



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

1
2ej.
00361
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETOXIFICACION DE LA PULPA DE CAFE: MORFOLOGIA, FISIOLOGIA Y
BIOQUIMICA DE HONGOS FILAMENTOSOS QUE DEGRADAN LA CAFEINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

PRESENTA

MA. DE LOS ANGELES AQUIAHUATL RAMOS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. GENERALIDADES	5
3.1. EL CAFE	5
3.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y CONDICIONES BIOCLIMATICAS PARA EL CULTIVO DEL CAFE	5
3.3. PRODUCCION MUNDIAL Y NACIONAL DEL CAFE	8
3.4. INDUSTRIALIZACION DEL CAFE	10
3.4.1. Beneficio húmedo	11
3.4.2. Beneficio seco	12
3.5. SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIALIZACION DEL CAFE	12
3.6. COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DEL CAFE	13
3.7. VALORIZACION DE LA PULPA DEL CAFE	15
3.7.1. Abono orgánico	15
3.7.2. Combustible	16
3.7.3. Producción de biogas (metano)	17
3.7.4. Medio de cultivo para microorganismos	17
3.7.5. Alimento para animales	18
3.7.6. Producción de hongos comestibles	19
IV. ANTECEDENTES	20
4.1. LA CAFEINA: QUIMICA Y DISTRIBUCION	20
4.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA CAFEINA	21
4.3. EFECTOS DE LA CAFEINA A NIVEL MOLECULAR	21
4.4. ELIMINACION DE CAFEINA DE LA PULPA DE CAFE	21
4.4.1. Métodos físicos y químicos	22
4.4.2. Métodos biológicos	22
4.4.2.1. Ensilado de la pulpa de café	22
4.4.2.2. Degradación microbiana de la cafeína	23

4.5. LOS HONGOS	25
4.5.1. Clasificación general	26
4.5.2. Criterios de identificación	26
4.5.2.1. Características macroscópicas	26
4.5.2.2. Características microscópicas	26
4.5.3. Fisiología y bioquímica	27
V. MATERIAL Y METODOS	28
5.1. COLECTA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS	28
5.1.1. Origen de las muestras	28
5.1.2. Composición de los medios de cultivo	28
5.1.3. Método de siembra y condiciones de cultivo	29
5.1.4. Nomenclatura y foliación de los aislamientos	30
5.2. PURIFICACION Y CONSERVACION DE CULTIVOS	31
5.3. DESCRIPCION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS	31
5.3.1. Medios de cultivo estandar	32
5.3.2. Métodos y condiciones de cultivo	32
5.4. SELECCION DE CEPAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR LA CAFEINA	32
5.4.1. Selección primaria	33
5.4.2. Selección secundaria	34
5.4.3. Evaluación de parámetros y análisis	34
5.5. ESTUDIO FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	34
5.5.1. Preparación de inóculos	35
5.5.2. Tasa de degradación de la cafeína	36
5.5.3. Crecimiento apical	36
5.5.4. Índice de esporulación	37
5.5.5. Efecto del pH del medio	37
5.5.6. Efecto de la temperatura de incubación	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	38
6.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CONSERVACION DE CULTIVOS	38
6.2. DESCRIPCION E IDENTIFICACION DE CEPAS	39
6.3. SELECCION DE CEPAS	46

6.4. ESTUDIO FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	51
6.4.1. Tasa de degradación de la cafeína	51
6.4.2. Crecimiento apical	52
6.4.3. Índice de esporulación	52
6.4.4. Efecto del pH del medio	53
6.4.5. Efecto de la temperatura	54
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. BIBLIOGRAFIA	56
ANEXO I.	65
ANEXO II.	67
ANEXO III.	71

I. RESUMEN

El cultivo de café representa la principal fuente de divisas del sector agropecuario en México, siendo los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla los principales productores, en cantidades que constituyen aproximadamente el 5% de la producción mundial.

En el proceso de beneficiado húmedo del café, se generan grandes cantidades de subproductos, de los que la pulpa de café es el más abundante. La apremiante necesidad de alimentos para una población en constante aumento, además de los problemas de contaminación ambiental que se agudizan a medida que se producen y procesan mayores cantidades de café, han conducido a la búsqueda constante de alternativas para su mejor utilización.

La pulpa de café, es un sustrato de calidad nutricional adecuada para alimentación de animales, sin embargo su uso es limitado debido a la presencia de factores antifisiológicos como son: la cafeína, fenoles libres y taninos. En este trabajo se estudió una alternativa de eliminación biológica de la cafeína de la pulpa de café por medio de la actividad de hongos filamentosos obtenidos en un ecosistema natural y cultivados en medios de cultivo específicos.

La composición de los medios de aislamiento y la temperatura de incubación de los cultivos influyeron en la selección de los microorganismos. Los medios de cultivo a base de extracto de café (A) y extracto de café con sacarosa (B) fueron los mejores para el aislamiento de cepas que degradan cafeína (cafeinoclasticas). En cuanto a la temperatura, a 35 °C se aislaron hongos del género *Aspergillus* predominantemente, constituyendo más del 70% de los aislamientos, mientras que a 25 °C se obtuvo una mayor proporción de otros géneros tales como: *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum* y *Humicola*.

Se obtuvo una colección de siete cepas de hongos filamentosos muy activas en la degradación de la cafeína, de las cuales dos pertenecen al género *Penicillium* y cinco al de *Aspergillus*.

Por las características fisiológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas, se concluye que pueden ser utilizadas en procesos de fermentación en medio sólido (FMS) de pulpa de café, para que ésta pueda ser consumida por animales sin problemas de toxicidad asociados a la cafeína y de paso, deje de ser una fuente de contaminación de los ecosistemas cafetaleros.

II. INTRODUCCION

En las últimas décadas, el cultivo y procesamiento del café ha constituido la base de la economía de muchos países productores; sin embargo, en esta agroindustria se generan también una gran cantidad de desechos, que causan graves problemas ambientales, a los que en general no se les ha dado la atención adecuada.

Los materiales solubles que constituyen la bebida del café representan una fracción muy pequeña del fruto o cereza siendo únicamente 5.8% de su peso, el 94.2% restante lo constituyen los desechos de procesamiento a que se somete la cereza desde el despulpe hasta su transformación en café soluble (Zuluaga, 1989).

El principal subproducto de la industrialización del café es la pulpa, que constituye el 40% del peso total del fruto, y dado su alto contenido de proteína (12-15% de peso en base seca) se han realizado algunas investigaciones, con el fin de utilizarla en alimentación animal (Bressani, 1979). Se ha demostrado que únicamente puede utilizarse en raciones alimenticias (Cabezas et al., 1979) en porcentajes menores de 20%, debido a la presencia de factores antifisiológicos, como son: cafeína, fenoles libres y taninos que limitan su uso en mayor escala (Adams y Dougan, 1981; Bressani, 1979).

Se han evaluado diversas tecnologías para eliminar estos factores antifisiológicos del café que pudieran aplicarse a la pulpa, tales como: la descafeinización y eliminación de polifenoles mediante extracción con solventes (Molina et al., 1974), ensilado (Murillo, 1979) y tratamientos con hidróxido de calcio o bisulfito de potasio, así como la combinación de éstos con procedimientos físicos como extrusión, calentamiento y secado entre otros (Gómez, 1978). Los resultados han demostrado que casi todos los métodos son poco efectivos o de costo elevado, por lo que no se consideran adecuados para su utilización industrial.

Una alternativa de destoxificación de la pulpa de café, es la degradación biológica de la cafeína, posibilidad que se basa en el hecho de que en la naturaleza existen una gran diversidad de microorganismos, con capacidad para descomponer casi toda clase de compuestos orgánicos complejos, como son: residuos lignocelulósicos (Roussos, 1985), hidrocarburos, pesticidas (Botton et al., 1985) y polifenoles (Black et al., 1976; Mishustin y Erofev, 1966; Shoda et al., 1980; Itoh et al., 1980; Takahashi et al., 1981) entre otros.

La cafeína es el componente tóxico más importante en la pulpa de café, se encuentra en concentraciones de 1-3% en base seca y se ha reportado como susceptible de ser metabolizada por algunos microorganismos. Así por ejemplo, Bergmann et al., (1962) y Woolfolk (1975) reportaron que *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* respectivamente tienen sistemas enzimáticos específicos como los de la xantina oxidasa y uricasa para la utilización de metil purinas.

Kurtzman y Schwimmer, en 1971 consideraron el uso de microorganismos como una alternativa de eliminación de la cafeína del café, debido a que encontraron cepas de *Bacillus coagulans*, *Penicillium roquefortii* y algunas especies de *Stemphylium sp.* con capacidad para degradar la cafeína en medios de cultivo específicos a base de infusiones de café, donde ésta fue utilizada como única fuente de nitrógeno, en presencia de sacarosa.

En 1972, Schwimmer y Kurtzman reportaron un proceso de descafeinización con *Penicillium crustosum* (cepa NRRL 5452) en infusiones de café con cantidades promedio de cafeína de 0.45-0.59 g/l.

Peñaloza et al., (1985); Guzmán, (1983) y Aguilar, (1983) realizaron estudios de fermentación sólida de la pulpa de café con una cepa de *Aspergillus niger*, a fin de evaluar el posible mejoramiento de su valor nutritivo, en los que se reportó el enriquecimiento proteínico del sustrato, pero sin eliminación importante de la cafeína.

Guzmán y Martínez-Carrera (1985), reportaron estudios sobre el uso de la pulpa de café para la producción de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*), en los que al final del proceso observaron una disminución en el contenido de cafeína de la pulpa. Sin embargo, ésto se atribuyó a la solubilización y lavado de sustancias del sustrato durante el proceso de pasteurización, previo a la inoculación del hongo más que a la degradación biológica de la cafeína.

Por otro lado, Calzada et al., (1987), reportaron el cultivo de 26 cepas de basidiomicetos sobre paja de trigo, pulpa de café prensada y mezclas de ambos sustratos, observando que algunas llegaban a producir abundantes fructificaciones asociadas con una disminución importante en el contenido de cafeína, fenoles y taninos de la pulpa del café.

Por lo antes expuesto se propone como objetivo de este trabajo experimental, el obtener una colección de hongos filamentosos, aislados de regiones cafetaleras mexicanas que tengan la capacidad de degradar la cafeína, susceptibles de utilizarse en procesos de fermentación sólida (FMS) como una alternativa de descafeinización de la pulpa de café y de aumentar sus posibilidades de utilización en alimentación animal.

Para alcanzar este objetivo, se proponen una serie de metodologías de aislamiento, purificación, selección e identificación de cepas de hongos filamentosos con esta actividad específica.

Una vez obtenida la colección de cepas, finalmente se harán algunos de los estudios fisiológicos y bioquímicos necesarios para seleccionar las cepas útiles en los procesos de FMS.

III. GENERALIDADES

En este trabajo se hizo una revisión general acerca de los aspectos de producción del café en México y en el mundo para conocer la importancia de este cultivo, el impacto ambiental de los desechos que se producen durante su procesamiento y las perspectivas de utilización de los mismos.

3.1. EL CAFE

El café es el fruto del cafeto, con el que se prepara una infusión aromática, estimulante para el organismo, cuyo consumo se encuentra muy ligado en nuestra sociedad a hábitos alimenticios, por lo que es un producto de primera necesidad sin tener cualidades nutritivas. Así, el café es un producto que proporciona importantes divisas a los países exportadores como es el caso de México, en donde desde hace años esta actividad ocupa el primer lugar como generadora de divisas dentro de la exportaciones no petroleras (Marchal y Palma, 1984).

La planta del cafeto, pertenece al género *Coffea* de la familia Rubiaceae y del orden Rubiales con varios subgéneros, siendo los más importantes en términos comerciales:

Coffea arabica, ampliamente cultivada en América Latina, Africa y Asia. En nuestro continente se produce en zonas altas de México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Paraguay, Perú, zonas de altitud media de Brasil e islas del Caribe. Esta especie se caracteriza por ser un árbol pequeño, de hojas lustrosas no muy grandes, ovaladas y de color verde o café. Las flores son blancas o cremosas; las cerezas tienen forma ovalada que al principio son de color verde, luego se tornan rojas y finalmente negras.

Coffea canephora, también conocida como robusta, se encuentra muy extendida en Africa, Asia, Madagascar y Brasil. Se trata de un árbol grande o arbusto con hojas anchas, de flores blancas o ligeramente rosadas; sus cerezas tienen forma ovalada y cuando se secan se vuelven estriadas.

3.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y CONDICIONES BIOCLIMATICAS PARA EL CULTIVO DEL CAFE

Las áreas de cultivo del café en el mundo, se limitan principalmente por temperatura dado que este cultivo es sumamente sensible al frío y por otro lado no tolera temperaturas mayores de 30 °C, sobre todo en regiones de baja humedad. El café

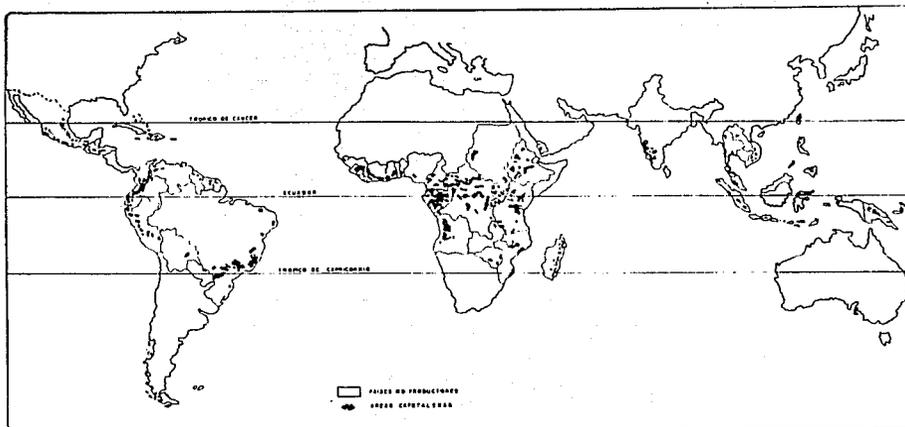


Figura 1. Sitios de producción de café en el mundo.

es un cultivo que prospera en regiones tropicales con temperaturas ideales entre 15 y 26 °C, necesita una pluviosidad elevada de alrededor de 1750 mm/año y altitudes entre los 1000 y 2000 m.s.n.m.

En general se considera que los suelos óptimos para el cultivo del cafeto deben ser profundos, francos, de estructura granular, bien aireados, con permeabilidad y fertilidad moderadas; aunque la especie robusta requiere especialmente suelos ricos en humus (Clarke y Macrae, 1985).

La localización de los principales sitios de producción a nivel mundial se presentan en la fig. 1, donde se observa que este cultivo se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los continentes en los sitios que presentan las características ambientales que requiere, siendo Africa y America del Sur, las principales zonas productoras de café en donde se obtienen más de las dos terceras partes del café que se consume en el mundo (tabla I).

A finales del siglo XVII, el café proveniente de las Antillas fue introducido a México, estableciéndose su cultivo en diversas regiones del país, siendo en la actualidad los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Hidalgo y Nayarit los principales productores, tal como se observa en la fig. 2.

Como se mencionó anteriormente, la producción de café ha tenido una gran importancia en la economía nacional, así por ejemplo en los años 70 hubo un aumento importante en la producción del café debido a los apoyos en la distribución de fertilizantes, crédito y asistencia técnica del INMECAFE lo que se reflejó en un aumento de las exportaciones e ingreso de divisas al país (93.1 millones de dólares). Sin embargo con el programa de mejoramiento de los sistemas de cultivo posteriores hubo aumentos aún mayores en la producción, de 3,200, 000 sacos durante el ciclo 1970/71 a 5,100,000 durante el ciclo 1986/87 que representaron ingresos aproximados de 400 millones de dólares (INMECAFE, 1988). En las tablas II y III, se presentan los datos de producción nacional durante los ciclos de 1979 a 1987.

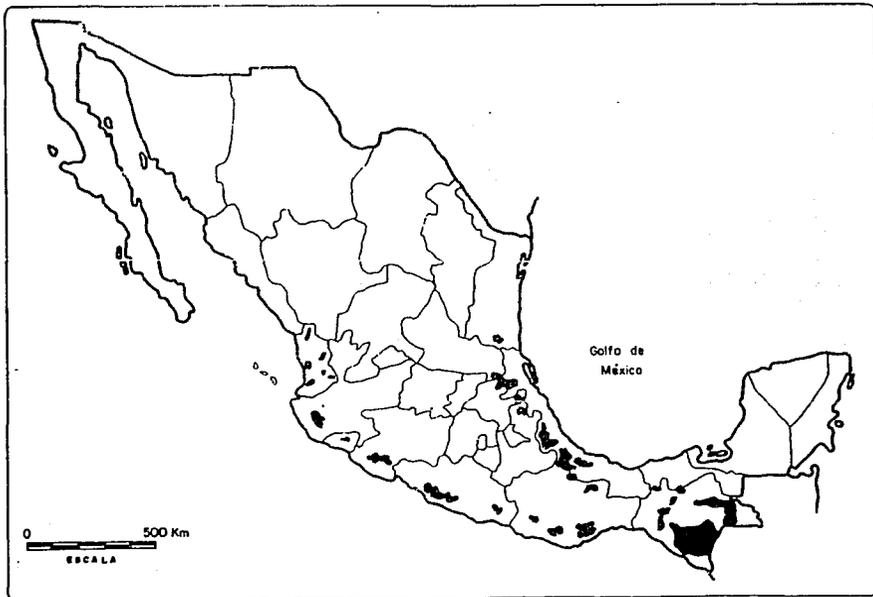


Figura 2. Sitios de producción de café en México.

3.3. PRODUCCION MUNDIAL Y NACIONAL DE CAFE

En los datos presentados en la tabla I, se puede observar que tan sólo para el ciclo 1986-87 se logró una producción mundial de café en total de 80, 962, 000 sacos (quintales) de 60 Kg, equivalentes a 4, 857, 720 ton de café verde.

Tabla I. Datos de producción mundial de café en miles de sacos de 60 Kg (INMECAFE, 1988)

CICLO	AMERICA	AFRICA	ASIA	OCEANIA	TOTAL
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

Tabla II. Datos de producción de café en México por estados durante los ciclos 1979-1983 (miles de sacos de 60 Kg) (INMECAFE, 1988).

ESTADO	1979-80	1980-81	1981-82	1982-83
CHIAPAS	1 710	1 695	1 737	1 464.4
VERACRUZ	1 045	1 100	1 040	1 291.5
OAXACA	430	415	338	568.0
PUEBLA	380	385	510	528.0
GUERRERO	170	155	173	199.0
HIDALGO	170	170	212	274.0
S. LUIS POTOSI	117	115	118	158.7
NAYARIT	48	40	35	57.6
JALISCO	15	17	18	6.0
TABASCO	8	9	12	8.6
COLIMA	4	5	4	3.6
MICHOACAN	2	3	2	0
QUERETARO	1	1	1	0.6
TOTAL	4 100	4 100	4 200	4 560.0

Tabla III. Datos de producción de café en México por estados durante los ciclos 1983 a 1987 (sacos de 60 Kg) (INMECAFE, 1988).

ESTADO	1983-84	1984-85	1985-86	1986-87
CHIAPAS	1 882 880	1 634 000	1 847 500	1 688 583
VERACRUZ	1 410 900	1 384 300	1 374 700	1 516 083
OAXACA	589 915	630 000	623 500	600 300
PUEBLA	573 625	391 800	570 500	716 452
GUERRERO	149 200	187 400	200 900	222 333
HIDALGO	200 800	30 100	48 000	122 283
S.LUIS POTOSI	83 214	4 800	11 300	82 033
NAYARIT	82 040	98 700	94 500	123 133
JALISCO	18 480	20 500	14 500	8 817
TABASCO	19 700	20 300	14 000	12 650
COLIMA	4 970	8 000	5 600	8 050
MICHOACAN	0	0	0	0
QUERETARO	1 276	100	0	1 150
TOTAL	4 970 000	4 410 000	4 805 000	5 100 000

Tabla IV. Cantidades (miles de sacos de 60 Kg) y porcentaje que México aporta a la producción de café a nivel mundial

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

Según la dirección de Producción y Mejoramiento del Café del INMECAFE, México se encuentra en el cuarto o quinto lugar con una producción promedio del 5.14% (tabla IV), sólo superado por Brasil, Colombia, Costa de Marfil e Indonesia; sin embargo se duda del lugar exacto que ocupa por el hecho

de que la producción de los dos últimos países mencionados y México son del mismo orden de magnitud y dependiendo de los ciclos hay variación de un país a otro (Cassaigne, 1989; Crail y Grande, 1990).

3.4. INDUSTRIALIZACION DEL CAFE

El proceso de industrialización del café cereza se conoce como beneficiado y consiste en aplicar dos tipos de procedimientos que permiten obtener los granos de café con características de mejor conservación y almacenamiento, que son: por vía seca y por vía húmeda.

La elección de uno u otro está determinada por factores tales como: el clima, la especie cultivada, la extensión e importancia de las plantaciones, recursos económicos, la disponibilidad de agua y calidad de café entre otros, sin embargo un método no excluye el otro y en determinadas ocasiones se emplean los dos en forma simultánea tal como se muestra en la fig. 3.

El procesamiento del café por vía húmeda, se practica sobre todo en Colombia, Centroamérica, México, Venezuela, Kenya y países del sureste asiático, en tanto que en Brasil y el resto de países africanos emplean la vía seca.

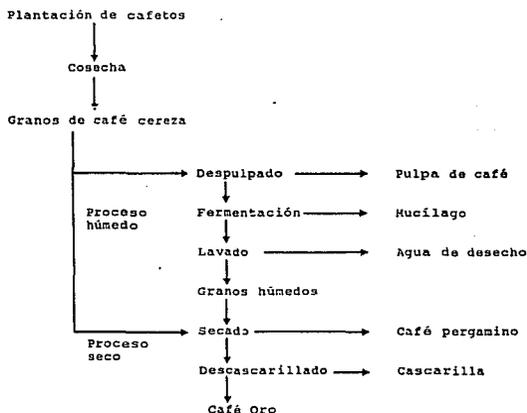


Figura 3. Esquema general del procesamiento del café, productos y subproductos que se obtienen.

3.4.1. Beneficio húmedo

En este proceso se obtiene café pergamino conocido como lavado o suave y consiste de varias etapas como son:

1) Recepción y pesado: se hace con el fin de controlar las entradas del café a beneficiarse.

2) Separación: con el uso de pilas de flotación, se eliminan los frutos vanos y verdes mezclados con el fruto maduro.

3) Despulpado: es la primea operación mecanizada y consiste en separar la pulpa (exocarpio y parte del mesocarpio) del grano (fig. 4), esto se realiza por medio de máquinas despulpadoras de disco o cilindro, que operan con grandes cantidades de agua para facilitar el proceso. La pulpa desprendida se desaloja a través de ductos por arrastre con agua y se deposita en un lugar aparte.

4) Fermentación: el café sin pulpa se deposita en tanques con agua, donde se realiza un proceso bioquímico natural que permite el desprendimiento del mucílago, constituido principalmente de pectina, polisacáridos, carbohidratos y ácidos orgánicos.

La fermentación se realiza dejando en remojo los granos durante 24-30 horas, para que se lleve a cabo la degradación de la pectina por enzimas pectinolíticas del mismo fruto y/o de origen microbiano (Rolz et al., 1971), aunque también se pueden agregar pectinasas específicas para acelerar este proceso mejorándose al mismo tiempo la calidad de café que se obtiene (Favela et al., 1989). De este proceso depende la clave o sello del producto final y su posterior aceptación y precio en el mercado.

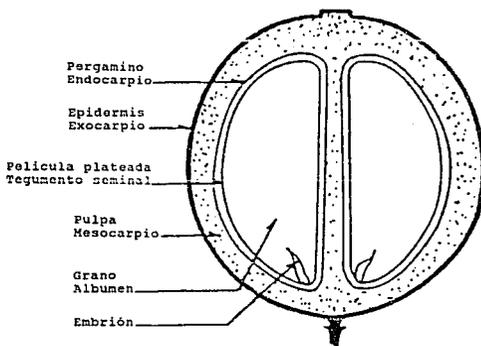


Figura 4. Corte longitudinal del fruto de café.

5) Lavado: se lleva a cabo para eliminar el mucílago desprendido y los productos de la fermentación, colocando el grano en lavadoras a contracorriente, pasado a través de centrifugas y/o canales de flotación.

6) Secado: se realiza con el fin de dejar los granos con 11-12% de humedad para su adecuado almacenamiento y posterior torrefacción y/o beneficiado seco. Esto se lleva a cabo en tolvas metálicas o formando montículos en las partes más bajas de los patios que posteriormente se extienden y se secan al sol.

3.4.2. Beneficio seco

El beneficio seco tiene como objetivo preparar el grano de café para su torrefacción y consumo, obteniéndose café oro a partir de café cereza o pergamino e incluye varias etapas que son:

1) Recepción y pesado: con el mismo fin que en el beneficio húmedo.

2) Secado: el café previamente lavado se tiende en patios para secarse al sol o puede secarse en máquinas rotatorias o de tipo túnel.

3) Descascarillado: se lleva a cabo en máquinas morderas con cóncavos de malla en la parte baja para facilitar la eliminación de cascarilla cuando se trata de café cereza.

Posteriormente, sigue el pulido de café, con la finalidad de emparejar el color del grano y así pasar a su clasificación en lotes de granos de características semejantes en tamaño y forma. Finalmente el café oro o verde se pesa y se envasa sin tostar, en sacos de 60 Kg (quintal).

3.5. SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIALIZACION DEL CAFE

De la misma manera que otras actividades agroindustriales, el procesamiento de café genera una gran cantidad de desechos (fig. 3). Estos desechos, tanto sólidos como líquidos son de difícil disposición y manejo; se estima que de 100 g de frutos de café que se procesan, se producen 28.7 g de pulpa en base seca (b.s.), además de 11.9 g de cascarilla y 4.9 g de mucílago como subproductos, por lo que para producir un Kg de café pergamino con 12% de humedad es necesario procesar 4.5 Kg de café cereza (Bressani et al., 1972)

Según Vernet (1986), el café verde representa el 22% (b.s.) y la pulpa de café el 26%, por lo que de acuerdo a los datos de la tabla IV se estima que para la obtención de 4, 857, 720 ton de café verde se procesaron 22, 080, 545 ton de café cereza, que generaron 5, 740, 941.8 ton de pulpa.

3.6. COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE

La composición química de la pulpa de café ha sido determinada por algunos autores (tabla V); sin embargo, los datos reportados muestran algunas diferencias importantes que probablemente se deben a la heterogeneidad de las muestras analizadas, por el consumo variable de agua durante el beneficiado y a la eficiencia del mismo, que pueden ocasionar la solubilización de algunas sustancias presentes en la pulpa.

Tabla V. Composición química de la pulpa de café deshidratada (%) según análisis de Zuluaga, (1981) (A) comparados con los de Elías, (1978) (B).

	(A)	(B)
Humedad	6.93	12.60
Materia seca	93.07	87.40
Extracto etéreo	2.50	2.50
Fibra cruda	15.10	21.00
Proteína cruda N x 6.25	8.25	11.20
Cenizas	8.12	8.30
Extracto libre de nitrógeno	59.10	44.40
Carbohidratos solubles	22.60	14.47
Taninos	3.70	1.8-8.50
Sustancias pécticas totales	--	6.50
Azúcares reductores	--	12.40
Azúcares no reductores	--	2.00
Cafeína	0.75	1.80
Acido clorogénico	--	1.80
Acido caféico	--	5.20

En esta tabla, se observa que la pulpa de café tiene un contenido importante de carbohidratos, fibra cruda, cenizas y proteína así como también cantidades apreciables de cafeína, taninos y ácidos clorogénico y caféico.

Por otro lado, en la tabla VI se presentan resultados de análisis de aminoácidos en este sustrato reportados por Bressani et al., (1972), y se observa que el contenido de aminoácidos de la pulpa es muy similar a los de harina de soya y de algodón, pero contiene mayores cantidades de valina y lisina que el maíz, aunque con respecto a este último su contenido de leucina, tirosina y fenilalanina es menor.

Tabla VI. Contenido de aminoácidos en la proteína de pulpa de café (g/16g de N) en comparación con otros sustratos (Bressani *et al.*, 1972).

S u s t r a t o				
Aminoácidos	Pulpa de café	Maíz	Harina de soya	Harina de algodón
Lisina	6.8	1.7	6.3	4.3
Histidina	3.9	2.8	2.4	2.6
Arginina	4.9	3.1	7.2	11.2
Treonina	4.6	3.3	3.9	3.5
Cistina	1.0	1.0	1.8	1.6
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	7.9
Tirosina	3.6	5.0	3.2	2.7
Fenilalanina	4.9	5.7	4.9	5.2
Hidroxiprolina	0.5	--	--	--
Acido aspártico	8.7	--	--	--
Serina	6.3	--	--	--
Acido glutámico	10.8	--	--	--
Prolina	6.1	--	--	--
Glicina	6.7	--	--	--
Alanina	5.4	--	--	--

Tabla VII. Constituyentes de paredes celulares y polisacáridos estructurales de la pulpa de café determinados por el método de Van Soest (Elías, 1978).

Compuesto	(%)
Contenido celular	63.2
Fibra detergente neutra	36.8
Fibra ácida detergente	34.5
Hemicelulosa	2.3
Celulosa	17.7
Lignina	17.5
Proteína lignificada	3.0
Proteína cruda	10.1
Cenizas insolubles	0.4

Con respecto al tipo de aminoácidos que contiene la pulpa de café, los más abundantes son: lisina, treonina, tirosina, fenilalanina y valina, sin embargo de acuerdo a los reportes de Jarquin et al., (1973) es deficiente en metionina e isoleucina, lo cual debe considerarse para su utilización en la formulación de alimentos concentrados para animales domésticos.

Los análisis de paredes celulares y polisacáridos por el método de Van Soest realizados por Elías et al., (1972) indican que la pulpa de café tiene un importante contenido de fibra, que puede ser una limitante más para su uso en alimentación de animales monogástricos, siendo los carbohidratos más importantes: la celulosa (17.7%), sustancias pécticas (6.5%), azúcares reductores (12.4%) y no reductores (2.0%), como se muestra en la tabla VII.

3.6.1. Compuestos tóxicos

Aunque aún no se ha determinado el número total de sustancias con posible efecto antifisiológico que contiene la pulpa de café, de acuerdo a los análisis químicos reportados por diversos investigadores (Aguirre, 1966; Elías, 1978; Zuluaga, 1989), en general se han propuesto los siguientes:

- a) la cafeína,
- b) fenoles libres (ácidos clorogénico y caféico),
- c) ácido tánico,
- d) niveles elevados de potasio y
- e) ácido salicílico

3.7. VALORIZACION DE LA PULPA DE CAFE

A pesar del uso limitado que en la actualidad ha tenido la pulpa de café, debido a su toxicidad, su elevado contenido de agua que dificulta el transporte o deshidratación y el bajo precio de los productos que se han obtenido, diversos autores han coincidido en señalar que la pulpa de café tiene una gran potencialidad de empleo tanto por sus características físicas y químicas como por sus niveles de producción tal como se muestra en la fig. 5 (Zuluaga, 1989), y que a continuación se explicarán brevemente.

3.7.1. Abono orgánico

En algunos estudios realizados en El Salvador (Larde, 1984) se propone emplear directamente la pulpa de café fresca como abono, la que se entierra en proporción de 11.3 kg/m², forman do un anillo alrededor del cafeto; asimismo se señala la conveniencia de efectuar esta práctica cada tres o cuatro años como complemento a la fertilización química (Suárez, 1974).

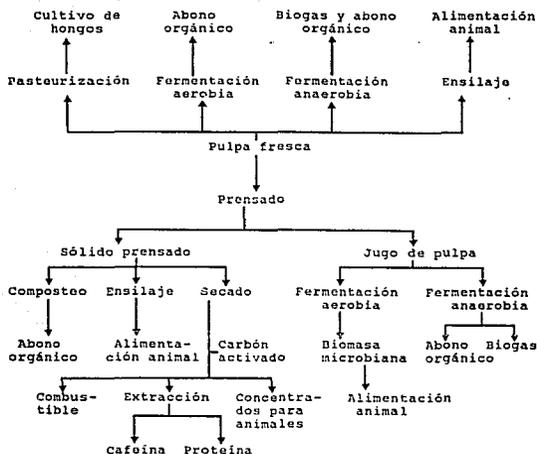


Figura 5. Alternativas de uso para la pulpa de café.

En la mayoría de fincas cafetaleras de Colombia, la pulpa es acumulada en fosas y se deja durante 5-6 meses para que se lleve a cabo la degradación biológica natural, sin embargo, debido a la lentitud del proceso y a la gran cantidad de pulpa que se produce, se requiere de un gran espacio lo que hace que el proceso sea costoso y poco práctico para su manejo y distribución en el cafetal (Arcila, 1979).

Tauk, en 1986 realizó un estudio de descomposición de la pulpa fresca o prensada con microorganismos que se encuentran normalmente en ésta, por medio de un composteo a 45 °C, encontrando que la degradación de este sustrato fresco se acelera al adicionar *Hansenula polymorpha*, sin embargo la degradación de la pulpa prensada fue más lenta y sólo mejorada por la adición de una mezcla de microorganismos. Este tipo de proceso dió como resultado la obtención de un abono orgánico de mejor calidad que la pulpa sin tratamiento.

3.7.2. Combustible

La pulpa seca también puede utilizarse como combustible, mezclándolo con cascarilla de café en relación 1:1. La energía de combustión se puede emplear para calentar el aire en secadores mecanizados para el secado del grano de café,

sin embargo la quema de este material también produce gases y vapores corrosivos que dañan las calderas y contaminan el producto, por lo que únicamente se ha utilizado en secado indirecto, pero con resultados poco eficientes y costosos (Larde, 1984).

3.7.3. Producción de biogas (metano)

Cuando se introducen desperdicios agrícolas mezclados con estiércol de animales en tanques cerrados, sin aireación y a temperaturas mayores de 20 °C, en un medio ligeramente alcalino, los sustratos se fermentan y producen gas metano mezclado con CO₂ y a veces un poco de H₂. El metano se produce por la actividad de diversas poblaciones microbianas que fermentan la celulosa, ácidos orgánicos y alcoholes. El gas que se produce tiene la ventaja de no ser tóxico, ni explosivo, con elevado poder calorífico de tal manera que se puede utilizar en el cocinado de alimentos, para alumbrado e incluso puede reemplazar hasta un 90% del combustible utilizado normalmente en los beneficios de café (Calle, 1977).

3.7.4. Medio de cultivo para microorganismos

La conversión de desechos agrícolas en alimentos y otros productos mediante el cultivo de microorganismos, ha sido una práctica muy importante, pues éstos proveen de nuevas fuentes de alimentos y metabolitos de interés (Roussos, 1985).

El jugo que se obtiene al prensar la pulpa de café, contiene un alto contenido de azúcares, por lo que ha sido empleado en fermentaciones para la propagación de levaduras como *Torula utilis* como fuente de proteínas. El rendimiento promedio durante tres meses de funcionamiento continuo de una planta establecida en Colombia a nivel piloto fue de 750 g de levadura seca por cada 100 Kg de pulpa de café cereza (Calle, 1956). En 1977, Calle realizó el cultivo de *Sacharomyces cerevisiae* para la producción de etanol, obteniendo el producto con bajos rendimientos (1.2 l de alcohol de 85°/100 Kg de café cereza).

Espinoza et al. (1974) y De León et al. (1980) reportaron la producción de biomasa fungal (*Aspergillus oryzae*) en aguas de desecho del beneficiado de café a nivel de laboratorio en fermentadores de 7 y 14 litros.

Por otro lado, dado que la pulpa de café contiene 6.5% de sustancias pécticas y nutrimentos necesarios para el crecimiento de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, se ha estudiado su utilización como sustrato inductor en la producción de enzimas de tipo pectinasas en condiciones de FMS, las cuales posteriormente pueden mejorar considerablemente el proceso de desmucilagínación en el beneficio húmedo, como se explicó anteriormente (Favela et al., 1989).

En la actualidad, la biotecnología estudia la ampliación de perspectivas para el aprovechamiento de este tipo de subproductos mediante la utilización de hongos filamentosos, de tal manera que sea rentable la obtención de productos finales de alto valor agregado como diferentes tipos de enzimas y metabolitos secundarios (antibióticos y factores de crecimiento) con posibilidades de producción a nivel industrial en un futuro no muy lejano (Roussos, 1989).

3.7.5. Alimento para animales

En la actualidad, otro gran interés es el de poder utilizar los subproductos agrícolas como alimento para animales a fin de liberar productos de consumo humano y aumentar la producción de carne o leche, sobretodo en regiones tropicales. La pulpa de café, por su composición química y contenido de nutrimentos, se ha sugerido como un alimento adecuado para alimentación animal sobre todo para rumiantes, dado su contenido de fibra (Cabezas et al., 1977). Sin embargo también se han reportado efectos adversos en animales alimentados con raciones que contienen pulpa de café, debido a la presencia de sustancias con actividad antifisiológica como son: cafeína, fenoles libres y taninos entre otros.

Se ha comprobado que estas sustancias producen efectos negativos en el metabolismo de diversas especies de animales monogástricos de tal manera que la alimentación de porcinos (Jarquin, 1974), de aves (Bressani et al., 1973) y peces (Christensen, 1981) se ha limitado a dosis de pulpa de café menores de 16%, 10% y 30% respectivamente para obtener buenos resultados.

Los estudios realizados por Cabezas et al. (1977), demostraron los efectos del ácido tánico y la cafeína en el consumo y rendimiento de terneros alimentados con raciones conteniendo esta sustancias en cantidades equivalentes a las suministradas por la pulpa de café en dosis mayores de 20%. Estos autores encontraron que el ácido tánico por sí solo en concentraciones de 0.75-1.25%, no afectaron el rendimiento de los animales, mientras que la cafeína en niveles mayores de 0.12% si produjo una disminución significativa en su crecimiento, como respuesta a un menor consumo del alimento.

La ingestión combinada de ambos compuestos ocasionó efectos más severos en los animales, los que se incrementaron a medida que se aumentaron las dosis de cafeína. Estos estudios demostraron la importancia de estas sustancias como factores condicionantes del valor nutritivo de la pulpa de café, determinándose que los rumiantes sólo pueden tolerar hasta 0.28 g/Kg de taninos y 4.5 g/Kg de cafeína por día, equivalente a una dosis de 27.9% de pulpa de café en la ración.

Por otro lado Cabezas et al. (1974), reportaron que la acción negativa de la cafeína y taninos se encuentra relacionada con una alteración de la disponibilidad y utilización de los nutrimentos de la pulpa de café, específicamente de las proteínas, dado que observaron descensos significativos en el porcentaje de nitrógeno retenido y un aumento considerable de orina excretada en los animales alimentados con la pulpa, lo cual aumentaba las pérdidas de nitrógeno por esta vía.

Bellet et al. (1965) y Hawkins y Davis (1970), demostraron una acción lipolítica debido al consumo de niveles elevados de cafeína, lo cual explicó los incrementos en ácidos grasos libres que Braham et al. (1973) observaron en terneros alimentados con pulpa de café.

3.7.6. Producción de hongos comestibles

Los hongos comestibles, son macromicetos que desempeñan un papel muy importante en los procesos de degradación de residuos vegetales en la naturaleza por su gran capacidad lignocelulósica y existe una gran variedad de especies que pueden crecer sobre diversos residuos agrícolas, lo cual ha sido aprovechado para la producción comercial de algunas especies, siendo los del género *Pleurotus*, uno de los más ampliamente estudiados en diversas partes del mundo.

En México, Martínez-Carrera et al., (1985) han realizado trabajos sobre el cultivo de *P. ostreatus* en pulpa de café y mezclas de ésta con paja de cebada (2:1) probando diferentes periodos de fermentación. Estos autores encontraron que cinco días de fermentación son suficientes para obtener una buena colonización del sustrato y posterior producción de cuerpos fructíferos con eficiencias biológicas de 102.68%.

Con esta tecnología, se construyó en Xalapa, Ver. una planta para cultivo masivo de *P. ostreatus* a nivel semiindustrial con capacidad de trabajar una tonelada/día de pulpa de café con una producción aproximada de 150 Kg de hongos frescos, equivalentes a 4.5 ton/mes (Guzmán y Martínez-Carrera, 1985).

Finalmente, De León-Chocooj et al. (1987), han trabajado en el cultivo de *Volvariella bakeri* (Murr.) en pulpa de café, pero aún no han logrado obtener cuerpos fructíferos.

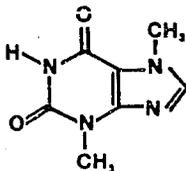
IV. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado anteriormente, la limitante principal del uso de la pulpa de café en la alimentación de animales ruminantes radica en el efecto tóxico asociado principalmente a la presencia de cafeína, taninos y fenoles libres, así como también a elevados niveles de potasio (Bressani, 1979). Por este motivo, diversos autores han tratado de encontrar un método práctico y de bajo costo que reduzca los efectos adversos mediante la eliminación de algunos de los factores antifisiológicos antes mencionados. En la presente revisión se consideró principalmente la cafeína, reportado como uno de los principales factores condicionantes del valor nutritivo de la pulpa de café (Cabezas et al., 1977).

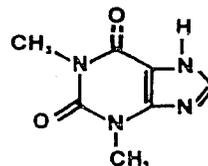
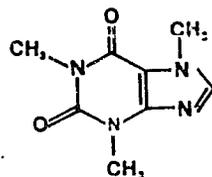
4.1. LA CAFEINA: QUIMICA Y DISTRIBUCION

La cafeína, conocida también como teína (1,3,7 trimetil-xantina, $C_8H_{10}N_4O_2$, P.M. 194.2) es un alcaloide, sustancia cristalina, sin aroma, de sabor ligeramente amargo, que junto con otras xantinas metiladas, como la teofilina y teobromina (fig. 6), se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en cantidades importantes en tejidos de un gran número y variedad de plantas que se utilizan en la preparación de bebidas además del café, tales como la cocoa y el té (Suzuki y Waller, 1988).

TEOBROMINA
(1,7 dimetil xantina)



TEOFILINA
(1,3 dimetil xantina)



CAFEINA
(1,3,7 trimetil xantina)

Figura 6. Estructura química de metil xantinas distribuidas en la naturaleza.

4.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA CAFEÍNA

En humanos, la cafeína actúa como estimulante, disminuye la somnolencia y sensación de fatiga, aumenta la sensación de bienestar y euforia, produciendo vasodilatación que facilita el trabajo mental y muscular. Sin embargo cuando se ingiere en grandes cantidades puede causar ansiedad, insomnio, cefalea, arritmias, vómitos y confusión mental (IFT, 1983).

Estudios realizados por Flores (1973), demostraron que el consumo por ruminantes de grandes cantidades de pulpa de café, provoca una serie de trastornos fisiológicos como son: timpanismo, inflamación de las extremidades, caída del pelo y aparición de llagas o úlceras en la piel además de baja en su rendimiento.

4.3. EFECTOS DE LA CAFEÍNA A NIVEL MOLECULAR

Putrament et al. (1972), reportaron que la cafeína en concentraciones mayores de 0.1% inhibe reversiblemente el crecimiento de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* bloqueando la síntesis de RNA y proteínas en pocos minutos. Otros investigadores (Harm, 1967; Kuhlmann et al., 1968; Doman et al., 1970) indican que la cafeína tiene un efecto mutagénico y un efecto sinérgico con otros mutágenos para los microorganismos y células humanas.

La explicación de tales efectos, aunque con ciertas contradicciones se relaciona con la facilidad con que la cafeína se une a purinas libres y se acopla con ácidos nucleicos de cadena sencilla por inserción o intercalación, lo cual causa inhibición de la síntesis de proteínas y de los procesos de reparación del DNA irradiado con luz ultravioleta.

Blum, 1971 relaciona la toxicidad de la cafeína en animales con la inhibición de enzimas de tipo fosfodiesterasas del AMP cíclico. A este mismo efecto se atribuye la sensibilidad a la cafeína en bacterias, dado que estas enzimas también intervienen en la regulación de su metabolismo (Aboud y Burguer, 1971).

4.4. ELIMINACIÓN DE CAFEÍNA DE LA PULPA DE CAFÉ

En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de disminuir o eliminar los compuestos tóxicos de la pulpa de café, para poder utilizarla eficientemente en la alimentación animal. Entre estos se proponen algunos métodos físicos, químicos y biológicos.

4.4.1. Métodos físicos y químicos

Entre los tratamientos físicos o químicos que se han propuesto están los siguientes: deshidratación, extracción con diversos solventes, maceración o cocción con ácidos o álcalis y por tratamientos químicos con hidróxido de calcio y metabisulfito de sodio, (Bressani et al., 1972). Sin embargo, se ha encontrado que la aplicación de estos métodos para la descafeinización de la pulpa de café, resultaron ser de costo elevado o poco eficientes, lo que hace necesario mayores investigaciones (Gómez, 1978; Molina et al., 1974).

4.4.2. Métodos biológicos

Recientemente los métodos biológicos de eliminación de sustancias de naturaleza compleja o tóxicas por degradación microbiana han atraído el interés de diversos investigadores como una alternativa interesante desde el punto de vista ecológico, lo cual ha dado lugar a la proposición de diversas opciones que se exponen enseguida.

4.4.2.1. Ensilado de la pulpa de café

Murillo (1979), reportó que el ensilaje de pulpa de café da como resultado una disminución importante en el contenido de taninos y cafeína, tal como se muestra en la tabla VIII. Sin embargo, se propuso que es debido a su solubilización y pérdida en los líquidos de drenado más que a una actividad microbiana sobre ellas.

Tabla VIII. Efecto del ensilado en foso sobre la composición química de la pulpa de café (g % en materia seca) (Murillo, 1979).

	Pulpa original	Pulpa ensilada
Materia seca	17.4	19.7
Paredes celulares	48.0	55.2
Proteína cruda	12.2	13.9
Proteína lignificada	4.5	6.1
Cafeína	0.9	0.6
Taninos	1.6	1.3
Digestibilidad <i>in vitro</i>	67.8	61.7
pH	5.6	4.2

Con la utilización de pulpa de café ensilada en la alimentación de terneros se ha encontrado que hay una mejor respuesta en cuanto a aumento de peso y eficiencia alimentaria con respecto al uso de la pulpa únicamente deshidratada (Cabezas et al., 1976).

4.4.2.2. Degradación microbiana de la cafeína

Bergmann et al. (1962), reportaron que *Pseudomonas aeruginosa*, involucra en su metabolismo un sistema enzimático para la oxidación de metil purinas, constituido por una metil xantina deshidrogenasa y una uricasa, enzimas con alta especificidad para degradar metil xantinas a metil alantoinas.

Kurtzmann y Schwimmer (1971), reportaron que la cafeína y la teobromina pueden ser utilizadas como únicas fuentes de nitrógeno para el cultivo de *Bacillus coagulans*, *Penicillium roquefortii* y *Stemphylium sp.*, metabolizándolas rápidamente (13.3 micromoles/hora) por lo que propusieron el uso de estos microorganismos en la descafeinización del café.

Schwimmer y Kurtzmann (1971), realizaron investigaciones con metil xantinas marcadas radioactivamente para determinar la vía metabólica de degradación en *P. roquefortii*, observando que después de 6 horas de incubación, aparecía teofilina radioactiva, por lo que sugirieron que la primera etapa de degradación de las metil xantinas probadas es una desmetilación en la posición 7 a diferencia de la vía metabólica que siguen en el hombre, donde los grupos metilo de posiciones 1 y 3 son primeramente hidrolizados.

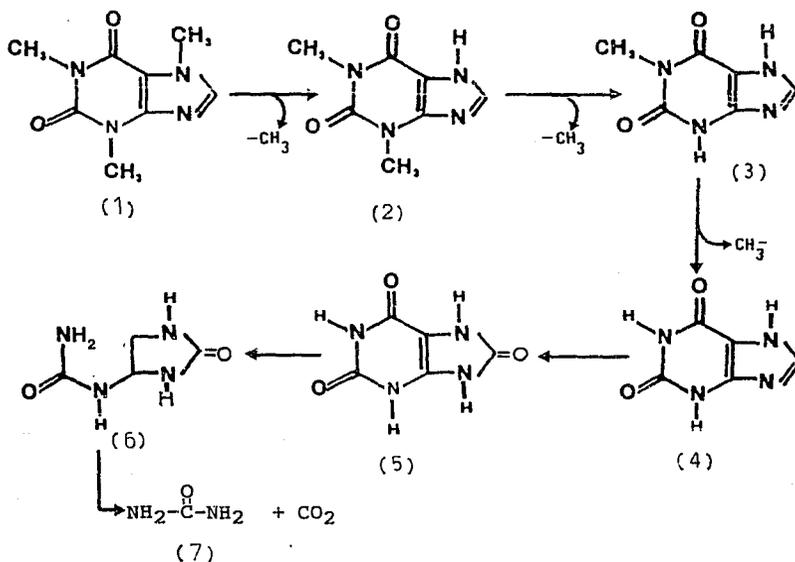
En 1972, Schwimmer y Kurtzmann reportaron el crecimiento de *Stemphylium sp.* y *P. roquefortii* en medios de cultivo con saca rosa 0.08 M, sales minerales y cantidades variables de cafeína (0.01-0.1 M) como única fuente de nitrógeno, a 20 °C durante 10 días de cultivo. Encontraron que ambos hongos pudieron crecer hasta concentraciones de cafeína 0.04 M; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron en niveles 0.01 M, con rendimientos equivalentes a los obtenidos con nitratos 0.03 M, demostrándose así la utilización efectiva de la cafeína como fuente de nitrógeno.

Woolfolk (1975), reportó el metabolismo de diversas n-metil purinas en *Pseudomonas putida* aislada sobre cafeína 0.025 M, como única fuente de nitrógeno; observó que este microorganismo es capaz de metabolizar cualquier n-metil derivado de xantinas con grupos metilo en las posiciones 1, 3 ó 7, iniciándose su degradación por la acción de enzimas hidrolíticas en los grupos metilo, dando lugar a la formación de metanol y xantina libre. Posteriormente, el metanol es metabolizado hasta CO₂ por las formaldehído y formato deshidrogenasas y sobre la xantina libre actúan la xantina

deshidrogenasa que libera ácido úrico el cual por la acción de la uricasa produce ácido alantoico que finalmente se descompone en urea y CO_2 , proponiendo el mecanismo de degradación de la cafeína que se muestra en la fig. 7.

En 1976, Hass y Stieglitz reportaron pruebas positivas de eliminación de la cafeína con el uso de un extracto enzimático inmovilizado de *P. putida* cultivada en medios con cafeína como única fuente de nitrógeno.

Middelhoven y Bakker (1982), propusieron el uso de células completas de *P. putida* inmovilizadas y cultivadas previamente en medios de cultivo con cafeína (0.01 M) para eliminar esta sustancia en extractos de café.



- | | |
|--------------------|------------------------------|
| 1) Cafeína | 5) Acido úrico |
| 2) Teofilina | 6) Acido alantoico |
| 3) 1 Metil xantina | 7) Urea y dióxido de carbono |
| 4) Xantina | |

Figura 7. Mecanismo bioquímico de la degradación de cafeína (Woolfolk, 1975).

En los estudios realizados por Blecher y Lingens (1977), demostraron que las bacterias que metabolizan la cafeína, lo hacen preferentemente vía teobromina a diferencia de los hongos, que lo hacen por vía teofilina tal como lo habían reportado Kurtzmann y Schwimmer, (1971). Esto implica que existen diferentes tipos de enzimas en los microorganismos que poseen la capacidad de degradar la cafeína, lo cual también coincide con el reporte de Gluck y Lingens (1988).

Finalmente, Peñaloza et al. (1985), Guzmán (1983) y Aguilar (1983) reportaron estudios de fermentación sólida de la pulpa de café con *Aspergillus niger*, realizados con el fin de evaluar el posible mejoramiento de su valor nutritivo como alimento para animales. En estos trabajos se determinaron incrementos en el contenido de cafeína y aminoácidos totales del sustrato fermentado, esto se relaciona con la pérdida de materia seca y a la complementación nitrogenada con urea y sulfato de amonio por lo que el microorganismo tuvo suficiente cantidad de nutrientes disponibles e hizo innecesaria la degradación de cafeína.

Rolz et al. (1988), reportaron el cultivo de 26 cepas de hongos superiores sobre pulpa de café ensilada previamente y pulpa de café únicamente prensada, observando que la mayoría de las cepas redujeron significativamente el contenido de cafeína y polifenoles del sustrato. Los mejores resultados de eliminación de cafeína se obtuvieron con *Dichomitus squalens*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Stropharia rugosoannulata* con valores de 74.3%, 61.5% y 58.8% respectivamente.

En 1988, Rolz reportó trabajos de fermentación sólida de pulpa de café sin complementación nitrogenada con *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Sporotrichum pulverulentum* demostrando que había una eliminación efectiva de la cafeína del sustrato al final de la fermentación en niveles de 13.2% a 46% , con aumentos en el contenido de proteínas de 19.7% a 23%. Por lo anterior este autor indicó que este proceso también podría ser una alternativa de eliminación biológica de la cafeína de la pulpa de café.

4.5. LOS HONGOS

Los hongos, son organismos eucariotes que crecen como células individuales en el caso de levaduras o como filamentos conocidos como hifas, las que presentan crecimiento apical, con paredes tubulares rígidas constituidas por celulosa o quitina. Son heterótrofos, absorben sus nutrientes a través de su pared celular y secretan una gran variedad de enzimas extracelulares para degradar sustancias complejas que pueden así metabolizar; presentan ciclos de vida únicos ya que el holomorfo u organismo completo consta de un estado teleomórfico de reproducción sexual y un estado anamórfico de reproducción asexual.

4.5.1. Clasificación general

La posición taxonómica de los hongos con respecto a otros organismos es un tema de gran controversia; tradicionalmente se les había considerado como un sub-reino del Reino Vegetal, sin embargo actualmente ya existen suficientes bases firmes para incluirlos en un reino aparte, el Reino Fungi (Arx, 1974).

Para su clasificación, se considera universalmente aceptado el sistema propuesto por Ainsworth (1973) que es uno de los más ampliamente utilizados (Anexo I.), a partir del cual se han propuesto otros esquemas como el de Ulloa y Hanlin (1978). Estos autores incluyen la clase Protosteliomycetes en la división Myxomycota, y la separación de líquenes en una división propia, los que se ubicaban anteriormente en la subdivisión Ascomycotina.

4.5.2. Criterios de identificación

La identificación de hongos se realiza principalmente por la determinación de caracteres microscópicos del cultivo y morfológicos de las colonias, raramente se determinan sus propiedades bioquímicas, por lo que generalmente se preparan cultivos en medios estandar incubados en condiciones que favorezcan tanto su crecimiento como la expresión correcta de sus características morfológicas típicas sobre todo en las estructuras de reproducción.

4.5.2.1. Características macroscópicas

La determinación de estas características se lleva a cabo en cultivos frescos obtenidos en cajas Petri con medios de cultivo de uso común para este objetivo tales como Agar extracto de malta, Agar de papa y dextrosa y Czapek-Dox entre otros. Se considera que entre las características más importantes que pueden determinarse para lograr la identificación adecuada de estos microorganismos son:

- textura del talo (aterciopelado, lanoso, polvoso, etc.)
- color del talo (pigmentación del micelio y conidios)
- color al reverso de las colonias y presencia de pigmentos difusibles
- olor
- presencia de exudados en la superficie de las colonias
- velocidad de crecimiento

4.5.2.2. Características microscópicas

La observación de estas características se lleva a cabo en preparaciones en portaobjetos, obtenidas directamente de muestras de micelio de las colonias con líquidos de montaje como lactofenol o solución de KOH.

También se pueden hacer preparaciones con colorantes especiales como azul de algodón (cotton blue) que facilitan la localización y reconocimiento de estructuras. Las observaciones al microscopio se llevan a cabo utilizando por lo general los objetivos 10X y 40X, las principales características que se deben determinar son entre otras las que a continuación se mencionan.

- Caracterización del micelio, para esto se examina la presencia o ausencia de divisiones o septos, color, ornamentación de paredes, tamaño y modo de ramificación.

- Localización de estructuras diferenciadas tales como: cigosporas, apotecios, cleistotecios, peritecios, esporocistos, acérvulos, picnidios, esporodoquios, coremios, conidios y esclerocios entre otros.

- Caracterización de estructuras diferenciadas en cuanto a la forma, color, dimensiones, textura de las paredes y ornamentación.

- Estudio biométrico, en particular de valores extremos y medios de micelio y estructuras diferenciadas.

Una vez que se recopilan todos los datos, se comparan con la literatura especializada para lograr la identificación y de ser posible se comparan con microorganismos de referencia provenientes de colecciones internacionales (Arx, 1974).

4.5.3. Fisiología y bioquímica

Debido a la naturaleza saprobia de la mayoría de hongos, muchos de éstos presentan una gran versatilidad fisiológica que les permite sobrevivir aún en condiciones extremas y limitadas para otro tipo de microorganismos. Por ejemplo, tienen la capacidad de producir gran cantidad de esporas que se liberan y dispersan con gran eficiencia, las cuales germinarán cuando las condiciones se tornen favorables de tal manera que prácticamente cualquier *habitat* es susceptible de ser colonizado por estos organismos.

Desde la antigüedad, el hombre ha obtenido grandes beneficios mediante la utilización de estos microorganismos, sobre todo en el Oriente, donde la producción de alimentos fermentados es una práctica ancestral. Su gran habilidad para utilizar diversos sustratos y su amplias capacidades enzimáticas a nivel extracelular han atraído el interés de un gran número de investigadores (Hesseltine, 1965) ya que se han reportado importantes logros en el enriquecimiento proteico de residuos de naturaleza amilácea (Raimbault, 1980) y en la producción de amilasas (Naharara et al., 1982), beta glucosidasas (Deschamps y Huet, 1984), celulasas (Roussos, 1985), pectinasas (Trejo, 1986) y metabolitos primarios (Botton et al., 1985) y secundarios (Barrios et al., 1988).

V. MATERIAL Y METODOS

En este trabajo, se proponen una serie de metodologías que pueden aplicarse para la búsqueda de hongos filamentosos con capacidades específicas para transformar sustratos o eliminar compuestos tóxicos a partir de muestras obtenidas en un ecosistema natural. En este caso, se establecieron para la obtención de una colección de hongos filamentosos que puedan degradar la cafeína (cafeinoclasticos) de la pulpa de café, con el fin de utilizarlos posteriormente en procesos de fermentación sólida y de esta manera, resolver los problemas de toxicidad en animales alimentados con este residuo.

5.1. COLECTA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS

La colecta de muestras se llevó a cabo directamente de los sitios de producción de café, es decir de zonas cafetaleras basándose en el hecho de que los microorganismos responden o se adaptan específicamente a los factores ambientales que les rodean, es decir si éstos se encuentran en presencia de sustancias de composición química compleja, entonces producirán los sistemas enzimáticos necesarios para degradarlas a formas simples, que posteriormente puedan asimilar y metabolizar.

5.1.1. Origen de las muestras

El muestreo se hizo en algunos de los beneficios ubicados en las zonas cafetaleras de Xico y Coatepec en Xalapa, Estado de Veracruz y en las de Soconusco, Chiapas. Las muestras seleccionadas fueron de naturaleza diversa y de diferentes sitios del beneficio, principalmente muestras de pulpa de café en descomposición evidente o con crecimiento micelial.

Las muestras se guardaron en bolsas de plástico limpias, que se sellaron, etiquetaron y posteriormente se trasladaron al laboratorio en donde se conservaron en refrigeración hasta el momento de análisis, tal como se muestra en la fig. 8.

5.1.2. Composición de los medios de cultivo

Con el fin de hacer un mejor aislamiento, los medios de cultivo se diseñaron a partir de un medio basal de sales minerales en donde se incluyen fosfatos, calcio y magnesio principalmente. Este medio se complementó con extractos de café granulado comercial de Coatepec o de pulpa seca y molida (malla 30-50) con el fin de que los microorganismos puedan utilizar la cafeína presente en estos sustratos para obtener el nitrógeno y carbono necesarios para su crecimiento. La forma de preparación y composición química de los medios de cultivo, se muestran en la tabla IX.

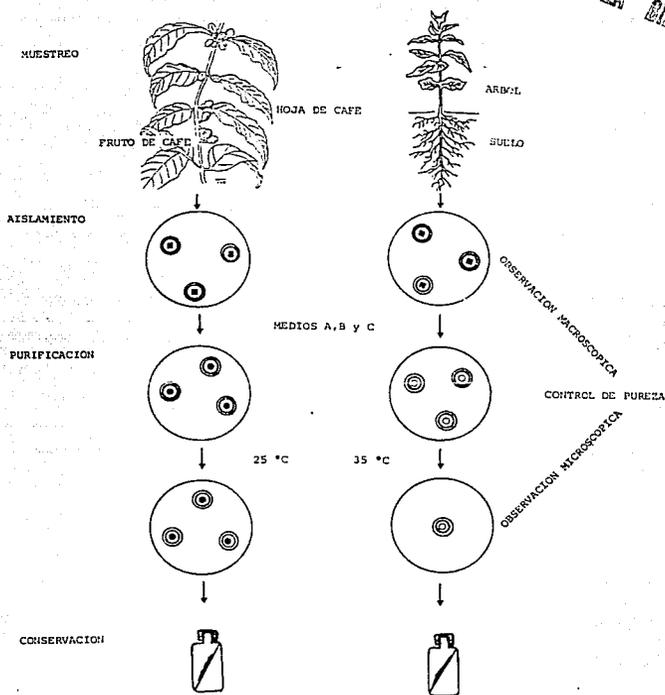


Figura 8. Esquema de la estrategia de muestreo, aislamiento, purificación y conservación de hongos filamentosos con capacidad de degradar la cafeína.

5.1.3. Método de siembra y condiciones de cultivo

Se prepararon cajas de Petri con medios de cultivo (A, B y C), en las que se depositaron 2-3 fragmentos de las muestras colectadas. Una serie de cajas se incubaron a 25°C y otra a 35°C durante 48-72 horas, después de este periodo se observaron las cajas para localizar los diferentes tipos de colonias a las que se les asignó el número y nomenclatura de acuerdo a criterios preestablecidos.

5.1.4. Nomenclatura y enumeración de los aislamientos

Para localizar y manipular en forma rápida y práctica los aislamientos obtenidos, se establecieron los siguientes criterios:

- a) Letra C (Chiapas) o V (Veracruz), que indican el sitio del cual se obtuvieron.
- b) Número de muestra, que les corresponde según el orden de colecta.
- c) Letras A, B o C, que indican el medio de cultivo en que se obtuvo el aislamiento.
- d) Número 25 o 35, correspondiente a la temperatura de incubación en que se obtuvieron los cultivos.

Tabla IX. Composición química de medios de cultivo para aislamiento, purificación y selección de cepas de hongos filamentosos con capacidad para degradar cafeína

Compuestos	Medios (g/l)			
	A	B	C	D
KH ₂ PO ₄	1.30	1.30	1.30	1.30
Na ₂ HPO ₄	0.12	0.12	0.12	0.12
MgSO ₄	0.30	0.30	0.30	0.30
CaCl ₂	0.30	0.30	0.30	0.30
Sacarosa	--	5.00	--	5.00
Cafeína	--	--	--	1.20
Café ¹	40.00	40.00	--	--
Pulpa de café ¹	--	--	40.00	--
Estreptomicina ³	0.03	0.03	0.03	--
Agar	15.00	15.00	15.00	15.00

1. Se prepara primero el medio mineral y posteriormente se agrega el café o la pulpa, se ajusta el pH y se hierve durante 5 min, enseguida se filtra y se ajusta el volumen para finalmente agregar el agar.

2. Esterilizar en autoclave durante 30 min a 121 °C.

3. Dejar enfriar a 40 °C y agregarla como solución estéril obtenida por filtración en Millipore 0.25 micras.

5.2. PURIFICACION Y CONSERVACION DE CULTIVOS

La obtención de cultivos puros de hongos filamentosos, se hizo por resiembras sucesivas en los mismos medios de aislamiento según fue necesario; para esto se tomaron con el asa de siembra pequeños fragmentos de micelio, de preferencia de la periferia de las colonias. Los cultivos se incubaron a la temperatura de aislamiento correspondiente durante 48-72 horas.

Posteriormente, se hicieron observaciones directas de las colonias para determinar sus características morfológicas (forma, color, aspecto, producción de exudados y pigmentos). También se procedió a realizar observaciones microscópicas de los cultivos para lo cual se prepararon muestras de micelio en portaobjetos con una gota de solución de lactofenol de Amman, cuya composición se muestra en la tabla X. En las preparaciones se localizaron micelio, esporas y estructuras de reproducción, utilizando los objetivos de 10X y 40X.

Para la conservación de cepas, se hicieron siembras en frascos inclinados con medio de aislamiento. Se prepararon frascos de tapón de rosca (20 ml) con 7 ml de medio (A, B o C), sin estreptomycin. Una vez inoculados con fragmentos de micelio o esporas, los frascos se incubaron a la temperatura correspondiente de aislamiento durante 72-96 horas para finalmente mantenerse en refrigeración (4 °C) durante 4-6 meses.

Tabla X. Composición química de lactofenol de Amman, para la observación de hongos (Botton *et al.*, 1985)

	(g)
Fenol	20.00
Acido láctico	20.00
Glicerol	40.00
Agua	20.00
Azul de anilina o	
Azul de algodón	0.05

5.3 DESCRIPCION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

Para efectuar la descripción e identificación de las cepas, se hicieron cultivos de cada una de los aislamientos en un medio de cultivo estandar, para obtener la expresión típica de sus características morfológicas. Posteriormente, los datos obtenidos se compararon con los de la literatura especializada (Raper y Fennell, 1965; Barnett y Hunter, 1972; Ainsworth, 1973; Arx, 1974; Alexopoulos y Mims, 1979).

5.3.1. Medio de cultivo estándar

El medio de cultivo estándar para la descripción e identificación fue Agar de papa y dextrosa (PDA) marca DIFCO, que se preparó siguiendo el instructivo del producto.

5.3.2. Métodos y condiciones de cultivo

Para observar las características macroscópicas de los cultivos, se hicieron siembras superficiales en cajas de Petri, en tres puntos de la misma, en el caso de hongos de crecimiento lento (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) o en el centro cuando se trató de hongos de crecimiento rápido (*Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*).

Como en los procedimientos de purificación y conservación, los cultivos se incubaron a las temperaturas de aislamiento durante 48-72 horas para hongos de crecimiento rápido o 5 días para los de crecimiento lento.

La caracterización del micelio y observación de las estructuras de reproducción de los cultivos, se hizo en preparaciones obtenidas por la técnica de microcultivo (Riddell, 1950) que se realizó como sigue:

Se esterilizaron cajas de Petri, con una varilla de vidrio doblada en "V", un portaobjetos y un cubreobjetos limpios a 121 °C durante 15 min. Enseguida se colocaron sobre los portaobjetos un pequeño cubo (1x1 cm) de PDA en condiciones estériles. La inoculación de las cepas se hizo en cada uno de los cubitos colocando un fragmento de micelio o esporas en cada una de sus caras laterales, después se cubrieron con los cubreobjetos y se agregaron 15-20 ml de agua glicerinada al 5% estéril. Las cajas se incubaron a temperatura de aislamiento durante 48-72 horas.

Después del periodo de incubación se eliminó el bloque de agar y las preparaciones obtenidas tanto del portaobjeto como del cubreobjeto se fijaron agregando gotas de alcohol metílico absoluto que se dejaron secar al aire para finalmente montarse con una gota de lactofenol de Amman. Las observaciones se hicieron en el microscopio óptico con objetivos de 10X y 40X y sólo en caso necesario con el 100X.

5.4. SELECCION DE CEPAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR LA CAFEINA

La selección de las cepas cafeinoclásticas de mayor eficiencia, se realizó en dos etapas; para la primera se preparó un medio de cultivo sólido a base de sales minerales con cafeína pura (SIGMA) como única fuente de nitrógeno, en concentración equivalente a la que se obtiene al hacer una infusión de 40 g/l de café de grano, que se utilizó en la preparación de los medios de aislamiento (Medio D, tabla IX).

La selección primaria tuvo como objetivo el de proporcionar a los microorganismos las condiciones para poner de manifiesto en forma rápida a los que pudiesen degradar la cafeína. De esta manera únicamente las cepas que presentaron la actividad cafeinoclástica en estas condiciones se probaron para la selección secundaria. En la fig. 9 se resumen la metodología de selección de cepas y evaluación de parámetros.

5.4.1. Medios y condiciones de cultivo para la selección primaria

Se prepararon cajas de Petri con 20-30 ml de medio de cultivo D, en donde se inocularon superficialmente fragmentos de micelio o esporas de las cepas puras por duplicado, las que se incubaron durante 72-96 horas a la temperatura de aislamiento correspondiente.

La evaluación de esta prueba sólo se hizo cualitativamente, observando directamente si había crecimiento o no, por el hecho de que se trabajaron un gran número de cepas, situación que hacía poco práctico otro tipo de evaluación.

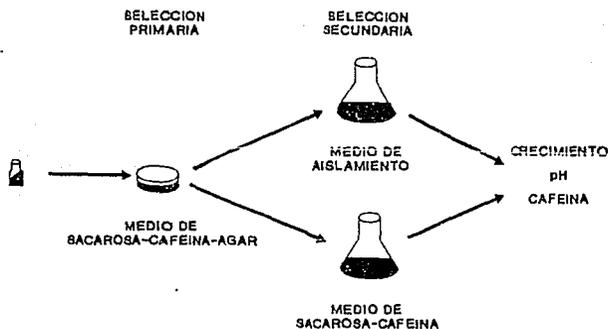


Figura 9. Esquema de la selección de hongos filamentosos con capacidad de degradar la cafeína (cafeinoclásticos).

5.4.2. Medios y condiciones de cultivo para la selección secundaria

En esta selección, se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de los medios de cultivo de la tabla IX, pero sin agar ni esptretomicina, los que se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Cada una de las cepas seleccionadas en la anterior prueba se inocularon por duplicado en el medio D y en el medio de aislamiento correspondiente. Los cultivos se incubaron en baño María con agitación constante (150 rpm) durante 72 horas a la temperatura de aislamiento.

5.4.2.1. Evaluación de parámetros y análisis

En base a la investigación bibliográfica realizada, se encontró que los parámetros más indicativos de la actividad de degradación de la cafeína propuestos son: el crecimiento, el % de degradación de la cafeína y el pH final del cultivo.

El crecimiento fungal se evaluó cualitativamente, por el hecho de que se observó en un gran número de cultivos líquidos en medios de aislamiento la formación de aglomerados de micelio que incluían gran cantidad de precipitados o fragmentos de pulpa de café por lo que las evaluaciones específicas del crecimiento mediante peso seco o proteínas fueron poco reproducibles y confiables.

Se hicieron únicamente observaciones de la forma y abundancia del crecimiento micelial determinándose si se trataba de micelio difuso o en forma de aglomerados (pellets) asignándoseles valores (+ a +++) de acuerdo a la cantidad de aglomerados o a la densidad del cultivo.

Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm separándose el sobrenadante en donde se determinaron el pH en un potenciómetro (Titriskop Metrhom Herisau) y el contenido de cafeína por el método de Ishler et al. (1948), por su absorción característica a 272 nm.

5.5. ESTUDIO FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Los estudios realizados, fueron los que de acuerdo a la literatura, son necesarios para conocer las posibilidades de utilización de hongos filamentosos en procesos de fermentación en medio sólido, siguiendo el esquema propuesto en la fig 10.

Cada una de las pruebas se hicieron por duplicado, con las cepas seleccionadas por su habilidad para degradar la cafeína en las condiciones establecidas, utilizándose inóculos homogéneos de cada una de las cepas en forma de suspensión de esporas de concentración conocida.

5.5.1. Preparación de inóculos

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio PDA, que se esterilizaron a 121 °C durante 30 min. Cuando la temperatura del medio llega a 40 °C aproximadamente se inocularon con fragmentos de micelio o esporas de cada una de las cepas a estudiar, enseguida se homogeneizaron cuidadosamente por movimientos rotatorios. Una vez que se solidificó el medio se incubaron durante 7 días a 25 °C o a 35 °C según su temperatura de aislamiento.

La recuperación de esporas se hizo agregando 100 ml de agua con 0.1 ml de tween 80 estéril a los matraces, los que se colocaron en un agitador magnético durante 10 min. De esta suspensión, se tomó un ml para preparar las diluciones necesarias para obtener de 30-60 esporas por unidad de cuenta en una cámara hemocitométrica o de tipo Malassez (Roussos, 1985).

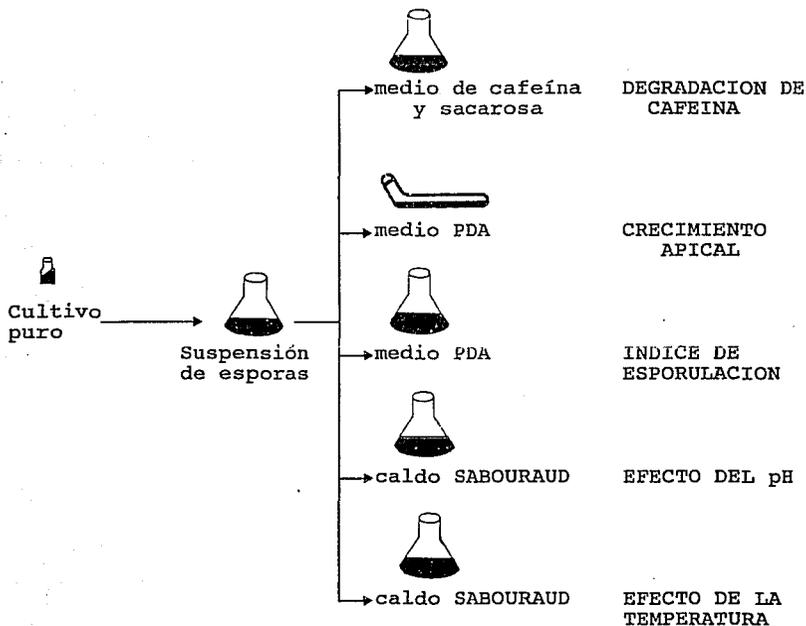


Figura 10. Esquema de caracterización fisiológica y bioquímica de hongos cafeinoclásticos

Los cálculos del número de esporas por ml se obtuvieron mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$N = (n) (F) (10^5)$$

en donde:

N = número de esporas/ml en la suspensión

n = número promedio de esporas/celda

F = factor de dilución (1/dilución)

5.5.2. Tasa de degradación de la cafeína

Para esta determinación se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo líquido D, se esterilizaron e inocularon con 3×10^7 esporas/g de sustrato carbonado de cada una de las cepas de acuerdo a los estudios de FMS de Roussos y Raimbault (1982). Los matraces se incubaron en agitación constante a 150 rpm durante 72 horas a 25 °C o 35 °C según su temperatura de aislamiento.

Después del periodo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm y en el sobrenadante se cuantificó la cafeína en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando columnas BONDAPAK C18 de 30 cm y una mezcla de metanol-agua (1:1) con 1% de ácido acético como fase móvil tal como se indica en el método de Smyly et al., 1976. Como estándar se preparó una solución de cafeína SIGMA (0.1 mg/ml); los resultados se expresaron en mg/ml/día de cafeína.

5.5.3. Crecimiento apical

Dado que se considera que una de las características estables de los hongos es el crecimiento apical, que se define como su capacidad para colonizar una superficie sólida (Smith y Berry, 1975) es de gran importancia su determinación.

Se utilizaron tubos especiales (Ryan et al., 1943) con 20 ml de medio de cultivo PDA esterilizados a 121 °C por 30 min que se dejaron solidificar en forma inclinada. La inoculación se realizó colocando 0.1 ml de una suspensión conteniendo 1×10^7 esporas/ml en la entrada del tubo, después se incubaron durante 7 días a la temperatura de aislamiento; se midió diariamente el crecimiento miceliar en mm/h.

5.5.4. Índice de esporulación

Según Roussos (1985), el índice de esporulación se define como la cantidad de esporas producidas por gramo de sustrato carbonado y su determinación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 20 ml de medio PDA, los que después de esterilizar a 121 °C durante 30 min se inocularon con 3×10^7 esporas de la cepa de estudio cuando la temperatura alcanzó los 40 °C. La metodología seguida fue la descrita en la preparación de los inóculos.

5.5.5. Efecto del pH del medio

El estudio que se hizo fue únicamente con el fin de observar el efecto cualitativo de cuatro valores dentro del rango fisiológico de actividad microbiana, dado que la FMS generalmente se trabaja en el intervalo de 4-6, condiciones en las que el desarrollo bacteriano se ve reducido, lo cual permitirá un adecuado establecimiento y predominio del hongo inoculado.

Se ha determinado que el comportamiento de los hongos en medios líquidos no siempre coincide con el que presentan en condiciones de FMS, por lo que el estudio mas fino y preciso del efecto de este factor se hizo al mismo tiempo, en otro trabajo de investigación (Nava, 1990).

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio líquido de dextrosa Sabouraud comercial (DIFCO) que se preparó de acuerdo a las indicaciones del producto y después se ajustaron a valores de pH de 2, 4, 6 y 8. Posteriormente se esterilizaron e inocularon con 3×10^7 esporas de la cepa de estudio por gramo de sustrato carbonado inicial. La incubación se hizo en las condiciones ya explicadas anteriormente.

La evaluación de este experimento fue sólo cualitativo por las razones antes aclaradas, el crecimiento se evaluó de (+ a +++) según la densidad de cultivo observada.

5.5.6. Efecto de la temperatura de incubación

Este estudio se llevó a cabo basandose en la misma justificación, en iguales condiciones y criterios de evaluación semejantes que en el experimento anterior, para lo cual se prepararon matraces Erlenmeyer con medio líquido de Sabouraud ajustado a pH 5.6.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

La biotecnología contempla la posibilidad de aprovechar las capacidades de los microorganismos que se encuentran en la naturaleza, con el fin de producir compuestos específicos o de obtener transformaciones de sustratos como son el enriquecimiento proteico y/o eliminación de factores tóxicos que limiten su utilización. Este trabajo experimental consiste en la obtención de una colección de hongos filamentosos con capacidad de eliminar la cafeína en medios de cultivo preparados a base de esta sustancia, mediante una estrategia de aislamiento, purificación, conservación, identificación y selección de cepas, con los resultados que se presentan enseguida.

6.1. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CONSERVACION DE CULTIVOS

Se colectaron un total de 30 muestras de naturaleza diversa, 16 del Estado de Veracruz y 14 de Chiapas. El origen preciso de las muestras obtenidas de Veracruz se presenta en la tabla XI, sin embargo para las de Chiapas no se dispuso de esta información por extravío de la misma.

De cada muestra, se trabajaron por lo menos 4 submuestras, dependiendo de la abundancia de microbiota nativa aparente o del grado de descomposición que presentaban, obteniéndose en total 500 cultivos. Durante el proceso de aislamiento se observó un abundante desarrollo de hongos filamentosos sobre todo en las cajas con medio de pulpa de café (C), situación que dificultó un poco su separación, probablemente debido a la mayor disponibilidad de nutrimentos fácilmente asimilables que contiene la pulpa de café, tal como se explicó anteriormente (3.6.), a diferencia de los medios con extracto de café (A y B), en los que se obtuvieron desde el primer aislamiento cultivos casi puros (80% de cepas obtenidas en medio A y 60% de las de B).

La dosis de estreptomycin que se empleó en los medios de aislamiento fue suficiente para inhibir la población bacteriana contaminante de las muestras, únicamente aparecieron algunas levaduras, las que por el método de resiembras sucesivas se eliminaron fácilmente.

Después de 6 meses de trabajo se obtuvo una colección de 272 cultivos puros que se etiquetaron con la clave de identificación correspondiente siguiendo los criterios expuestos en la metodología (5.1.4.). Este método de etiquetar los cultivos resultó muy sencillo y de fácil manejo para el trabajo realizado.

El método de conservación de los aislados fue adecuado para la mayoría de ellos, ya que presentaron un buen crecimiento después de las resiembras periódicas a las que se sometieron;

Tabla XI. Resultados de muestreo, origen y número de aislados de hongos filamentosos obtenidos de Veracruz en medios de cultivo específicos (A, B y C)

Muestra	origen	número de aislados
1-25	Pulpa fresca (PF)	25
26-29	Suelo (S)	4
30-39	Madera (M)	10
40-44	Pared del beneficio (P)	5
45-49	Piso del beneficio (PB)	5
50-58	Grano de café reciente (GR)	9
59-68	Fruto de café fresco (FF)	10
69-75	Grano de café seco (GS)	7
76-79	Grano de café limpio (GL)	4
80-84	Grano de café del suelo (CS)	5
85-89	Fruto de café del árbol (FA)	5
90-93	Naranja al pie del cafeto (NC)	4
94-98	Grano de café en descomposición (GD)	5
99-103	Zona profunda en pila de pulpa (PP)	5
104-113	Superficie de pila de pulpa (SP)	10
114-125	Pulpa de café degradada y seca (PD)	12

sin embargo, se notó una paulatina pérdida en el vigor de crecimiento de las cepas del género *Humicola* y algunas especies de *Fusarium*, lo cual hizo necesario su resiembra en medios estándar, como PDA y extracto de malta agar para su recuperación y mejor conservación.

6.2. DESCRIPCION E IDENTIFICACION DE CEPAS

La identificación de cepas se realizó por medio de observaciones macroscópicas de las colonias y microscópicas del micelio, en la mayor parte de los aislados estudiados se determinó el género y en el caso de las cepas que mostraron mayor actividad de degradación de la cafeína se trató de identificarlos a nivel de especie.

Con la aplicación de las claves de identificación de hongos filamentosos propuestas en la literatura (Ainsworth, 1973); Arx, 1974; Alexopoulos y Mims, 1979; Raper y Fennell, 1965), se obtuvieron los resultados de identificación de los 272 aislamientos, que se presentan en el Anexo II.

En la tabla XII, se resumen los resultados de identificación con respecto a los medios y condiciones de cultivo que se probaron, en donde se observa que los aislados se distribuyeron en diversos géneros de hongos en proporciones variables, pudiéndose establecer dos grupos principales, los que se encontraron en porcentajes bajos, entre ellos *Acremonium*, *Drechslera*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Trichoderma* y los que se encontraron en forma predominante, que se agruparon a su vez en 5 géneros, descritos a continuación:

Tabla XII. Porcentaje total de géneros de hongos filamentosos aislados de Veracruz y Chiapas en medios de cultivo específicos (A, B y C) e incubados a 25 °C y 35 °C

GENERO	CHIAPAS		VERACRUZ	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
<i>Acremonium</i>	1.23 %	- - -	- - -	- - -
<i>Aspergillus</i>	20.99 %	68.17 %	27.64 %	75.00 %
<i>Drechslera</i>	- - -	1.52 %	- - -	- - -
<i>Fusarium</i>	27.16 %	9.09 %	9.43 %	4.17 %
<i>Geotrichum</i>	9.88 %	7.57 %	13.21 %	6.94 %
<i>Humicola</i>	23.46 %	10.60 %	37.73 %	9.72 %
<i>Mucor</i>	2.47 %	- - -	- - -	1.39 %
<i>Penicillium</i>	8.64 %	- - -	3.21 %	- - -
<i>Rhizopus</i>	2.47 %	1.52 %	1.89 %	1.39 %
<i>Trichoderma</i>	3.70 %	1.52 %	1.89 %	1.39 %
Total de cepas	81	66	53	72

Aspergillus. Los cultivos que se agruparon en este género se caracterizaron por presentar micelio con septos y numerosos conidióforos no ramificados formados por vesículas uniseriadas con fiáldes formadas directamente sobre éstas, con cadenas de conidios o presentando métulas con cadenas de conidios (vesículas biseriadas); las colonias fueron de color negro, azul-verde y amarillo.

Fusarium. Estos hongos presentaron micelio de color blanco o crema y crecimiento rápido, con abundantes microconidios ovoides y escasos macroconidios fusiformes; algunos presentaron pigmentación anaranjada.

Geotrichum. Los hongos de este género presentaron micelio blanco, liso, formando numerosas artrosporas por fragmentación del micelio. Las colonias fueron blancas, de aspecto polvoso y muy planas.

Humicola. Los microorganismos pertenecientes a este género presentaron micelio hialino al principio, que cambia a gris o moreno, de crecimiento filamentosos que presenta conidios unicelulares más o menos globosos de color moreno obscuro y terminales. También presentaron abundantes clamidosporas en cadena.

Penicillium. Los miembros de este género presentaron colonias de color verde o azul-verde, observándose abundantes conidióforos en forma de penicilio con conidios en cadenas.

Los géneros identificados son de distribución cosmopolita, que intervienen en la descomposición de materia orgánica con actividades celulolíticas, ligninolíticas y pectinolíticas importantes, sobre todo los pertenecientes a *Aspergillus*, que en este caso fueron los más abundantes.

En las tablas XII XIII y XIV y figs. 11 y 12, se observa el efecto que la temperatura de incubación ejerció a nivel de la selección de los microorganismos. El género *Aspergillus* predominó entre los aislados de Veracruz y Chiapas cultivados a 35 °C, mientras que a 25 °C se aislaron en proporciones similares a los otros géneros, es decir que en las muestras de ambos ecosistemas naturales se presentó el mismo patrón de distribución de este género con respecto a la temperatura.

Tabla XIII. Efecto de la temperatura de incubación sobre la distribución de géneros de hongos filamentosos aislados de Veracruz en medios de cultivo específicos (% géneros)

GENERO	MEDIO A		MEDIO B		MEDIO C	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
<i>Aspergillus</i>	29.6	87.5	15.3	73.9	ND	- -
<i>Fusarium</i>	11.1	4.1	7.6	- -	ND	8.0
<i>Geotrichum</i>	11.1	4.1	15.3	13.0	ND	4.0
<i>Humicola</i>	22.2	4.1	53.8	4.3	ND	20.0
<i>Penicillium</i>	22.2	- -	3.8	- -	ND	- -

ND = No determinado, por falta de muestras.

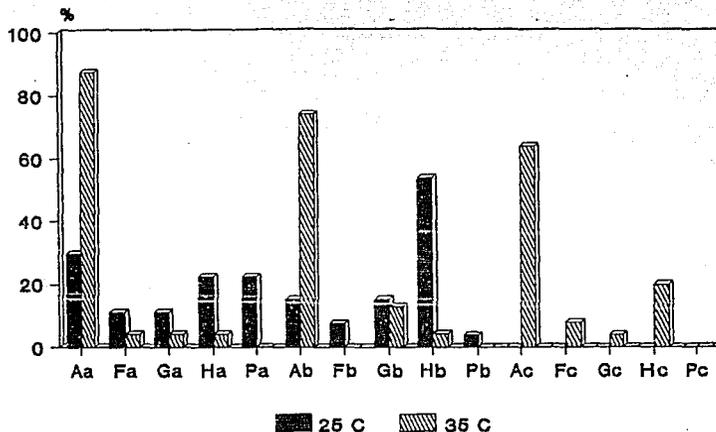


Figura 11. Gráfica del efecto de la temperatura de incubación sobre la distribución de géneros de hongos filamentosos (A=Aspergillus, F=Fusarium, G=Geotrichum, H=Humicola, P=Penicillium) aislados de Veracruz en medios de cultivo a base de sales y extracto de café (a), sales, extracto de café y sacarosa (b), sales y extracto de pulpa de café (c).

Por otro lado, en la tabla XIV se observa que los cultivos de *Penicillium*, únicamente se obtuvieron a 25 °C lo cual coincide con los reportes de la literatura que indican que estos hongos, se desarrollan preferentemente en temperaturas medias y bajas (Arx, 1974). La falta de datos en el medio C a esta temperatura en las muestras de Veracruz fue por pérdida de los cultivos a causa de fallas técnicas del equipo, y no por las condiciones de cultivo.

Con respecto a los otros géneros, se observó una distribución variable sin notarse un efecto importante de la temperatura de incubación sobre su distribución; además a excepción del género *Humicola*, los demás no alcanzaron proporciones mayores del 15%.

Tabla XIV. Efecto de la temperatura de incubación sobre la distribución de géneros de hongos filamentosos aislados de Chiapas sobre medios de cultivo específicos (% géneros)

GENERO	MEDIO A		MEDIO B		MEDIO C	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
<i>Aspergillus</i>	13.0	91.6	44.0	75.0	8.8	50.0
<i>Fusarium</i>	21.7	8.3	40.0	4.1	23.5	15.6
<i>Geotrichum</i>	4.3	- -	- -	- -	20.5	15.6
<i>Humicola</i>	30.4	- -	12.0	12.5	29.4	12.5
<i>Penicillium</i>	17.0	- -	- -	- -	5.8	- -

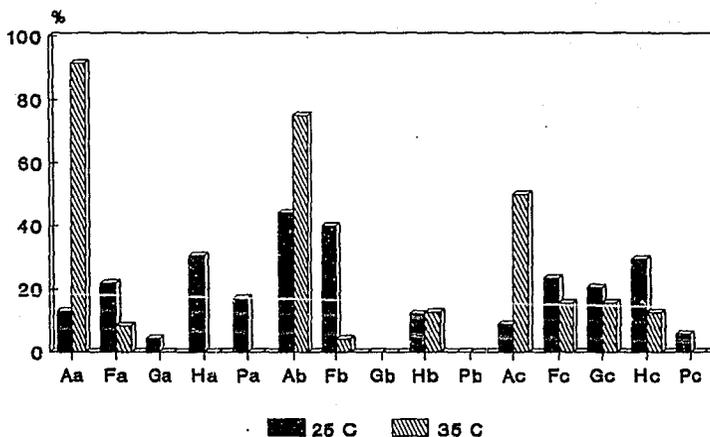


Figura 12. Gráfica del efecto de la temperatura de incubación sobre la distribución de géneros de hongos filamentosos (A=*Aspergillus*, F=*Fusarium*, G=*Geotrichum*, H=*Humicola*, P=*Penicillium*) aislados de Chiapas en medios de cultivo a base de sales y extracto de café (a), sales, extracto de café y sacarosa (b), sales y extracto de pulpa de café (c).

En la tabla XV y fig. 13 puede observarse el efecto de la composición química de los medios de aislamiento, sobre la distribución de géneros obtenidos.

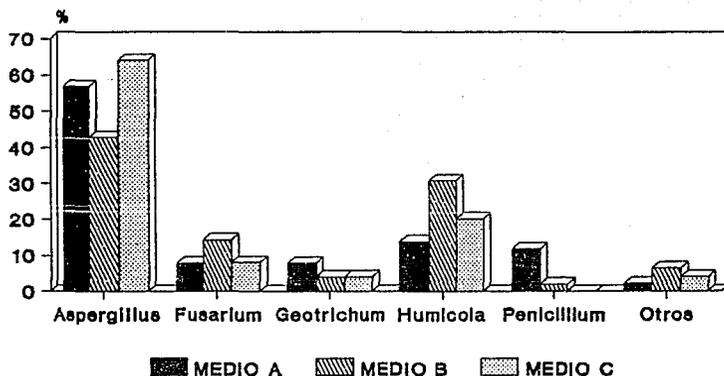
El género *Aspergillus* es el que predominantemente se obtuvo en todos los medios de cultivo, con un promedio aproximado del 40-50% tanto de las muestras de Veracruz como de las de Chiapas, es decir son hongos que desarrollaron favorablemente en los medios de cultivo, independientemente de su composición química diferencial, siguiéndole en abundancia el género *Humicola*, el cual también se distribuyó en cantidades importantes sin observarse su predominancia en algún medio específico.

Con respecto al género *Penicillium*, se aisló un mayor número de cepas en medio de cultivo a base de extracto de café (A), y un menor porcentaje en los medios B o C, probablemente debido a la predominancia de cepas de *Aspergillus* y/o a la presencia de otros hongos de crecimiento más rápido como *Rhizopus* y *Humicola*. No se observó ningún patrón de distribución de los géneros *Fusarium* y *Geotrichum* con respecto a los diferentes medios de cultivo.

Tabla XV. Efecto de la composición química de los medios de aislamiento en la proporción de géneros de hongos filamentosos identificados de Veracruz y Chiapas, obtenidos a 25 y 35°C (% de géneros)

	Veracruz			Chiapas		
	A	B	C	A	B	C
<i>Aspergillus</i>	56.8	42.8	64.0	40.0	59.1	28.8
<i>Fusarium</i>	7.8	14.2	8.0	17.1	22.4	19.6
<i>Geotrichum</i>	7.8	4.0	4.0	2.8	--	18.2
<i>Humicola</i>	13.7	36.5	20.0	20.0	12.2	21.2
<i>Penicillium</i>	11.7	2.0	--	11.4	--	3.0
Otros	2.2	6.4	4.0	8.7	6.3	9.2

VERACRUZ



CHIAPAS

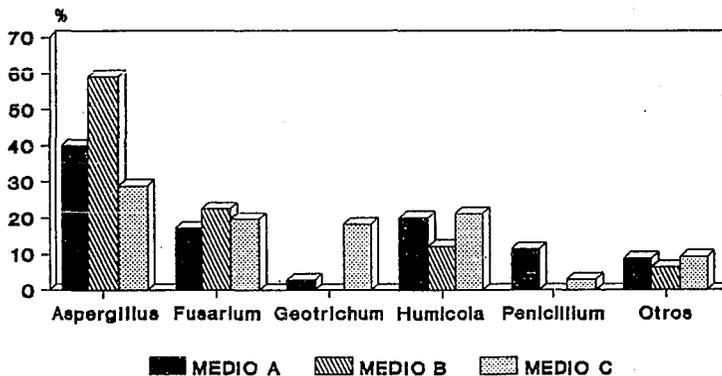


Figura 13. Gráficas de distribución comparativa de géneros de hongos filamentosos aislados de Veracruz y Chiapas en medios de cultivo A, B y C e incubados a 25 °C y 35 °C.

6.3. SELECCION DE CEPAS

En la selección primaria en cajas de petri se descartaron en forma rápida 50 cepas del género *Humicola* y 34 de *Fusarium*, cepas que no mostraron habilidad para utilizar medios con cafeína como única fuente de nitrógeno. Los estudios posteriores se realizaron en las cepas que crecieron en el medio probado, considerando que esta característica es indicativa de la utilización de la cafeína.

En la selección secundaria con medios líquidos de aislamiento (A, B o C), no se observó relación entre el crecimiento de los hongos con la disminución en el contenido de cafeína tal como se observa en la tabla XVI por lo que este procedimiento no resultó adecuado para tales fines. Estos resultados probablemente se deben a que en los extractos de café y de pulpa de café, los microorganismos pudieron utilizar otras fuentes de nitrógeno presentes en los extractos, tales como proteínas solubles, aminoácidos (tablas V y VI), trigonelina o n-metil derivados (Clarke y Macrae, 1985), sin tener que degradar la cafeína; un efecto similar fue observado anteriormente por Schwimmer y Kurtzman (1972).

En el medio de cultivo D, a base de cafeína pura y sacarosa, se observó que sí existe una relación directa entre el crecimiento y la disminución de la cafeína tal como se muestra en la tabla XVII en donde se presentan algunos de los resultados más representativos del proceso de selección efectuado en estas condiciones.

En las tablas XVI y XVII, se observa que las cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, presentaron crecimiento micelial en forma de aglomerados a diferencia del resto de cepas probadas, en las cuales fue filamentosos es decir con hifas dispersas en el medio. Los cultivos con crecimiento filamentosos presentaron una mayor viscosidad y dificultad de separación del micelio para hacer los análisis. Esta característica adquiere gran importancia en numerosos procesos industriales con cultivos sumergidos, debido a que en muchos de éstos, se utilizan principalmente hongos que se desarrollan de esta manera (Mitard y Riba, 1986). En las mismas tablas, también se observa que en algunos casos, hay un aumento del pH en relación directa con la actividad de degradación de cafeína.

Para evaluar mejor este efecto se procedió a hacer un análisis estadístico de varianza y comparación de medias primero y posteriormente una prueba de rangos múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1960); encontrándose que sí existen diferencias significativas entre medias ($\alpha = 0.05$), obtenidas entre las cepas con respecto al pH y % de degradación de la cafeína.

Tabla XVI. Selección de cepas de hongos filamentosos aislados de Veracruz en medio líquido (Medio A) durante 72 horas de incubación a 25 °C con agitación (150 rpm)

No.	especie	pH final	crecimiento	% degrad. cafeína	aglomerados
01	<i>Aspergillus sp.</i>	5.1	++	38.00	+
02	<i>Aspergillus sp.</i>	6.1	++	26.79	+
03	<i>Geotrichum sp.</i>	7.1	+++	62.75	-
04	<i>Aspergillus sp.</i>	6.5	+	12.48	+
05	<i>Aspergillus sp.</i>	6.5	++	24.39	+
08	<i>Humicola sp.</i>	5.3	++	28.25	-
09	<i>Humicola sp.</i>	6.1	+	26.69	-
10	<i>Aspergillus sp.</i>	5.6	++	9.76	+
12	<i>A. oryzae</i>	6.6	+++	61.93	+
13	<i>A. niger</i>	6.9	++	42.87	+
14	<i>Humicola sp.</i>	6.9	+	25.25	-
16	<i>Penicillium sp.</i>	6.2	+	26.25	+
19	<i>Fusarium sp.</i>	5.8	+	26.20	-
20	<i>Humicola sp.</i>	5.9	+	7.44	+
22	<i>Penicillium sp.</i>	6.3	+	23.69	+
23	<i>Penicillium sp.</i>	6.1	++	6.23	+
24	<i>Humicola sp.</i>	5.5	+	17.80	-
25	<i>Humicola sp.</i>	5.8	++	8.55	-
26	<i>Penicillium sp.</i>	5.5	++	15.20	+
27	<i>Rhizopus sp.</i>	5.6	++	20.02	-
28	<i>Geotrichum sp.</i>	6.7	++	33.19	-
29	<i>Geotrichum sp.</i>	6.9	++	24.15	-
31	<i>Fusarium sp.</i>	5.7	+++	26.96	-
33	<i>P. roquefortii</i>	6.5	+++	82.00	+

(-) no hay crecimiento
 (+) poco crecimiento
 (++) crecimiento medio
 (+++) crecimiento abundante

En el Anexo III. se presentan los resultados de la prueba de rangos múltiples de Duncan realizado, donde se determinó que 71% de las cepas, presentan aumento de pH significativo, además que 16.6% de las cepas probadas mostraron una relación directa entre el aumento de pH y el % de degradación de la cafeína y en 25% de éstas, los valores de pH menores de 5.6 coinciden en forma significativa con bajos niveles de degradación de la misma.

Tabla XVII. Selección en medio líquido a base de sacarosa y cafeína (1.2 mg/ml) de cepas de hongos filamentosos aislados de Veracruz a 35°C después de 72 horas de incubación con agitación (150 rpm)

No.	medio	especie	pH final	crecimiento	% degrad. cafeína	aglomerados
02	A	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	+	6.66	+
03	A	<i>Aspergillus sp.</i>	6.2	+++	10.83	+
12	A	<i>A. niger</i>	3.6	+	4.58	+
20	A	<i>Aspergillus sp.</i>	6.5	+++	18.25	+
25	A	<i>Aspergillus sp.</i>	6.6	+++	17.08	+
12	B	<i>A. niger</i>	3.0	+	4.16	+
20	B	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	++	14.30	+
29	B	<i>A. niger</i>	6.2	+++	18.66	+
31	B	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	+++	16.25	+
33	B	<i>Trichoderma sp.</i>	6.3	+	2.50	-
29	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.4	+++	26.50	+
25	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	+++	25.10	+
26	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.1	+++	21.00	+
13	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.1	+++	19.83	+
10	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	+++	14.83	+
15	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.2	++	12.50	+
16	C	<i>Aspergillus sp.</i>	6.3	++	11.64	+
23	C	<i>Fusarium sp.</i>	6.1	+	4.41	+

(-) no hay crecimiento
 (+) poco crecimiento
 (++) crecimiento medio
 (+++) crecimiento abundante

Con estos resultados, pudiera pensarse que se apoya el mecanismo bioquímico de degradación de la cafeína (fig. 7), propuesto por algunos autores, (Bergmann et al., 1962; Schwimmer y Kurtzman, 1971; Woolfolk, 1975) los que proponen la liberación de urea como producto final. Sin embargo, es necesario hacer más estudios, para conocer mejor la relación que existe entre la degradación de cafeína y la variación de pH del medio de cultivo, sobre todo en el caso de las cepas que se encontraron con alguna actividad de degradación de ésta y no manifestaron aumento del pH al final del cultivo, o las que manifestaron elevación del pH sin actividad importante de degradación.

En la tabla XVIII, se presentan los resultados de los cultivos con mayor tasa de degradación de la cafeína cuantifi-

cada por los métodos de Ishler et. al. (1948) y el de Smyly et. al. (1976); durante las etapas de selección primaria y secundaria. En ésta, se observan diferencias cuantitativas entre los valores obtenidos en ambos métodos, lo que puede deberse al hecho de que en el primero, los análisis se realizan en muestras que deben someterse a procedimientos de extracción ácida de la cafeína y clarificación para remover sustancias que interfirieran en la prueba y diluciones, lo que implica menor precisión, reproducibilidad y tiempos más largos en las determinaciones.

En el segundo método se obtuvieron resultados más precisos, reproducibles y de mayores valores, dado que las muestras filtradas y convenientemente diluidas se inyectan directamente al cromatógrafo dentro de los límites de 0.001 a 0.08 mg/ml con un tiempo de retención de 7.5 min; sin embargo, a diferencia del primer método éste es de costo elevado y poco práctico para aplicarlo a un gran número de muestras.

En el grupo de cepas seleccionadas por su elevada capacidad de degradar la cafeína, encontramos que éstas corresponden a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En la revisión bibliográfica realizada encontramos que ya se han reportado algunas especies del primer género, con capacidad de degradar la cafeína, sobre todo *P. crustosum* y *P. roquefortii* (Schwimmer y Kurtzman, 1971) en medios de cultivo sintéticos.

Tabla XVIII. Cepas seleccionadas por su capacidad de degradación de la cafeína cuantificada por los métodos de Ishler et. al., 1978 (1) y de Smyly et. al., 1976 (2), en medio de cultivo D (1.2 mg/ml de cafeína) después de 72 horas de incubación, en agitación 150 (rpm)

clave	especie	% disminución de cafeína	
		(1)	(2)
V12A25	<i>A. oryzae</i>	77.75	100.0
V26A25	<i>Penicillium sp.</i>	62.13	98.0
V33A25	<i>P. roquefortii</i>	95.25	100.0
C16A25	<i>A. niger</i>	61.66	99.0
C11B25	<i>A. fumigatus</i>	70.66	100.0
C17B25	<i>A. niger</i>	60.50	100.0
C28B25	<i>A. niger</i>	69.60	98.0

Con respecto al género *Aspergillus*, estos se han utilizado en un gran número de procesos de fermentación en medio sólido de pulpa de café, para su enriquecimiento proteico y uso como alimento para animales (Peñaloza, 1981; Guzmán, 1983; Aguilar, 1983), pero no se reportan con actividad de degradación de la cafeína debido a que durante estos procesos enriquecen el sustrato con nitrógeno mineral, por lo tanto, probablemente el hongo no necesitó utilizar este compuesto para su crecimiento.

Sin embargo, De León, 1989 reporta la reducción de compuestos tóxicos como cafeína y polifenoles de la pulpa de café suplementada con sulfato de amonio por fermentación sólida con *A. niger*, *A. oryzae* y *Sporotrichum pulverulentum* con niveles de reducción de cafeína de 13.2% a 46%, por ello es necesario continuar los estudios que demuestren el efecto del nitrógeno mineral y la eficiencia de degradación de cafeína con cepas que presenten esta capacidad, considerando que no se trata de las mismas cepas, sobre todo en su origen. Las cepas utilizadas por este autor fueron aisladas de sustratos diferentes a la pulpa de café, como se hizo en este trabajo. Además esto explica las tasas mayores de degradación de cafeína obtenidas en los estudios realizados y que posteriormente se comprobaron en cultivo en medio sólido con pulpa de café en los experimentos hechos por Nava (1990).

En este trabajo, se encontraron diversas especies del género *Aspergillus* que presentaron actividad de degradación de la cafeína en forma importante, que incluso superan en número y actividad a las del género *Penicillium*.

En la misma tabla XVIII, se observa que todas las cepas seleccionadas por su actividad de degradación de cafeína se aislaron en medios de cultivo selectivos a base de extracto de café (A y B), los que son nutricionalmente menos completos que el de pulpa de café, lo cual confirma la importancia de la composición de los mismos para el aislamiento o selección primaria de microorganismos con actividades específicas de interés a partir de sustratos naturales, que se caracterizan por presentar una abundante microbiota con gran diversidad de actividades.

Con respecto a la temperatura de cultivo de las cepas seleccionadas se puede observar que todas corresponden a 25 °C, que en el caso de las cepas de *Penicillium*, coincide con la temperatura de aislamiento encontrada y de crecimiento reportada en la literatura. En el caso de *Aspergillus*, en los resultados de aislamiento se encontró que la mayor proporción de cepas se obtuvo a 35 °C (tabla XIV y figs. 11 y 12) sin embargo, en los resultados de selección final ninguna de estas presentaron capacidad de degradar la cafeína, lo que hace presuponer que el sistema bioquímico de metabolismo de esta sustancia, sea dependiente de la temperatura; aspecto que no ha sido reportado con anterioridad.

6.4 ESTUDIO FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE CEPAS SELECCIONADAS

Los estudios fisiológicos y bioquímicos realizados, permitieron conocer algunas características de las cepas seleccionadas para los procesos de degradación de la cafeína de la pulpa de café por FMS.

6.4.1. Tasa de degradación de la cafeína.

En la tabla XIX, se observa variabilidad de resultados entre las especies de *Aspergillus*, donde *A. oryzae* presentó los mejores resultados (0.157 mg/ml/día), mientras que las cepas de *Penicillium* seleccionadas presentaron aproximadamente la misma tasa de degradación de cafeína (0.126 mg/ml/día) en un medio con 1.2 g/l de cafeína pura. Estos resultados, son bajos en comparación con los obtenidos por Kurtzman y Schwimmer, en 1972, con *Penicillium crustosum*, quienes reportaron una tasa de degradación de cafeína de 0.24 mg/ml/día en un medio de extracto de café conteniendo 0.4 g/l de cafeína y de 0.28 mg/ml/día en un medio sintético con 2 g/l de cafeína pura.

Tabla XIX. Resultados de la tasa de degradación de la cafeína (cuantificada por HPLC), crecimiento apical (tubos de Ryan) e índice de esporulación, (PDA) de cepas seleccionadas

clave	especie	tasa de degradación mg/ml/día	crecimiento apical mm/h	Ie X 10 ⁹ esp/g sust.
V12A25	<i>A. oryzae</i>	0.157	0.24	1.30
V26A25	<i>Penicillium sp.</i>	0.126	0.15	5.40
V33A25	<i>P. roquefortii</i>	0.126	0.14	9.26
C16A25	<i>A. niger</i>	0.123	0.23	3.40
C11B25	<i>A. Fumigatus</i>	0.120	0.16	18.60
C17B25	<i>A. niger</i>	0.103	0.22	15.20
C28B25	<i>A. niger</i>	0.119	0.19	8.83

Por otro lado, es explicable la variabilidad de resultados antes explicada entre especies del mismo género ya que cada una de las cepas posee una habilidad característica para degradar la cafeína tal como sucede con otras actividades metabólicas de los microorganismos como son: producción de enzimas hidrolíticas de diversos tipos, producción de metabolitos primarios y secundarios entre otras, las cuales también son susceptibles de modificarse dependiendo de las condiciones de cultivo.

A fin de hacer comparables los resultados, sería necesario determinar los niveles tóxicos o inhibitorios del crecimiento de cafeína para cada una de las cepas, y así conocer la concentración óptima de determinación de la tasa de degradación en niveles adecuados para todas. De la misma manera es necesario estandarizar las condiciones de cultivo, ya que en los trabajos de Kurtzman y Schwimmer (1972), éstos se agitaron a 460 rpm, que implican mayor aireación, lo que pudo influir en el crecimiento fúngico y en la obtención de mayores tasas de degradación de la cafeína.

6.4.2. Crecimiento apical

El crecimiento apical determinado por este método indica la capacidad de un hongo filamentosos, para colonizar la superficie de un medio sólido, que varía de acuerdo a su composición y condiciones de cultivo. Este tipo de pruebas proporciona información acerca de la cinética de producción de biomasa de interés para los fisiólogos y biotecnólogos, así como para entender las estrategias de crecimiento de los hongos en sus hábitats naturales (Trinci, 1979; Prosser, 1990).

En la tabla XIX, se observa que las cepas seleccionadas presentan valores de crecimiento apical medio con respecto a los reportados para *Trichoderma reesei* (1.33 mm/h) y a los de crecimiento apical lento como *Aspergillus wentii* (0.04 mm/h), en medio de extracto de malta agar (Roussos, 1985). Estos resultados permiten garantizar su eficiencia de colonización de sustratos, utilizados en los procesos de FMS.

6.4.3. Índice de esporulación.

La conidiogénesis es una etapa fisiológica muy importante de los hongos filamentosos y corresponde a la formación y liberación de conidiosporas que son sus formas de reproducción asexual, cuyo número variará dependiendo del tipo de hongo y del tamaño relativo de los conidios. Además también el número es función de la concentración de las fuentes de carbono y de nitrógeno presentes en el medio de cultivo. Así, se han definido conceptos como el índice de esporulación que es la cantidad de esporas producidas por gramo de sustrato carbonado inicial y se le considera como un indicador de la eficiencia de esporulación (Roussos, 1985).

Los índices de esporulación de las cepas probadas, en las condiciones especificadas en la metodología, tal como se muestran en la tabla XX, son suficientemente altos, para poder utilizarse como inóculos en los procesos de FMS, debido a que la cantidad mínima necesaria para inocular los sustratos es de 2.0×10^7 esporas/g de sustrato. (Raimbault y Alazard, 1980). La posibilidad de obtener un número elevado de esporas es un factor muy importante para la selección de microorganismos en este tipo de procesos.

Tabla XX. Índices de esporulación (Ie) obtenidos en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo PDA después de 7 días de incubación a 25 °C

clave	género	especie	Ie (x 10 ⁹)
V12A25	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	1.30
V26A25	<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i>	5.40
V33A25	<i>Penicillium</i>	<i>roquefortii</i>	9.26
C16A25	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	3.40
C11B25	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>	18.60
C17B25	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	15.20
C28B25	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	8.83

6.4.4. Efecto del pH del medio

Los resultados, se muestran en la tabla XXI, se observa que todas las cepas seleccionadas crecen preferentemente a pH de 4 y 6, no hay crecimiento a pH 2 y 8 lo cual coincide con el comportamiento general de los hongos, sin embargo no se llegó a la determinación del pH óptimo de crecimiento ya que no se probaron más valores de pH, debido a que únicamente se pretendía tener un perfil del comportamiento de las cepas con respecto al pH en medio líquido considerándose importante evaluar con mayor detalle este aspecto, pero en medio sólido, con pulpa de café como sustrato en el cual se pretende posteriormente aplicar la capacidad de degradación de la cafeína que presentan las cepas seleccionadas.

Tabla XXI. Efecto del pH inicial del medio sobre el crecimiento de hongos filamentosos seleccionados por su capacidad de degradar la cafeína.

clave	especie	pH inicial			
		2	4	6	8
V12A25	<i>A. oryzae</i>	-	+	++	-
V26A25	<i>P. sp.</i>	-	+	+	-
V33A25	<i>P. roquefortii</i>	-	+	+	-
C16A25	<i>A. niger</i>	-	+	++	-
C11B25	<i>A. fumigatus</i>	-	+	++	-
C17B25	<i>A. niger</i>	-	+	++	-
C28B25	<i>A. niger</i>	-	+	++	-

6.4.5. Efecto de la temperatura

Basándose en el mismo criterio de determinación del efecto de pH anteriormente explicado, en el caso de la temperatura tampoco se determinaron temperaturas óptimas de crecimiento de las cepas, sino que únicamente se estableció un perfil de crecimiento de las mismas en medio líquido con respecto a la temperatura.

En la tabla XXII se observa que a 4 °C no hubo crecimiento de las cepas durante el periodo de prueba, siendo a 25 °C donde todas presentaron crecimiento notable. Sin embargo existen diferencias en cuanto a la magnitud de crecimiento en 35 °C, temperatura en la cual se cultivan mejor las cepas de *Aspergillus*, mientras que las de *Penicillium* crecieron en menor cantidad. En este experimento se confirma nuevamente la necesidad de realizar mayores estudios con respecto a la degradación de la cafeína y la temperatura óptima de crecimiento de los hongos que llevan a cabo esta actividad.

Tabla XXII. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento de hongos filamentosos seleccionados por su capacidad de degradar la cafeína

clave	especie	Temperatura		
		4 °C	25 °C	35 °C
V12A25	<i>A. oryzae</i>	-	+++	+++
V26A25	<i>P. sp.</i>	-	++	+
V33A25	<i>P. roquefortii</i>	-	++	+
C16A25	<i>A. niger</i>	-	++	+++
C11B25	<i>A. fumigatus</i>	-	+	+++
C17B25	<i>A. niger</i>	-	++	+++
C28B25	<i>A. niger</i>	-	++	+++

VII. CONCLUSIONES

1) Considerando la importancia económica de la cafeticultura en México, los grandes volúmenes de producción de pulpa de café y los problemas asociados a su manejo y utilización se propone una alternativa de eliminación biológica de la cafeína de la pulpa de café, para lo cual se obtuvo una colección de hongos filamentosos susceptibles de utilizarse en procesos de fermentación en medio sólido, con el fin de mejorar su aprovechamiento.

2) En este estudio se logró el aislamiento y selección de siete cepas de hongos degradadores de la cafeína (cafeinoclásticos), las que se identificaron como miembros del género *Penicillium* y *Aspergillus*.

3) La composición química de los medios y la temperatura de incubación de los cultivos, fueron determinantes para el aislamiento y la selección de los hongos filamentosos obtenidos; lo que confirma la importancia de estos factores para encontrar microorganismos con actividades específicas de interés a partir de sustratos naturales, que se caracterizan por presentar una abundante microbiota con gran diversidad metabólica.

4) Es necesario hacer más estudios, para conocer la relación que existe entre la degradación de cafeína y la variación del pH en los medios de cultivo.

5) El estudio de las características fisiológicas y bioquímicas estudiadas, para las cepas seleccionadas, sienta las bases para estudios posteriores en condiciones de fermentación en medio sólido, con el fin de descafeinizar la pulpa de café.

6) Los taninos y fenoles libres de la pulpa de café, (reportados como factores antifisiológicos para los animales), probablemente puedan ser eliminados aplicando los mismos principios metodológicos aquí expuestos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aboud, M. & M. Burger. 1971. Cyclic-3', 5'-adenosine monophosphate-phosphodiesterase and the release of catabolic repression of beta galactosidase by exogenous 3'-5'-adenosine monophosphate in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 174-182.
- Adams, M. R. & J. Dougan. 1981. Biological management of coffee processing. *Trop. Sci.* 123(3): 178-196.
- Aguilar, 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, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Aguirre, F. 1966. La utilización industrial del grano de café y de sus subproductos. *Investigaciones tecnológicas del ICAITI*, No. 1, Guatemala.
- Ainsworth, G.C. 1973. Introduction and keys to the higher taxa. In: *The Fungi. An advanced Treatise*. Vol. 4a. A Taxonomic Review Keys, Academic Press, Nueva York.
- Alexopoulos, C.J. & C.W. Mims 1979. *Introductory Mycology*, 3a. ed. John Wiley, Nueva York.
- Arcila, F. 1979. Investigaciones de CENICAFE sobre el uso y tratamiento de los residuos del beneficio del café. Publicación Cenicafe, Bogotá.
- Arx von, J.A. 1974. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*, J. Cramer (ed.), Vaduz.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3a. ed. Burgess Publishing.
- Barrios, G.J., Tomasini, A., Viniegra G. y López, L. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 10: 793-798.
- Bellet, S., A. Kershbaum & J. Aspe. 1965. The effect of caffeine on free fatty acids. *Arch. Int. Med.* 116: 750-752.
- Bergmann, F., H. Ungar-Waron, H. Kwietny-Govrin, H. Goldberg, & S. León. 1962. Some specific reactions of the purine-oxidizing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioch. Biophys. Acta* 55: 512-522.

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

Blecher, R. & Lingens F. 1977. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* 358: 807-817.

Botton, B., A. Breton, M. Fevre, Ph. Guy, S.P. Larpent & P. Veau. 1985. *Moisissures Utiles et Nuisibles. Importance Industrielles.* Masson. Paris.

Braham, J.E., R. Jarquin, J.M. González y R. Bressani. 1973. Pulpa y pergamino de café. III. Utilización de la pulpa de café en forma de ensilaje. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 23: 379-389.

Bressani, R., E. Estrada y R. Jarquin. 1972. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química de aminoácidos. *Turrialba* 22: 299-304.

Bressani, R. E. Estrada. L. G. Elías, R. Jarquin y L.U. de Valle. 1973. Pulpa y pergamino de café. IV. Efecto de la pulpa de café deshidratada en las dietas de ratas y pollos. *Turrialba* 23: 403-409.

Bressani, R. 1979. Factores antifisiológicos de la pulpa de café. En: Braham, J.E. & R. Bressani (Eds.) *Pulpa de Café: Composición, Tecnología y utilización*, INCAP. Guatemala.

Cabezas, M.T., B. Murillo, R. Jarquin, J.M. González E. Estrada y R. Bressani. 1974. Pulpa y pergamino de café. IV. Adaptación del ganado bovino a la pulpa de café. *Turrialba* 24: 160-167.

Cabezas, M.T., E. Estrada, B. Murillo, J.M. González y R. Bressani. 1976. Pulpa y pergamino de café. XII. Efecto del almacenamiento sobre el valor nutritivo de la pulpa de café para terneros. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 26: 203-215.

Cabezas, M.T., E. Vargas & B. Murillo. 1977. Utilización of coffee fruit without seeds (coffee pulp) in ruminant feeding. First Symposium: Feed Composition, Animal Nutrient Requirements and Computerization of Diets. Utah State University.

Cabezas, M.T., A. Flores y J.E. Agaña. 1979. Uso de la pulpa de café en alimentación de rumiantes. En: Braham, J. E. & R. Bressani (Eds.) *Pulpa de Café; Composición, Tecnología y Utilización.* INCAP, Guatemala.

Calderón, E. 1981. Estudio sobre el posible mejoramiento químico nutricional de la pulpa de café por fermentación oxidativa. TESIS de grado. INCAP. Universidad de San Carlos, Guatemala.

Calle, H. 1956. Ensayo sobre cultivo de levaduras alimenticias en pulpa. *Boletín informativo* 2(14) de la Federación Nacional de Cafeteros. Chinchina, Colombia.

Calle, H. 1977. Subproductos del café. *Boletín informativo* de la Federación Nacional de Cafeteros. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Colombia.

Calzada, J.F., R. de León, M.C de Arriola & C. Rolz. 1987. Growth of mushrooms on wheat straw and coffee pulp: strain selection. *Biol. Wastes*. 20:217-226.

Calzada, J.F., C. Porres, C. Rolz y M.C. Arriola. 1987. Tratamiento de efluentes del beneficio húmedo de café. Resúmenes del Simposio de Biotecnología para producción de biomasa y tratamiento de desperdicios. 18-20 de febrero. Antigua Guatemala. Guatemala.

Cassaigne, M.J. 1989. Evaluación económica de la valorización biotecnológica de la pulpa de café. Informe final de Servicio Social. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapala. México.

Christensen, M.S. 1981. Preliminary tests on the suitability of coffee pulp in the diets of common carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Clarias mossambicus*, Peters). *Aquaculture* 25: 235-242.

Clarke, R.J. & R. Macrae. 1985. *Coffee*, Vol.1: Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers. New York.

Crail, M.L. y J.D. Grande. 1990. El café: una historia estimulante. *Cuadernos de Nutrición*, México. 1 (3): 33-44.

De León, R., D. Martínez-Carrera, G. Guzmán y H. Logeman. 1987. Cultivo de una cepa silvestre guatemalteca de *Volvariella bakeri* a nivel de laboratorio. *Rev.Mex.Mic.* 3: 23-27.

De León, R., F. Calzada, R. Herrera & C. Rolz. 1980. Fungal biomass production from coffee pulp juice. *J. Ferment. Technol.* 58: 579-582.

Deschamps F. & M.C. Huet. 1984. B-glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in solid state fermentation. Studies of its properties. *Biotechnol. Lett.* 6: 451-456.

De Vries J.W., K.D. Johnson & J.C. Heroff. 1981. HPLC Determination of caffeine and theobromine content of various natural and red dutched cocoas. *J. Food Sci.* 46: 1968-1969.

Domon, M., B. Barton, A. Porte & A.M. Routh. 1970. The interaction of caffeine with ultraviolet light irradiated DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 17: 395.

Efías, L.G. 1978. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. En: Bressani, R. y J.E. Braham (Eds.) *Pulpa de café, Composición, Tecnología y Utilización*. INCAP. Guatemala.

Espinoza, R., F. Salazar, C. Rolz, J.F. Menchú, H. Mayorga y S. Cabrera. 1974. Producción de proteína unicelular a partir de agua de beneficiado de café. Memorias de la Primera Reunión Internacional sobre la utilización de subproductos del café en la alimentación animal y otras aplicaciones agrícolas e industriales. CATIE, Costa Rica.

Favela, E., S. Huerta, S. Roussos, G. Olivares, G. Nava, G. Viniegra y M. Gutiérrez. 1989. Uso de enzimas comerciales en el beneficio húmedo del café variedad robusta. Memorias del Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 12-15 de abril. Xalapa, México.

Flores, R.F. 1973. Respuesta bioeconómica de novillos de engorde alimentados con diferentes niveles de pulpa de café ensilada y protéica. TESIS. Centro Tropical de Enseñanza e Investigación. Departamento de Ganadería Tropical. Turrialba, Costa Rica.

Gluck, M. & F. Lingens. 1988. Heteroxanthinedemethylase, a new enzyme in the degradation of caffeine by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 28:59-62.

Gómez, R. 1978. Procesamiento de la pulpa de café; tratamientos químicos. En: Bressani, R. y J.E. Braham (Eds) *Pulpa de café, Composición, Tecnología y Utilización*. INCAP. Guatemala.

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, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

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

Harm, W. 1967. Differential effects of acriflavine and caffeine on various ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* strains and T1 phage. *Mutation Res.* 4: 93.

Hass, G.J. & B. Stieglitz. 1976. Microbiological decaffeination of aqueous liquids. Canadian Patent No. 1,086,553.

Hawkins, G.E. & W.E. Davis. 1970. Changes in plasma free fatty acids and triglycerides in dairy cattle after dosing with coffee or caffeine. *J. Dairy Sci.* 53: 52-55.

Hesseltine, C.W. 1965. A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia* 57: 149.

IFT Institute of Food Technologist's. 1983. Caffeine. A Scientific Status Summary by the Expert Panel on Food Safety of Nutrition. *Food Technol.* 37(4):87-91.

INMECAFE Instituto Mexicano del Café. 1987. Producción de Café por Estados de 1949-1987. Centro de Información Cafetalera. Xalapa.

INMECAFE Instituto Mexicano del Café. 1988. Boletín Bibliográfico Mensual, Centro de Información Cafetalera. Xalapa.

Ishler, N.H., T.P. Finucane & E. Borcker. 1948. Rapid spectrophotometric determination of caffeine. *Analyt. Chem.* 20: 1162-1166.

Itoh, M., S. Takahashi, M. Iritani & Y. Kaneko, 1980. Degradation of three isomers of cresol and mono-hydroxybenzoate by eumycetes. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1037-1042.

Jarquín, R., J. M. González, J.E. Braham y R. Bressani, 1973. Pulpa y pergamino de café. II Utilización de la pulpa de café en la alimentación de rumiantes. *Turrialba* 3: 41-47.

Kuhlmann, W., H.G. Fromme, E.M. Heege & W. Osterfag. 1968. The mutagenic action of caffeine in higher organisms. *Cancer Res.* 28: 2375.

Kurtzmann, R.H. & S Schwimmer. 1971. Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia* 27: 481-482.

Larde, G. 1984. Aprovechamiento de los subproductos del café: el caso de El Salvador. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. Memoria del VI Congreso Nacional de Ingeniería. San Salvador.

Marchal, J.I. & R. Palma. 1985. Análisis Gráfico de un Espacio Regional VERACRUZ. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. INIREB. Xalapa.

Martínez-Carrera, D., C. Soto y G. Guzmán. 1985. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de café con paja como substrato. *Rev. Mex. Mic.* 1: 101-108.

Middelhoven, W.J. & C.M. Bakker. 1982. Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C 3024. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 214-217.

Mishustin, E.N. & N.S. Erofeev. 1966. Nature of the toxic compounds accumulating during the decomposition of straw in soil. *Microbiology* 35: 126-129.

Mitard, A. & J.P. Riba. 1986. Rheological properties of *Aspergillus niger* pellet suspensions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 245-249.

Molina, M.R., M. de la Fuente, M.A. Batten & R. Bressani. 1974. Decaffeination: A process to detoxify coffee pulp. *Agric. Food Chem.* 22: 1055-1059.

Murillo, B. 1979. Ensilaje de pulpa de café. En: Braham, J.E. y Bressani R. (Eds.) *Pulpa de Café; Composición, Tecnología y Utilización*, INCAP, Guatemala.

Naharara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda & H. Taguchi. 1982. Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* 69: 311-319.

Nava, G. 1990. Fermentación en medio sólido de pulpa de café con cepas degradadoras de cafeína. TESIS. Facultad de Química, UNAM, México.

Peñaloza, W. 1981. Fermentación sólida de la pulpa de café. TESIS. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos, Guatemala.

Peñaloza, W., M.R. Molina, R. Gómez & R. Bressani. 1985. Solid-State Fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 388-393.

Prosser, J.I. 1990. Growth of fungal branching systems. *The Mycologist* 4: 60-65.

Putrament, A., H Baranowska, T. Bilinski & W. Prazmo. 1972. On the specificity of caffeine effects. *Molec. Gen. Genet.* 118: 373-379.

Raimbault, M. 1980. Fermentation en milieu solide. Thèse doctorat d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse.

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

Raper, K.B. & D.I. Fenell. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
Riddell, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265-270.

Rolz, C., F. Menchú, R. Espinosa & A. García-Prendes. 1971. *Coffee fermentation studies*. ASIC, 5° Colloque, Lisbonne.

Rolz, C. 1988. Brief description of SSF processes at ICAITI. In: Proceedings of the Seminar Solid State Fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials. ORSTOM-Montpellier (France) 25-27 July.

Rolz, C., R. de León & M.C. de Arriola. 1988. Solid substrate growth of white root fungi on coffee pulp. *Acta Biotechnol.* 3: 211-223.

Roussos, S. & M. Raimbault. 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I. Screening des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol.* 133: 455-464.

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

Roussos, S., M-A. Aquihuatl, J. Cassaigne, E. Favela, M. Gutiérrez, L. Hannibal, S. Huerta, G. Nava, M. Raimbault, W. Rodríguez, J-A. Salas, R. Sánchez, M. Trejo y G. Viniegra. 1989. Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. Memorias del Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 12-15 de abril de 1989. Xalapa, México.

Ryan, F.J., G.W. Beadle & E.L. Tatum. 1943. *The tube method of measuring the growth rate of Neurospora*. *Amer. J. Bot.* 30: 784-799.

Schwimmer, S., R.H. Kurtzman. & Heftmann E. 1971. Caffeine metabolism by *Penicillium roquefortii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 147: 109-113.

Schwimmer, S. & R.H. Kurtzman. 1972. Fungal decaffeination of roast coffee infusions. *J. Food Sci.* 37: 921-923.

Shoda, M., K. Murata & S. Udaka. 1980. Isolation and properties of phenol utilizing microorganisms with special reference to catecol 1,2-oxygenase. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1841-1846.

Smith, J.E. & D.R. Berry. 1975. *The filamentous fungi I. Industrial Mycology.* Edward Arnold (ed.) London.

Smyly, D.S., B. Woodward & E.C. Conrad. 1976. Determination of saccharin, sodium benzoate, and caffeine in beverages by reverse phase high-pressure liquid chromatography. *J. of the ADAC* 59: 14-19.

Steel, R. & Torrie, J. 1960. *Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences.* Mc. Graw-Hill Book. New York.

Suárez de Castro, F. 1974. Utilización de la pulpa de café como abono. Memorias de la Primera Reunión Internacional sobre la utilización de subproductos del café en la alimentación animal y otras aplicaciones agrícolas e industriales. 11-14 de junio. San José, Costa Rica.

Suzuki, T. & G.R. Waller. 1988. Metabolism and analysis of caffeine and other methylxanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao. In: *Modern Methods of Plant Analysis* Vol. 8. H. F. Linskens & J.F. Jackson (Eds.) Springer-Verlag, Berlin.

Tauk, S.M. 1986. Estudio de composición da polpa de café a 45°C através do uso de microrganismos isolados da polpa. *Turrialba* 36: 271-280.

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

Trejo, H.M. 1986. Producción de enzimas péclicas por fermentación en medio sólido. TESIS. Facultad de Química. UNAM.

Trinci, A.P. 1979. The duplication cycle and branching in fungi. In: *Fungal Walls and Hyphal Growth.* J.H. Burnett & A.P. Trinci (eds.). Cambridge University Press, Cambridge.

Ulloa, M. y R. Hanlin. 1978. *Atlas de Micología Básica.* Concepto. México

Vernet, M. 1986. Les Résidus de Traitement du Café: Analyse Chimique et Tentatives de Valorisation. Memoire Bibliographique. Maîtrise de Sciences et Techniques de Biologie appliquée aux I.A.A.- Brest. France.

Woolfolk, .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. Bact.* 123: 1088-1106.

Zuluaga, V.J. 1981. Contribution a l' étude de la composition chimique de la pulpe de café *Coffea arabica*. Thèse Doct. Sciences. Univ. Neuchatel, Suisse.

Zuluaga, V.J. 1989. Utilización integral de los subproductos del café. Memorias del I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 12-15 abril. Xalapa, México.

ANEXO I. Clasificación general de los hongos (Ainsworth, 1973)

MYXOMYCOTA (Organismos sin pared celular)

- A. **ACRASIOMYCETES** (mohos mucilaginosos celulares). Organismos ameboides que se agrupan para formar un cuerpo fructífero parecido a un hongo.
- B. **HYDROMYXOMYCETES** (mohos mucilaginosos reticulares). Células fusiformes que se mueven dentro de una red tubular de polisacáridos extracelulares.
- C. **MYXOMYCETES** (mohos mucilaginosos veraderos). Masa protoplásmica multinucleada (plasmodio) que fagocita partículas alimenticias.
- D. **PLASMIDIOPHOROMYCETES** (mohos mucilaginosos endoparásitos). Pequeños plasmodios parásitos de algas, hongos y plantas superiores.

EUMYCOTA (hongos verdaderos con pared celular)

- A. **MASTIGOMYCOTINA** Producen esporas asexuales flageladas (zoosporas).
 - i) *Chytridiomycetes* Cadenas celulares primitivas. a veces adheridas al substrato por medio de rizoides que terminan en punta. Las zoosporas tienen un solo flagelo posterior de tipo látigo.
 - ii) *Oomycetes Miceliales*, cenocíticos. Las zoosporas tienen dos flagelos, uno mastigonemado o barbulado dirigido hacia el frente y otro de tipo látigo hacia atrás.
- B. **ZYGOMYCOTINA** Por lo general miceliales, cenocíticos; las esporas asexuales no móviles se forman en un esporangio.
 - i) *Zygomycetes* Por lo general saprobios.
 - ii) *Trichomycetes* Por lo general comensales del intestino de los artrópodos.

ANEXO I. Clasificación general de los hongos (continuación)

C. ASCOMYCOTINA Micelio septado o levaduras. Las esporas asexuales no se forman en esporangios, las esporas sexuales se forman en un asca.

- i) *Hemiascomycetes* Levaduras o miceliales; el asca no está encerrada en un cuerpo fructífero (ascocarpo).
- ii) *Eusascomycetes* Miceliales; las ascas están encerradas en un ascocarpo.

D. DEUTEROMYCOTINA Micelio septado o levaduras; esporas asexuales como en los Ascomycotina; no hay reproducción sexual, es rara o se desconoce, aunque puede haber reproducción parasexual.

- i) *Blastomycetes* Levaduras típicas.
- ii) *Hyphomycetes* Miceliales; las esporas asexuales o conidios se forman en una hifa simple o en ramas de hifas (conidióforos).
- iii) *Coelomycetes* Miceliales; las esporas asexuales se forman en conidióforos dentro de una estructura en forma de botella (picnidio) o sobre una estroma (acérvulo).

E. BASIDIOMYCOTINA Micelio septado o levaduras; esporas asexuales ausentes o como en los Ascomycotina; las esporas sexuales se forman en un basidio.

- i) *Teliomycetes* Sin un cuerpo fructífero (basidiocarpo) que contenga a los basidios; son parásitos de plantas superiores (royas y carbones).
- ii) *Hymenomycetes* El basidiocarpo es una seta o una repisa con los basidios descubiertos.
- iii) *Gasteromycetes* Diversos basidiocarpos que encierran a los basidios.

ANEXO II. Colección de hongos filamentosos aislados en medios de cultivo específicos e identificados.

NUMERO CLAVE	ESPECIE	NUMERO CLAVE	ESPECIE
001	V01A25	Aspergillus	sp.
002	V01A35	Aspergillus	sp.
003	V01B25	Aspergillus	sp.
004	V01B35	Aspergillus	sp.
005	V01C35	Aspergillus	sp.
006	V02A35	Aspergillus	sp.
007	V02B25	Geotrichum	sp.
008	V02B35	Aspergillus	sp.
009	V02C35	Aspergillus	sp.
010	V03A25	Geotrichum	sp.
011	V03A35	Aspergillus	sp.
012	V03B25	Humicola	sp.
013	V03B35	Aspergillus	sp.
014	V03C35	Aspergillus	sp.
015	V04A25	Aspergillus	sp.
016	V04B25	Aspergillus	sp.
017	V05A25	Aspergillus	sp.
018	V05A35	Aspergillus	sp.
019	V05B35	Aspergillus	sp.
020	V05C35	Aspergillus	sp.
021	V08A25	Humicola	sp.
022	V08A35	Aspergillus	sp.
023	V08B25	Humicola	sp.
024	V08B35	Mucor	sp.
025	V08C35	Aspergillus	sp.
026	V09A25	Humicola	sp.
027	V09A35	Aspergillus	niger
028	V09B25	Humicola	sp.
029	V09C35	Fusarium	sp.
030	V10A25	Aspergillus	sp.
031	V10A35	Aspergillus	sp.
032	V10B25	Aspergillus	sp.
033	V10B35	Aspergillus	sp.
034	V10C35	Aspergillus	sp.
035	V12A25	Aspergillus	oryzae
036	V12A35	Aspergillus	niger
037	V12B25	Fusarium	sp.
038	V12B35	Aspergillus	niger
039	V12C35	Aspergillus	niger
040	V13A25	Aspergillus	niger
041	V13A35	Aspergillus	sp.
042	V13B25	Geotrichum	sp.
043	V13B35	Aspergillus	sp.
044	V13C35	Aspergillus	sp.
045	V14A25	Humicola	sp.
046	V14A35	Aspergillus	sp.
047	V14B25	Humicola	sp.
048	V14B35	Aspergillus	sp.
049	V14C35	Aspergillus	sp.
050	V15A35	Aspergillus	sp.
051	V15B25	Geotrichum	sp.
052	V15B35	Aspergillus	sp.
053	V15C35	Aspergillus	sp.
054	V16A25	Penicillium	sp.
055	V16A35	Aspergillus	sp.
056	V16B25	Humicola	sp.
057	V16B35	Aspergillus	sp.
058	V16C35	Aspergillus	sp.
059	V19A25	Fusarium	sp.
060	V19A35	Aspergillus	sp.
061	V19B25	Geotrichum	sp.
062	V19B35	Aspergillus	sp.
063	V19C35	Geotrichum	sp.
064	V20A25	Humicola	sp.

ANEXO II. Colección de hongos filamentosos aislados en medios de cultivo específicos e identificados (continuación).

NUMERO CLAVE	ESPECIE	NUMERO CLAVE	ESPECIE
065	V20A35	Aspergillus	sp.
066	V20B25	Humicola	sp.
067	V20B35	Aspergillus	sp.
068	V20C35	Humicola	sp.
069	V21A35	Aspergillus	sp.
070	V21B35	Aspergillus	sp.
071	V21C35	Aspergillus	sp.
072	V22A25	Penicillium	sp.
073	V22B25	Penicillium	sp.
074	V22B35	Aspergillus	sp.
075	V22C35	Humicola	sp.
076	V23A25	Penicillium	sp.
077	V23A35	Aspergillus	sp.
078	V23B25	Humicola	sp.
079	V23C35	Fusarium	sp.
080	V24A25	Humicola	sp.
081	V24A35	Aspergillus	sp.
082	V24B25	Humicola	sp.
083	V24B35	Aspergillus	sp.
084	V24C35	Humicola	sp.
085	V25A25	Humicola	sp.
086	V25A35	Aspergillus	sp.
087	V25B25	Humicola	sp.
088	V25B35	Geotrichum	sp.
089	V25C35	Aspergillus	sp.
090	V26A25	Penicillium	sp.
091	V26A35	Fusarium	sp.
092	V26B25	Humicola	sp.
093	V26B35	Geotrichum	sp.
094	V27A25	Rhizopus	sp.
095	V27A35	Geotrichum	sp.
096	V27B25	Humicola	sp.
097	V27B35	Geotrichum	sp.
098	V27C35	Humicola	sp.
099	V28A25	Geotrichum	sp.
100	V28A35	Aspergillus	sp.
101	V28B25	Fusarium	sp.
102	V28B35	Humicola	sp.
103	V28C35	Aspergillus	sp.
104	V29A25	Geotrichum	sp.
105	V29B25	Humicola	sp.
106	V29B35	Aspergillus	niger
107	V29C35	Aspergillus	sp.
108	V30A35	Humicola	sp.
109	V30B25	Humicola	sp.
110	V31A25	Fusarium	sp.
111	V31A35	Aspergillus	sp.
112	V31B25	Humicola	sp.
113	V31B35	Aspergillus	sp.
114	V32A35	Aspergillus	sp.
115	V32B25	Aspergillus	niger
116	V33A25	Penicillium	roquefortii
117	V33B25	Trichoderma	sp.
118	V33B35	Trichoderma	sp.
119	V33C35	Aspergillus	niger
120	V34A25	Aspergillus	niger
121	V34C35	Humicola	sp.
122	V35A25	Penicillium	sp.
123	V35C35	Rhizopus	sp.
124	V36A25	Aspergillus	niger
125	V37A25	Fusarium	sp.

ANEXO II. Colección de hongos filamentosos aislados en medios de cultivo específicos e identificados (continuación).

NUMERO CLAVE	ESPECIE	NUMERO CLAVE	ESPECIE
001	C01B25 <i>Fusarium</i> sp.	039	C09B25 <i>Humicola</i> sp.
002	C01B35 <i>Aspergillus niger</i>	040	C09C25 <i>Humicola</i> sp.
003	C01C35 <i>Aspergillus niger</i>	041	C09C35 <i>Humicola</i> sp.
004	C02A25 <i>Aspergillus niger</i>	042	C10A25 <i>Humicola</i> sp.
005	C02B35 <i>Aspergillus</i> sp.	043	C10B25 <i>Rhizopus</i> sp.
006	C02C25 <i>Humicola</i> sp.	044	C10C25 <i>Humicola</i> sp.
007	C02C35 <i>Humicola</i> sp.	045	C10C35 <i>Geotrichum</i> sp.
008	C03A25 <i>Rhizopus</i> sp.	046	C11A25 <i>Humicola</i> sp.
009	C03B25 <i>Aspergillus</i> sp.	047	C11B25 <i>Aspergillus fumigatus</i>
010	C03B35 <i>Aspergillus niger</i>	048	C11B35 <i>Aspergillus niger</i>
011	C03C25 <i>Humicola</i> sp.	049	C11C25 <i>Geotrichum</i> sp.
012	C03C35 <i>Aspergillus</i> sp.	050	C11C35 <i>Humicola</i> sp.
013	C04A25 <i>Fusarium</i> sp.	051	C12A25 <i>Mucor</i> sp.
014	C04B25 <i>Fusarium</i> sp.	052	C12B25 <i>Fusarium</i> sp.
015	C04B35 <i>Trichoderma</i> sp.	053	C12B35 <i>Humicola</i> sp.
016	C04C25 <i>Trichoderma</i> sp.	054	C12C25 <i>Fusarium</i> sp.
017	C04C35 <i>Aspergillus</i> sp.	055	C12C35 <i>Fusarium</i> sp.
018	C05A25 <i>Humicola</i> sp.	056	C13A24 <i>Penicillium</i> sp.
019	C05B35 <i>Aspergillus</i> sp.	057	C13B25 <i>Aspergillus</i> sp.
020	C05C25 <i>Humicola</i> sp.	058	C13B35 <i>Aspergillus niger</i>
021	C05C35 <i>Fusarium</i> sp.	059	C13C25 <i>Penicillium</i> sp.
022	C06A25 <i>Fusarium</i> sp.	060	C13C35 <i>Fusarium</i> sp.
023	C06B25 <i>Aspergillus</i> sp.	061	C14A25 <i>Fusarium</i> sp.
024	C06B35 <i>Humicola</i> sp.	062	C14B25 <i>Aspergillus</i> sp.
025	C06C25 <i>Mucor</i> sp.	063	C14B35 <i>Aspergillus</i> sp.
026	C06C35 <i>Rhizopus</i> sp.	064	C14C25 <i>Humicola</i> sp.
027	C07A25 <i>Humicola</i> sp.	065	C14C35 <i>Aspergillus oryzae</i>
028	C07B25 <i>Humicola</i> sp.	066	C15A25 <i>Aspergillus</i> sp.
029	C07B35 <i>Aspergillus</i> sp.	067	C15B25 <i>Fusarium</i> sp.
030	C07C25 <i>Humicola</i> sp.	068	C15B35 <i>Aspergillus</i> sp.
031	C07C35 <i>Aspergillus niger</i>	069	C15C25 <i>Penicillium roquefortii</i>
032	C08A25 <i>Acremonium</i> sp.	070	C15C35 <i>Drechslera dematioidea</i>
033	C08A35 <i>Aspergillus</i> sp.	071	C16A25 <i>Aspergillus niger</i>
034	C08B25 <i>Fusarium</i> sp.	072	C16B25 <i>Fusarium</i> sp.
035	C08B35 <i>Aspergillus</i> sp.	073	C16B35 <i>Aspergillus</i> sp.
036	C08C25 <i>Fusarium</i> sp.	074	C16C25 <i>Aspergillus niger</i>
037	C08C35 <i>Aspergillus oryzae</i>	075	C16C35 <i>Aspergillus</i> sp.
038	C09A25 <i>Humicola</i> sp.	076	C17A25 <i>Penicillium</i> sp.

ANEXO II. Colección de hongos filamentosos aislados en medios de cultivo específicos e identificados (continuación).

NUMERO	CLAVE	ESPECIE	NUMERO	CLAVE	ESPECIE
-----	-----	-----	-----	-----	-----
077	C17B25	Aspergillus niger	115	C26C25	Fusarium sp.
078	C17B35	Aspergillus niger	116	C26C35	Geotrichum sp.
079	C17C25	Fusarium sp.	117	C27A25	Penicillium sp.
080	C17C35	Aspergillus niger.	118	C27A35	Aspergillus sp.
081	C18A35	Fusarium sp.	119	C27B25	Aspergillus sp.
082	C18B25	Fusarium sp.	120	C27B35	Aspergillus sp.
083	C18C25	Trichoderma harzianum	121	C27C35	Fusarium sp.
084	C19A35	Aspergillus sp.	122	C28A35	Aspergillus sp.
085	C19B25	Aspergillus sp.	123	C28B25	Aspergillus niger
086	C19C25	Trichoderma sp.	124	C28C25	Geotrichum sp.
087	C20A25	Penicillium sp.	125	C28C35	Aspergillus sp.
088	C20B25	Fusarium sp.	126	C29C35	Aspergillus sp.
089	C20C25	Fusarium sp.	127	C30C25	Geotrichum sp.
090	C20C35	Aspergillus sp.	128	C31B35	Aspergillus sp.
091	C21A25	Fusarium sp.	129	C31C35	Geotrichum sp.
092	C21B25	Aspergillus sp.	130	C32C25	Aspergillus sp.
093	C21C25	Fusarium sp.	131	C32C35	Aspergillus niger
094	C22A25	Fusarium sp.	132	C33B35	Aspergillus niger
095	C22B35	Humicola sp.	133	C33C25	Humicola sp.
096	C22C25	Fusarium sp.	134	C33C35	Humicola sp.
097	C22C35	Aspergillus sp.	135	C34B35	Aspergillus sp.
098	C23A25	Geotrichum sp.	136	C34C25	Humicola sp.
099	C23B25	Aspergillus sp.	137	C35B35	Aspergillus niger
100	C23C25	Fusarium sp.	138	C35C25	Geotrichum sp.
101	C23C35	Fusarium sp.	139	C36A35	Aspergillus sp.
102	C24A25	Humicola sp.	140	C37C25	Aspergillus niger
103	C24A35	Aspergillus sp.	141	C38B35	Fusarium sp.
104	C24B25	Fusarium sp.	142	C38C25	Geotrichum sp.
105	C24C25	Geotrichum sp.	143	C39C35	Aspergillus oryzae
106	C24C35	Geotrichum sp.	144	C40A35	Aspergillus niger
107	C25A25	Humicola sp.	145	C40C35	Aspergillus niger
108	C25A35	Aspergillus sp.	146	C41A35	Aspergillus sp.
109	C25B25	Humicola sp.	147	C42A35	Aspergillus sp.
110	C25B35	Aspergillus sp.			
111	C25C25	Geotrichum sp.			
112	C26A25	Aspergillus sp.			
113	C26B25	Fusarium sp.			
114	C26B35	Geotrichum sp.			

ANEXO III. Análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1960), de los resultados de pH final y % de degradación de cafeína en cultivos de hongos filamentosos aislados de Veracruz en medio (A) a 25°C.

A) Análisis de varianza del pH

Fuente variación	df	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamientos	23	14.2	0.617	24.68
Error	24	0.62	0.025	
Total	47	14.82		

Valor de F en tablas F23, 24=2.0

B) Análisis de varianza de la degradación de cafeína

Fuente variación	df	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamientos	23	17 240.38	749.92	2906
Error	24	6.21	0.258	
Total	47	17 246.59		

Valor de F en tablas F23, 24=2.0

C) Prueba de rangos múltiples

No.	especie	pH final	(*)	% degrad. cafeína	(*)
01	<i>Aspergillus sp.</i>	5.1	a	38.00	
02	<i>Aspergillus sp.</i>	6.1	e,d	26.79	j
03	<i>Geotrichum sp.</i>	7.1	i	62.75	o
04	<i>Aspergillus sp.</i>	6.5	h	12.48	
05	<i>Aspergillus sp.</i>	6.5	g	24.39	m
08	<i>Humicola sp.</i>	5.3	a	28.25	
09	<i>Humicola sp.</i>	6.1	e,f	26.69	j
10	<i>Aspergillus sp.</i>	5.6	c	9.76	
12	<i>A. oryzae</i>	6.6	h	61.93	o
13	<i>A. niger</i>	6.9	i	42.87	
14	<i>Humicola sp.</i>	6.9	i	25.25	k,l,m
16	<i>Penicillium sp.</i>	6.2	f	26.25	j,k
19	<i>Fusarium sp.</i>	5.8	c	26.20	j,k,l
20	<i>Humicola sp.</i>	5.9	g	7.44	
22	<i>Penicillium sp.</i>	6.3	e,f	23.69	n
23	<i>Penicillium sp.</i>	6.1	b,c	6.23	
24	<i>Humicola sp.</i>	5.5	a,b	17.80	
25	<i>Humicola sp.</i>	5.8	b,c	8.55	
26	<i>Penicillium sp.</i>	5.5	b,c	15.20	
27	<i>Rhizopus sp.</i>	5.6	b,c	20.02	
28	<i>Geotrichum sp.</i>	6.7	h	33.19	
29	<i>Geotrichum sp.</i>	6.9	i	24.15	n
31	<i>Fusarium sp.</i>	5.7	c	26.96	j
33	<i>P. roquefortii</i>	6.5	g,h	82.00	

(*) En las cepas que comparten la misma letra, no hay diferencia significativa en sus respuestas con un nivel de significancia de 5%.