A. niger* en el medio B con fuente de nitrógeno mineral son reportados en la tabla IX.

Se comprobó que el crecimiento de *A. niger* si depende de la presencia de una fuente de nitrógeno en el medio, los valores del pH presentaron un cambio radical en las primeras 24h de fermentación manteniéndose constante posteriormente. La humedad aumentó durante la fermentación, proporcionándole una gran humedad al producto final. Empleándose esta cepa únicamente como una cepa comparativa negativa, en la degradación de la cafeína presente en la pulpa de café.

TABLA VIII. CINETICA DE LA DEGRADACION DE CAFFEINA POR Penicillium roquefortii.

"Medio B" a 25°C con fuente de nitrógeno mineral

Tiempo (h)	Concentración (mg de cafeína/g de pulpa p.s)	pH	Humedad (%)	Cafeína (%)
0	6.58*	4.61*	71.21*	100
	0.21**	0.06**	0.19**	
24	6.05	7.22	74.04	100
	0.11	0.12	0.08	
30	6.59	7.10	75.48	100
	0.02	0.07	0.21	
40	6.12	7.20	76.02	100
	0.07	0.01	0.06	
45	6.52	7.32	76.19	100
	0.03	0.00	0.15	
48	6.33	7.00	76.29	100
	0.12	0.27	0.15	
50	5.96	7.31	76.51	100
	0.06	0.13	0.20	

* Media

** Desviación Estándar

TABLA IX. CINETICA DE LA DEGRADACION DE CAFEINA POR Aspergillus niger.

"MedioB" a 35°C con fuente de nitrógeno mineral.

Tiempo (h)	Concentración (mg de cafeína/g de pulpa p.s.)	pH	Humedad (%)	Cafeína (%)
0	4.86*	4.60*	70.19*	100
	0.31**	0.06**	0.01**	
24	4.97	7.10	72.26	100
	0.13	0.12	0.06	
30	4.82	7.13	72.61	100
	0.21	0.04	0.31	
40	4.26	6.73	76.49	100
	0.19	0.07	0.91	
45	5.96	6.80	79.92	100
	0.18	0.23	0.41	
48	5.80	6.92	77.60	100
	0.10	0.09	1.06	
50	5.70	7.00	78.23	100
	0.13	0.03	0.26	

*Media

** Desviación Estándar

4.4. COMPARACIONES DE CRECIMIENTO

Analizando los cuatro experimentos anteriores podemos establecer dos tipos de comparaciones en donde se confronten los resultados obtenidos para ambas cepas con cada medio de cultivo.

4.4.1. *P. roquefortii* y *A. niger* SIN FUENTE DE NITROGENO MINERAL

En la fig.7 se reportan las cinéticas de la degradación de la cafeína así como los cambios presentados en el pH durante la cinética de la FMS sobre pulpa de café por las dos cepas de hongos filamentosos *A.niger* y *P.roquefortii*

En esta gráfica se puede apreciar que la cepa V₃₃A₂₅ identificada como *P.roquefortii* logró una completa degradación de la cafeína presente en la pulpa de café cuando crece sobre un medio de cultivo A sin fuente de nitrógeno mineral; dicha degradación fué acompañada por un cambio muy marcado en el pH. Mientras que la cepa CH₄ identificada como *A.niger* y bajo las mismas condiciones de cultivo en FMS sobre pulpa de café no logró un buen desarrollo por lo que no presentó ninguna degradación de la cafeína en la pulpa de café (Fig.7).

En la misma fig.7 se puede apreciar la diferencia que existió en las dos cinéticas obtenidas de *A.niger* y de *P.roquefortii*. En el primer caso no hubo crecimiento ni degradación de la cafeína; por consecuencia los valores de pH y de la concentración de la cafeína se mantuvieron constantes. Al contrario en el segundo caso el hongo creció y las cinéticas de pH y del consumo de la cafeína cambiaron de una manera muy drástica. Por lo anterior y debido al crecimiento del hongo sobre un medio sin fuente de nitrógeno mineral, se confirmó que *P.roquefortii* posee un complejo enzimático con posible capacidad de transformar la cafeína de la pulpa de café en urea y metabolizarla durante el proceso de FMS, por lo que se puede considerar a el pH puede ser un parámetro indirecto para seguir la degradación de la cafeína por FMS sobre pulpa de café .

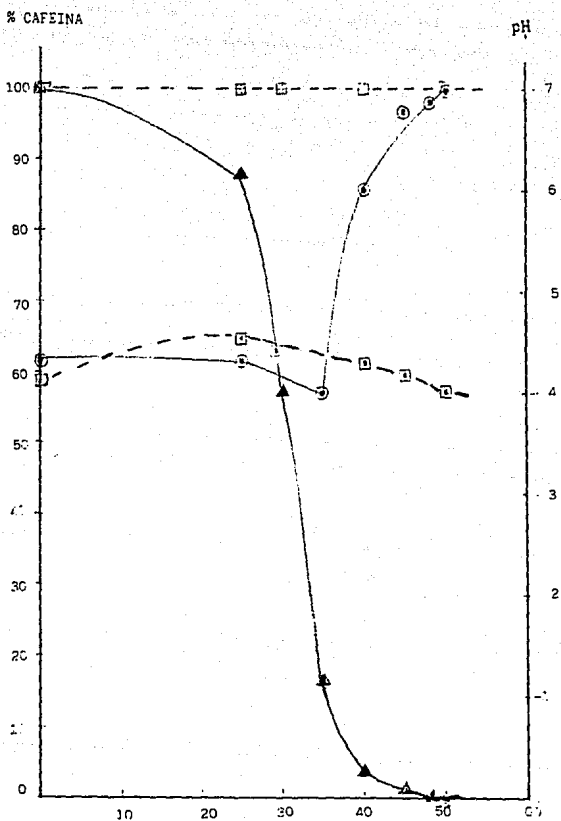


Fig 7. CINETICA DE LA EVALUACION DE CAFEINA Y DE EL pH VS TIEMPO

POR Penicillium roquefortii. y Aspergillus niger.

(—) P. roquefortii. (⊙) pH (▲) Cafeína

(- - -) A. niger. (⊙) pH (■) Cafeína

4.5. CONDICIONES UNICAS DE LA DECAFEINIZACION
DE LA PULPA DE CAFE POR FMS

En la tabla X. se reportan las condiciones unicas que deben emplearse para la eliminaci3n biol3gica de la cafeina presente en la pulpa de caf3.

Para el proceso de FMS se utiliz3 pulpa de caf3 seca y moída. Se reporta en la misma tabla la composici3n de la soluci3n mineral que se ańadi3; esta soluci3n no debe de tener sales minerales nitrogenadas.

La pulpa de caf3 pretratada se inocul3 con una suspensi3n de 2×10^7 esporas/g SPS. Con la inoculaci3n se ajust3 la humedad inicial del sustrato a 70%. Despues de inoculado el sustrato, se introdujo en reactores de tipo columna en las condiciones descritas en la tabla X.

TABLA X. CONDICIONES UNICAS PARA LA DECAFEINIZACION DE LA PULPA DE CAFE

Sustrato Pulpa de caf3, seca moída y tamizada (malla35/45)

Medio Mineral KH_2PO_4 1.95 g/100g de pulpa p.s.
 $MgSO_4$ 0.45 g/100g de pulpa p.s.
 NaH_2PO_4 0.18 g/100g de pulpa p.s.

Microorganismo Penicillium raoucaffii.

Conc. de inculo 2×10^7 esporas/g de sustrato p.s.

Humedad inicial 70% empleando agua corriente.

pH inicial 4.3

Temperatura 25°C

Tratamiento de Muestra: Se adiciona al sustrato el medio mineral, previamente disuelto en cantidades apropiadas de agua para proporcionar a 3ste una humedad del 50%.
Se esteriliza el medio a 121°C por 15 min se enfra y se dosifica la cantidad de esporas para obtener una conc. de 2×10^7 esporas/g de sustrato p.s. y se ajusta la humedad al 70%

Condiciones de Cultivo: La muestra tratada se coloca en columnas de fermentaci3n a raz3n de 20 g/ columna y se incuba en bańo mara de 25°C con una afluencia de 4 l/h/columna, durante 50 h

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En la FMS *Penicillium roquefortii* A25v33 degrada la cafeína presente en la pulpa de café en casi un 99.95% siempre y cuando no se le adicione al medio de cultivo fuente de nitrógeno mineral.

La cepa de *Penicillium roquefortii* presentó una alta selectividad para consumir el nitrógeno presente en la cafeína y no el nitrógeno protéico de la pulpa de café. Por lo que la FMS es un proceso excelente para el aprovechamiento de la pulpa de café.

La evaluación del pH en el medio de cultivo durante la FMS de la pulpa de café es un indicador indirecto de la degradación de la cafeína

Se confirma que la degradación de la cafeína se debe a *P. roquefortii* y no a procesos enzimáticos y/o químicos; esto se concluye por el control con *A. niger* incubado en condiciones idénticas.

El método de análisis empleado en la FMS (HPLC) proporcionó datos precisos y evidentes de la degradación de cafeína

La metodología empleada para la selección de las cepas permitió la obtención de una buena cepa degradadora de cafeína en FMS.

La pulpa de café es un excelente sustrato que presenta características idóneas para trabajar en FMS; ya que es un subproducto abundante con una alta retención de agua que le permite mantener fácilmente del 70 al 75% de humedad sin problemas en la transferencia de oxígeno

Al eliminar la cafeína presente en la pulpa de café mediante el proceso de FMS con *P. roquefortii* a 25°C ésta se transforma en un compuesto con actividad probiótica.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguirre B.F. "La utilización industrial del grano del café y de sus productos. Guatemala Instituto Centro Americano de la Investigación Tecnología Industrial Invest. Technol. del ICAIT No1 43p 1966
- 2.- Aquiahuatl, M.A.; Ralmbault, M.; Trejo M.R "Coffee pulp detoxification by solid state fermentation" Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial raw materials. Ed. Marice Ralmbault-ORSTOM pp.13-16; 128-133 Montpellier France 1988
- 3.- Bergmann F. ; Ungar-Waronh; Kwletny-Govrin H.; (1962). "Some specific reactions of the purine-oxidizing system of *Pseudomona aeruginosa*" Biochemica. Biophysica acta 55 pp 512-522.
- 4.- Black R.L and Dix, N.J.; (1976). "Utilization of ferulic acid by microfungi from litter and soil" Trans Br. Mycol. Soc. 66 (2) pp. 313-317.
- 5.- Braham, J.E. "Pulpa de café en otras especies." En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café composición, tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978) pp 31-43
- 6.- Bressani R.; "Posibles usos de los subproductos del grano del café". En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café composición tecnología y utilización (Ottawa, Canada, International Development Research Centre, 1978) pp. 31-43
- 7.- Bressani, R. "Subproductos del fruto del café." En: Braham J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café composición, tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978). pp 9-20.

8.-Bressani, R. "Factores antifisiológicos de la pulpa de café." En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café composición tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978) pp 143-152

9.- Bressani; Eugenia Estrada y R. Jarquín.; "Pulpa y pergamino de café Composición Química contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa" Turrialba, 22 1972 pp 299-304.

10.- Cabeza M.T.; A. Flores. "Usos de la pulpa de café en la alimentación de rumiantes." En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café composición tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978) pp 45-67

11.- Calle, V.H.; "Producción de gas combustible por fermentación metánica de la pulpa de café". Boletín Inf. Cenicafé, Chinchina, Colombia 6 pp198-205. 1955

12.- Cannel, E.; Moo-Young M. "Solid State Fermentation Systems" Process. Biotechnology, 15 (5) pp 24-28. 1980.

13.- Coste R.; (1968) " Le cafeire Tech. Agri. et Prod. Tropicales" 14 pp. 11-20; 167-193; 214-219.

14.- Cuevas R.; "Optimización y factibilidad económica del proceso de decafeinización de la pulpa de café." Tesis. M.Sc. Ciencias de Alimentos y Nutrición Animal. Universidad de Sn. Carlos 1976 57p.

15.- De Leon R.; F.Herrera. "Fungal biomass production from coffee pulp juice" J. Ferment. Technol. 58 (6) pp 579-584. 1980.

16.- DeVries J. W., Johnson K. D. and Heroff J.C. (1981) "HPLC Determination of caffeine and Theobromine content of various Natural and Red Dutched Coconas". Food Sci 46

- 17.- Elias L.G. "Composición Química de la pulpa de café". En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café: composición, tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978) pp. 19-29.
- 18.- Finger, S.; T Regan. "Aerobial microbial growth in semisolid matrices: heat and mass transfer limitations." Biotechnol. Bioeng. 18 pp.1193-1218. 1976.
- 19.- Franke W, and Hahn G.E. (1955). Physiol. Chemistry 301 pp. 90
- 20.- Fuelle A.J. "Types of micotoxins in foods and feeds" En: Goldblatt, L.A. eds. Aflatoxin New York Academic Press. pp. 187-221. 1969.
- 21.- Golovlev E.L.; Chermenski D.N.; Golovleva L. y Skryabin G.K. "Selection of fungal cultures for solid-phase fermentation of sawdust and straw"
- 22.- Gomez. G.R. "Procesamiento de la pulpa de café; tratamientos químicos" En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds Pulpa de café: composición, tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre 1978) pp.125-144.
- 23.- Graham, D.M. "Caffeine's identity, dietary sources, intake and biological effects." Nutri. Rev., 38 pp 97-102 1978.
- 24.- Gray, W.D. "The use of fungi as food and processing" London Butter words 1 pp 113. 1970
- 25.- Hesseltine, C.W. "Solid state fermentations" Biotechnol. Bioeng. 14 (4) pp 517-523 1972.
- 26.- IMECAFE.; Roussos S. Gutierrez M. "Disponibilidad de la pulpa de café como materia prima" En: Roussos y col. Eds. Memorias I Sem. Inter. Biotechnol. Agroindust. Café Xalapa 12-15 Abril 1989.

- 27.- Ithoh M.; Takahashi S.; Iritani M. and Kanako Y. (1980) "Degradation of three isomers of cresol and mono-hydroxybenzoate by *eumycetes*". Agric. Biol. Chem. 44 (5) pp. 1037-1042.
- 28.- Jarquin R. "Pulpa de café en la alimentación de cerdos." En: Braham, J.E. y R. Bressani. Eds. Pulpa de café, composición tecnología y utilización (Ottawa Canada, International Development Research Centre, 1978) pp 69-86.
- 29.- Lonsane B.K.; Ghildyal N.P.; Ramakrishna S.V. "Engineering aspects of solid-state fermentation" Enzyme Microbiol. Technol. 7 pp 258-265 1985.
- 30.- Martin, E.W. y Cook F.E.; (1955) "Cafeínee" Remingtons Practice of Pharmacy. pp 1186-1188.
- 31.- Mishustin E.N and Erofeev N.S. (1966) "Nature of the toxic compounds accumulating during the decomposition of straw in soil" Microbiology. 35 (1) pp.126-129.
32. Molina, M.R; G de la Fuente y Bressani. "Decaffeínización a process to toxify coffee pulp." J. Agr. Food. Chem.; 23 pp. 1055-1059 1974
- 33.-Peñaloza W. "Fermentación sólida de la pulpa de café" Tesis Maestro en Ciencias. Universidad de San Carlos Guatemala. Fac. Ciencias Químicas y Farmacia 50 p. 1985.
- 34.- Raimbault M.; Alazard D. "Culture method to study fungal in solid." Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9 pp 199-202. 1980.
- 35.- Rolz. C.; de Leon R.; de Arriola M.C (1988) "Solid substrate growth of white rot fungi of coffee pulp Acta Biotechnol. 13 pp 211-223
- 36.- Roussos, S. "Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Etat, Université de Provence, France, 162 p. 1985

- 37.-Schwimmer, S.; Kurtzman Jr. and Heftmann E. (1971) "Caffeine metabolism by *Penicillium roquefortii*" Arch. Biochem. Biophysic. 147 pp 109-113.
- 38.-Schwimmer, S y R.Kurtzman; "Fungal decaffeination of roast coffee infusions" J. Food Science. 37 pp. 921-923 1972.
- 39.-Shoda M.;Maruta K. and Udaka S. (1980). "Isolation and properties of phenol Utilizing microorganisms whit special reference to catecol 1,2-oxygenase " Agric. Biol. Chem. 44 (8) pp.1841-1846.
- 40.-Takahashi S.; Ithoh M.; Tsubaki K. and Kaneko Y. (1981). "Taxonomical identification of phenol and o-creso assimilating fungus *aurebasidium pullulans* and its growth characteristics in phenol medium with methanol or formaldehyde" Agric. Biol. Chem. 45 (8) pp 1809-1815.
- 41.- Trejo Hernandez. M.R. "Producción de enzimas pecticas por Fermentación sólida." Tesis Licenciatura. Fac. de Quimica , UNAM. 106 p. 1986.
- 42.- Ullman, F. Enciclopedia de Quimica Industrial Seccion 2 3 pp 491-494 eds. Gustavo Gil; Barcelona 1931.
- 43.- Vevey, S. 1977 Servicios Marketing de la Sociedad de Asistencia Técnica de Productos Nestle S.A.
- 44.- Wolf, F.T. (1955) Bull. Torrey Bot. Club 82 pp 342.
- 45.- Yost R.W. Colond R.D. "Introducción a la cromatografía Líquida practica" eds.Perkin Elmer; pp. 3-25 U.S.A. 1981.
- 46.- Zuluaga V.J. (1989) Utilización Integral de los subproductos del café. En:Roussos y col. Eds Memorias I Sem. Inter. Blotecnol Agroindust. Café. Xalapa 12-15 Abril 1989 México pp 63-76