



Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

Título: Levaduras pectinolíticas como alternativa biotecnológica para la valorización de los residuales del café

Tesis presentada en opción al título académico de

MASTER EN BIOTECNOLOGIA
MENCIÓN AMBIENTAL

Autor: Ing. Dulce María González Vinagre

Tutor: Dr. Manuel de Jesús Serrat Díaz

Consultante: Dr. Pascual Caro Cayado

Abril del 2005
“Año de la Alternativa Bolivariana para las Americas”

**A mi papá,
Cuya ausencia definitiva, le impidió ver la culminación de este
trabajo, fruto de su *Amor* y constante sacrificio.**

**A mi mamá,
Por su entrega y por ser este sueño también suyo.**

**A mis niños y esposo,
Por ser mi razón, por apoyarme y alentarme a cruzar tantos
obstáculos pero, llegar al final.**

No quiero cerrar las escrituras de este trabajo sin agradecer a un gran número de compañeros, que desinteresadamente han tenido la bondad de ofrecerme su dedicación y apoyo para la culminación del mismo.

Dra. **Rosa C. Bermúdez**: Por confiar en mi, por apoyarme siempre en la terminación de este trabajo.

Dr. **Manuel Serrat**, Por acceder a ser mi tutor, por su asesoramiento, por su colaboración, por el tiempo dedicado a este trabajo.

MsC.**Tamara Valverde**: Por su incondicional ayuda, por alentarme a seguir siempre adelante, por su amistad.

Dra. **Mercedes Anechina**, Por ser la que permitió, que tomara la decisión de terminar este trabajo, pese a las dificultades que tuviera que afrontar.

Dra. **Alina Marañón**: Por estar siempre dispuesta ayudarme.

Dra: **Angela Borroto**: Por sus acertados consejos.

Lic. **Isabel Aguilera**: Por las intensas horas de trabajo compartidos, por tener siempre una respuesta complaciente.

Al colectivo de trabajadores del Centro de Investigaciones en Bioalimento Animal, en especial Téc. Hilda Sánchez.

Al colectivo de trabajadores del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, quienes amablemente permitieron hacer uso de sus instalaciones y equipamientos sin reparo.

A mis compañeros de la Escuela de Hotelería y Turismo, Ciego de Avila que siempre estuvieron dispuestos a colaborar conmigo.

A los choferes Yoel de las Cuevas y Jesús Peleteiro que me permitieron estar al menos una hora con mi papá cuando me sorprendió su muerte.

Al colectivo de trabajadores de Escuela de Hotelería y Turismo Santiago de Cuba, y del Gran Hotel Formatur, por tener siempre espacio para mi.

A Gabriel, Yamila, Morris, Dagmara, por su amistad.

A todos los que me ayudaron y confiaron en mi.

GRACIAS

RESUMEN

La búsqueda de alternativas biotecnológicas para el aprovechamiento integral de los residuales generados en el beneficio húmedo del café, constituye una problemática actual. El presente trabajo aborda el empleo de levaduras pectinolíticas (*Kluyveromyces marxianus* y *Hansenula jadinii*) en la valorización de estos residuales mediante el estudio de la biotransformación del residual pulpa de café + mucílago sometido a proceso de fermentación limitada de oxígeno. Se demostró que en los residuales procesados por la tecnología con bajo consumo de agua, la *Kluyveromyces marxianus* fermentó el 89,6 % de los azúcares presentes en el medio. La composición microbiana durante el proceso fermentativo se caracterizó por una inhibición del crecimiento de levaduras y bacterias en presencia de bisulfito, sin embargo la adición de nutrientes favoreció el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*. La producción de alcohol y PG se vio favorecido en *K. marxianus*, proceso que se ve afectado por el suministro de bisulfito no así con la adición de nutrientes. Los resultados demuestran la potencialidad de los residuos de café de ser aprovechados por fermentación en presencia de levaduras pectinolíticas para la coproducción de PG y alcohol.

ABSTRAC

The searching of biotechnological alternatives for the whole advantage wastes generated in the coffee moist profit is a current problem. In this work the use of pectinolytic yeasts (*Kluyveromyces marxianus* y *Hansenula jadinii*) in the valuation of these wastes through the study of coffee pulp-mucilage biotransformation under oxygen limited fermentation is considered. In the wastes processed by the low water consumption, *Kluyveromyces marxianus* fermented an 89,6 % of sugars presented in the medium. The microbial composition during the fermentation was characterized by an inhibition of yeasts and bacteria growth in presence of bisulphite; however, the addition of nutrients favoured the growth in presence of bisulphite. The production of alcohol and polygalacturonase was stimulated in *Kluyveromyces marxianus*, and it was affected by bisulphite, nor by nutrient addition. The results in general, showed the potentialities of coffee wastes through fermentation with pectinolytic yeasts for the co-production of alcohol and polygalacturonase.

INDICE

	Página
I.- Introducción	1
II.- Revisión Bibliográfica	3
2.1.- Aprovechamiento de los residuales del café.	3
2.2.- Fermentación.	4
2.3.-Utilización de las levaduras en el aprovechamiento de residuales	4
2.4.-Producción de enzimas pectinolíticas a partir de microorganismos.	5
2.5.-Posibles usos de los residuales del café.	7
III. Materiales y Métodos	8
3.1.- Residuales	8
3.2.- Microorganismos.	8
3.3.- Cinética del consumo de carbohidratos en la fracción líquida del residual.	8
3.3.1 Preparación del sustrato	8
3.3.2 Preparación del inóculo	8
3.3.3 Cinética de consumo de carbohidratos	9
3.4. Estudio de la influencia de la adición de bisulfito y nutrientes en la producción de alcohol y PG.	9
3.4.1 Diseño experimental	9
3.4.2 Fermentación del residual.	9
3.5 Análisis microbiológico	10
3.6 Determinaciones Analíticas	10
3.6.1 Procedimiento general	10
3.6.2 Preparación y análisis de la fracción líquida.	10
3.6.3 Determinaciones colorimétricas	11
3.7. Determinación de la actividad enzimática PG	11
3.8 Análisis estadístico	11
IV. Resultados y Discusión.	12
4.1. Cinética del consumo de carbohidratos totales solubles por <i>Kluyveromyces. marxianus</i> .	12
4.2-. Transformaciones operadas en la composición microbiológica del residual durante la fermentación bajo condiciones de limitación de oxígeno (fermentación alcohólica).	12
4.3-. Fermentación Alcohólica.	14
4.3.1. Influencia de la adición de bisulfito y nutrientes sobre la producción de alcohol y PG.	14
4.3.2 Cambios operados en la composición química de la fracción líquida.	15
V. Conclusiones.	18
VI. Recomendaciones	19
VII. Bibliografía.	20
Anexos	24

I. INTRODUCCION.

El problema que afronta la Humanidad es el desarrollo de la vida misma, su propia existencia en un mundo en el que tiene que enfrentar peligros reales relacionados fundamentalmente con las esferas de: la alimentación, la salud, el medio ambiente y la energía.

Las realidades del mundo de hoy son alarmantes en cada una de las esferas lo que hace que las soluciones o paliativos a estos desafíos no pueden esperar. Se trata de buscar respuestas que satisfagan los requerimientos para vivir con más calidad y en ocasiones permitir la vida, preservando la naturaleza y solucionando el problema global de la propia existencia humana (Novo, 2002).

El cultivo del café en zonas montañosas de Santiago de Cuba llega a ser el 80 % del total que se cultiva en Cuba. Desde su introducción a nuestro país, el café ha constituido uno de los tres cultivos tradicionales de nuestra estructura agraria, adquiriendo significativa importancia económica como rubro exportable por su alta demanda en el consumo externo y como base fundamental de la economía en las zonas montañosas donde se desarrollan.

Como en la mayoría de los países cafetaleros, en Cuba predomina el beneficiado del café por el método húmedo, debido a la mejor calidad del grano. Con la aplicación de este proceso se generan grandes volúmenes de subproductos como son: la pulpa, el mucílago y el pergamino, los cuales representan respectivamente, el 40, 20 y 3.4% del peso de la cereza, además de sus aguas residuales; lo que ocasiona una contaminación ambiental elevada en los cuerpos receptores por el alto contenido de materia biodegradable y el bajo pH de sus residuales líquidos (Zuluaga, 1989 citado por Bermúdez y col., 2001a).

Por su composición química la pulpa presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes procesos o tecnologías como son: producción de biogás, alimento animal y como sustrato en la producción de setas comestibles. Estas tecnologías permiten utilizarla como subproducto, eliminar la contaminación, y a su vez generar beneficios en el orden económico, social y ambiental.

El desarrollo de la tecnología de fermentación en estado sólido, para el enriquecimiento proteico de la pulpa de café y la producción de enzimas pectinolíticas por hongos filamentosos ha sido estudiado por Trejo-Hernández (1991), Antier (1993) y otros autores. Además, se han realizados estudios sobre la utilización de estas enzimas en el desmucilaginado del café, observándose mejorías en la calidad del grano (Favela, 1989).

Las levaduras, debido a sus altas velocidades de crecimiento, facilidades de cultivo, recuperación y valor nutricional, unido a que las especies que se han utilizado históricamente se consideran microorganismos no peligrosos al hombre, han sido y son cultivadas sobre numerosos residuales, tales como melazas, suero de leche y leñas sulfíticas, a escala industrial para la producción de proteína unicelular, al tiempo que se aprovechan estos residuales (Ezcurra, 1990).

La utilización de levaduras en fermentación en estado sólido, aunque más limitada que en los hongos filamentosos, también ha sido reportada. Joshi y Sandhu (1994) y Joshi y col. (1995) describen las posibilidades de las levaduras en la producción concomitante de alcohol y alimento animal por fermentación en estado sólido del bagazo de manzana.

García-Garibay y col. (1987) describen las potencialidades de las levaduras en la producción simultánea de enzimas pécticas y proteína unicelular sobre suero de leche utilizando *Kluyveromyces fragilis*.

La actividad pectinolítica en levaduras es una cualidad relativamente rara y está restringida a unas pocas especies de los géneros de *Kluyveromyces*, *Cándida*, *Deberomyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, entre otras (Serrat, 2003). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao y del café, de uvas, higos y asociados al deterioro de algunos alimentos y frutas en conservas (Blanco y col., 1999).

Por estas razones, la búsqueda de alternativas biotecnológicas para el aprovechamiento integral de los residuales generados en el beneficio húmedo del café, constituye una problemática de actualidad.

Teniendo en cuenta la participación de las levaduras en la fermentación natural de los residuales del café y la tradición existente en la utilización de estos microorganismos en procesos biotecnológicos, nos planteamos la siguiente hipótesis:

“Es posible coproducir alcohol, poligalacturonasa y pectina mediante fermentación de los residuales del beneficio húmedo del café con levaduras pectinolíticas”.

Partiendo de esta hipótesis, nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Estudiar la biotransformación del residual pulpa de café – mucílago sometido a fermentación limitada de oxígeno con levaduras pectinolíticas.

Objetivos Específicos:

1. Estudiar la cinética del consumo de carbohidratos en la fracción líquida del residual del beneficio húmedo del café por *Kluyveromyces marxianus*.
2. Caracterizar los cambios operados en la composición microbiana del residual durante su fermentación en presencia de levaduras pectinolíticas.
3. Evaluar la influencia de la desinfección con bisulfito y la adición de nutrientes sobre la producción de alcohol y poligalacturonasa a partir de los residuales del beneficio húmedo del café en dos cepas pectinolíticas de levaduras.
4. Caracterizar químicamente la fracción líquida de los residuales una vez fermentados con levaduras pectinolíticas.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Aprovechamiento de los residuales del café.

Las plantas de café son originarias de la antigua Etiopia. Los árabes fueron los primeros en descubrir las virtudes y las posibilidades económicas del café. Los tipos más importantes de café en el comercio internacional son los *arabica* y *canephora*. El café es la materia prima, después del petróleo, que más divisas mueve en el mundo.

El proceso del beneficio del café (Fig.1), predominante en la mayoría de los países cafetaleros, debido a la mejor calidad del grano, genera grandes volúmenes de residuales como son: la pulpa, el mucílago y el pergamino, los cuales representan el 40, 20 y 3,4 % respectivamente del peso de la cereza, además de las aguas residuales, ocasionando una contaminación ambiental elevada en los cuerpos receptores por el alto contenido de materia biodegradable y el bajo pH de sus residuales líquidos (Zuluaga, 1989).

Los residuales agroindustriales del café, al igual que otros, poseen componentes muy valiosos (véase Anexos, Tablas 1, 2 y 3), constituyendo una fuente de recursos renovables y de materia prima para industrias de variada magnitud, generalmente asociadas al área rural.

La pulpa de café ha sido ampliamente estudiada con vista a valorar sus posibles aplicaciones, resultando las mejores alternativas para su explotación: utilizarla como sustrato para el cultivo de hongos comestibles (Martínez-Carrera, 1993; Bermúdez y col., 1994), promover su descomposición natural para convertirlo en abono orgánico y devolverlo nuevamente a los cafetales (Aranda, 1991), como combustible directo o biogás (Boopathy, 1989; Calzada, 1990), forrajes (Cabezas y col., 1978; Tapia y col., 1990), alcohol etílico y sus derivados (ácidos acéticos, polímeros y otros) (Marco-Méndez, 1981); melazas para alimentación animal y humana así como para la extracción de pectinas y otros compuestos químicos (Bressani, 1978). También existen trabajos acerca de la producción de poligacturonasa a partir de levaduras pectinolíticas aisladas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café (Serrat, 2003).

La Figura 2 muestra las diferentes alternativas de uso de la pulpa de café. A pesar de las múltiples posibilidades de utilización de la pulpa de café, teniendo en consideración su composición, no todas son factibles en la práctica, debido a las peculiaridades de este residual: se genera solamente durante una etapa del año, su carácter disperso, sus altos contenidos de agua y fácil contaminación por microorganismos.

Teniendo en cuenta las posibilidades de ser utilizado en la alimentación animal, reviste particular importancia la biodegradación de los compuestos tóxicos presentes (cafeína, polifenoles). Varios investigadores han trabajado la línea, detoxificando la pulpa, mediante el empleo de hongos filamentosos capaces de utilizar la cafeína como única fuente de nitrógeno, siendo la urea el último producto de este proceso de degradación (Favela, 1989; Aquiahuatl, 1992).

El desarrollo de la tecnología de fermentación en estado sólido, para el enriquecimiento proteico de la pulpa de café y la producción de enzimas pectinolíticas por hongos filamentosos ha sido estudiado por Trejo-Hernández (1991), Antier (1993) y otros autores. Además, se han realizados estudios sobre la utilización de estas enzimas en el desmucilaginado del café, observándose mejorías en la calidad del grano. (Favela, 1989).

Marco-Mendéz (1981) reporta la producción de alcohol a partir de los jugos de pulpa y mucílago empleando levaduras del género *Saccharomyces*, lo cual es corroborado por los estudios de Serrat (2003).

2.2. Fermentación.

Es la acción de ciertas enzimas específicas (fermentos), producidas por microorganismos (bacterias, levaduras, hongos) en la transformación de un sustrato a producto. Las fermentaciones pueden ocurrir de manera “espontánea”, cuando están presentes todos los factores necesarios para dicho proceso, pero también pueden ser diseñadas y controladas por el hombre con diferentes propósitos.

La Fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable, producida mediante un proceso metabólico por microorganismos o por enzimas que provocan reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva la energía suficiente para su metabolismo. Las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen fuera del contacto con el aire, o aeróbicas, que sólo tienen lugar en presencia de oxígeno.

Las fermentaciones más comunes en la industria de alimentos son las del azúcar con formación de alcohol etílico, que tienen lugar en la elaboración de vino, cerveza, sidra; y alcohol; con formación de ácido acético, en la elaboración del vinagre; y la fermentación láctica, en la elaboración de quesos y yogures.

Actualmente en la industria fermentativa se utilizan tanques de fermentación en los que ésta se realiza en condiciones controladas de temperatura y presión y que permiten regular constantemente la entrada y salida de productos.

La fermentación mejora el contenido nutritivo de los alimentos por la biosíntesis de las vitaminas, los aminoácidos esenciales y las proteínas, al volver más digeribles las proteínas y las fibras, proporcionar más micronutrientes y degradar los factores antinutritivos. La producción de alimentos fermentados también es importante para sumar valor a las materias primas agrícolas. (Jonas, 2000).

2.3. Utilización de las levaduras en el aprovechamiento de residuales.

Desde tiempos remotos las levaduras, han estado asociadas fundamentalmente a la producción de alimentos y bebidas fermentadas (pan, cerveza, vino, ron). Ante la actual crisis alimentaria mundial que enfrenta la humanidad, donde los animales compiten por los mismos alimentos que el hombre, ha cobrado importancia el empleo de microorganismos como fuentes proteicas para la alimentación animal y humana.

Las levaduras, debido a sus altas velocidades de crecimiento, facilidades de cultivo, recuperación y valor nutricional, unido a que las especies que se han utilizado históricamente se consideran microorganismos no peligrosos al hombre, han sido y son cultivadas sobre numerosos residuales, tales como melazas, suero de leche y lejías sulfíticas, a escala industrial para la producción de proteína unicelular, al tiempo que se aprovechan estos residuales (Ezcurra, 1990).

La utilización de levaduras en fermentación en estado sólido, aunque más limitada que en los hongos filamentosos, también ha sido reportada. Joshi y Sandhu (1994) y Joshi y col. (1995) describen las posibilidades de las levaduras en la producción concomitante de alcohol y alimento animal por fermentación en estado sólido del bagazo de manzana.

García-Garibay y col, (1987) describen las potencialidades de las levaduras en la producción simultánea de enzimas pécticas y proteína unicelular sobre suero de leche utilizando *Kluyveromyces fragilis*.

Es conocido que las levaduras ocupan un lugar relevante en la fermentación natural (desmucilaginado) del café despulpado (Jones y Jones, 1984) y que reúnen características ventajosas, como su capacidad de ser aerobias facultativas, poseer mayores velocidades de crecimiento que los mohos y tener un alto contenido de proteínas y vitaminas, entre otras. Serrat y col. (2002) caracterizaron preliminarmente la microflora de levaduras que tiene como hábitat los frutos del café y los residuales de su beneficio húmedo, demostrando las potencialidades biotecnológicas.

2.4. Producción de enzimas pectinolíticas a partir de microorganismos.

Un componente principal de las paredes celulares vegetales lo constituyen las sustancias pécticas, las que junto a la lignina desempeñan la función de garantizar la coherencia e integridad de los tejidos, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Se encuentran estrechamente relacionadas en la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales. La degradación natural de las sustancias pécticas tiene lugar por la acción de las enzimas pécticas o pectinasas. (De Vries y Visser, 2001).

Las sustancias pécticas son heteropolisacáridos complejos, de naturaleza ácida; constituyen una fracción importante de los alimentos, desempeñando importantes funciones en la evolución de las estructuras celulares. Se encuentran estrechamente relacionados en la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales. Están formadas por dos regiones diferentes, una de ellas, la llamadas 'lisas', que están constituidas por una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1,4-glucosídicos (Pérez y col.,2000). Esta región es la fracción principal de la molécula de pectina, y es catalizada por la acción de enzimas endopoligacturonasas (EC 3.2.1.15). Estas enzimas se denominan enzimas pécticas o pectinasas y están clasificadas en depolimerizantes por promover la ruptura de la cadena principal.

Los microorganismos se encuentran extensamente distribuidos por su capacidad degradadora de los recursos naturales y un gran número de ellos son capaces de producir

enzimas pectinolíticas. Estos organismos desempeñan un importante papel en la biodegradación de la materia vegetal muerta. La producción de pectinasas por microorganismos depende básicamente de su género, especie, linaje y de las condiciones para su desarrollo (Fogarty y Ward, 1974).

La enzima péctica poligalacturonano liasa (PGL) es la fracción más comúnmente sintetizadas por las bacterias, seguida de la fracción poligalacturonasa (PG) y polimetilgalacturonano esterasa (PMGE). Con relación a los hongos, la variedad de enzimas pectinolíticas producidas es mayor en comparación con las bacterias. La fracción endo-PG, es la enzima de mayor ocurrencia en los hongos, las fracciones polimetilgalacturonasa (PMG) y polimetilgalacturonano liasa (PMGL) se presentan con una razonable frecuencia para diversos géneros fúngicos (Fogarty y Ward, 1974; Fogarty y Kelly, 1983; Whitaker, 1990).

La actividad pectinolítica en levaduras es una cualidad relativamente rara y está restringida a unas pocas especies de los géneros de *Kluyveromyces*, *Cándida*, *Deberomyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, entre otras (Serrat, 2003). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao y del café, de uvas, higos y asociados al deterioro de algunos alimentos y frutas en conservas (Blanco y col., 1999).

Tabla 4. Producción de PG en diferentes levaduras y mohos.

Organismo	Producción (U·mL⁻¹)	Tiempo de fermentación (h)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	0,4	72	Maldonado y Navarro, 1995
<i>Aspergillus niger</i>	1,4	48	Garcés y Martínez, 1985
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2,12	240	Barnby y col., 1990
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,3	48	Gainvors y col., 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	0,12	240	Markovic y col., 1985
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	17	24	Serrat, 2003

Fuente: Serrat, 2003.

Serrat (2003) aisló e identificó seis cepas de levaduras pectinolíticas de frutos y residuales del beneficio húmedo del café, pertenecientes a las especies *Hansenula jadinii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Debaryomyces vanrijae*, de las cuales la cepa correspondiente a la *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, presentó un actividad notablemente alta comparado con lo reportado para otras levaduras y mohos (Tabla 4).

2.5. Posibles usos de los residuales del café.

Estudios realizados con los subproductos de la agroindustria cafetalera, fundamentalmente con la pulpa, han estado encaminados a su empleo en la alimentación animal, quedando demostrado su bajo valor, por efectos tóxicos que producen sustancias presentes en los mismos, tales como cafeína, polifenoles y taninos, al ser incluidos en la dieta animal (Bressani, 1978). Sin embargo, Roussos y col. (1995) plantean que el valor nutritivo de estos materiales puede ser mejorado a través de la fermentación en estado sólido, utilizando cepas de microorganismos capaces de crecer sobre los mismos empleando como fuente de carbono y nitrógeno estas sustancias antifisiológicas, con vistas a lograr un enriquecimiento del contenido proteico, a la vez que se eliminan los efectos adversos para la alimentación y permitiendo la utilización del material fermentado para la obtención de otros metabolitos de interés.

El cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus spp.* comenzó en Cuba por el Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) en 1988, empleando subproductos de la agroindustria cañera (paja de caña) con resultados altamente positivos y con el consiguiente desarrollo de la tecnología. El Centro de Estudios en Biotecnología Industrial (CEBI) emplea los subproductos del café y el cacao como sustrato adecuados para el cultivo de setas, siendo superiores los rendimientos alcanzados respecto a los usados con la paja de caña (Bermúdez y col., 2001).

Según Bermúdez y col. (2001b) el *Pleurotus ostreatus f.sp. florida* (p-184) fue cultivado en varios sustratos agrícolas tales como pulpa de café y cacao y los autores refieren la obtención de una alta eficiencia biológica. También Bermúdez y col. (2002) evaluaron los efectos de las sales de calcio y manganeso en la producción del *Pleurotus sp* cultivada sobre pulpa de café (*Coffea canephora*, Pierre ex Froehner). Los resultados obtenidos arrojaron que se incrementan los rendimientos de las setas comestibles en bajas concentraciones de sulfato de manganeso.

En la Figura 3 se resumen algunas de las principales alternativas para el aprovechamiento del mucílago del café.

III. MATERIALES Y METODOS.

El trabajo experimental se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (Santiago de Cuba, Cuba).

3.1 Residuales.

Los residuales del beneficio húmedo del café se colectaron el 16 de Noviembre del 2004 en la despulpadora Complejo Nueva Esperanza (tecnología de bajo consumo de agua (Penagos, Colombia)), perteneciente al municipio Songo-La Maya, provincia Santiago de Cuba. La colecta se realizó transcurrida una hora del inicio del despulpe. Los residuales (mezcla de pulpa y suspensión de mucílago), correspondientes a frutos de *Coffea arabica* L, se tomaron justo a la salida del sistema de transporte (sinfín) hacia la caja de cáscara y se envasaron en un recipiente plástico con cierre hermético, el cual fue llenado hasta el límite de su capacidad (aproximadamente 20 Kg) con el fin de que no quedara aire libre en su interior. La muestra se trasladó al CEBI y guardada a 4 °C.

3.2 Microorganismos.

Se utilizaron las cepas pectinolíticas *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 y *Hansenula jadinii* CCEBI 2030 (P-8), ambas procedentes de la Colección de Cultivos del CEBI. Los microorganismos se conservaron en cuñas de agar extracto de malta (YMA) (Oxoid) a 4 °C.

3.3 Cinética del consumo de carbohidratos en la fracción líquida del residual.

3.3.1 Preparación del sustrato.

Se tomó una muestra homogénea de 150 g de pulpa más mucílago y se filtró al vacío (Sartorius AG) a través de un papel de filtración rápida, para la obtención del extracto líquido, libre de sólidos en suspensión.

3.3.2 Preparación del inóculo

Se utilizaron frascos Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, conteniendo 20 mL de medio YPS (composición, en g/L: extracto de levadura (Oxoid), 10; peptona (Biocen, La Habana), 20 y sacarosa, 20). El medio de cultivo se esterilizó a 115 °C, durante 15 min. Una vez enfriado, se inoculó con una colonia procedente de un cultivo fresco en YMA de la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011. Los frascos Erlenmeyer se incubaron en zaranda (P Select Rotabit) a 29 °C y 150 rpm durante 24 h. Este cultivo se utilizó como inóculo para el estudio de la cinética de consumo de carbohidratos.

3.3.3 Cinética de consumo de carbohidratos

A tubos de ensayos de 15 mL de volumen se añadieron 5mL del extracto líquido de pulpa más mucílago, cuya preparación se describe en 3.3.1. Entonces se inocularon (2 % (v/v) con el cultivo de *K. marxianus* preparado según se describe en 3.3.2. Los tubos se incubaron en estático a 30 °C. A intervalos de 12 h, incluido el tiempo inicial, durante 48 h, se retiraron tres tubos para la determinación de carbohidratos solubles por el método del Fenol- Sulfúrico (Dubois y col., 1956). Para ello, el cultivo se centrifugó (Clay Adams, Inc., USA) a 5000 rpm durante 5 min⁻¹ para separar la biomasa. A 1 mL del sobrenadante se le añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 10 % (m/v), se homogenizó y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se sometió al ensayo de carbohidratos.

3.4. Estudio de la influencia de la adición de bisulfito y nutrientes en la producción de alcohol y PG.

3.4.1 Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (3×2×2) con tres repeticiones. Los factores y niveles considerados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental utilizado.

Factores	Niveles		
	1	2	3
(A) Cepa	Control (sin inocular)	<i>K. marxianus</i>	<i>H. jadinii</i>
(B) Desinfección	-	+ ⁽¹⁾	
(C) Adición de nutrientes	-	+ ⁽²⁾	

¹ Bisulfito de sodio a 100 mg/Kg

² Adición de (NH₄)SO₄ y KH₂PO₄ para suplir el 20% de requerimientos de N y P en levaduras, según la formulación del medio sintético para levaduras (Barnett y col., 1983)

3.4.2 Fermentación del residual.

Cada unidad experimental consistió de 100 g de una mezcla homogénea y representativa de los residuales pulpa y suspensión de mucílago, contenidos en una bolsa de polietileno translúcida, a los que se adicionó, cuando fue necesario, bisulfito de sodio o nutrientes, o ambos en las proporciones señaladas. Los mencionados componentes se adicionaron en forma sólida. En el caso de la adición de bisulfito, este se añadió 2 h antes de inocular la levadura. Las unidades experimentales se inocularon a razón del 2 % con un cultivo de la cepa correspondiente (*Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 o *Hansenula jadinii* CCEBI 2030) en YPS, preparado del mismo modo que se describe en 3.3.2. Entonces las bolsas fueron cerradas, anudando fuertemente el extremo de la abertura y se le practicaron algunos finos agujeros en la parte superior, para garantizar la salida de los gases. La fermentación se desarrolló en estático a 30 °C durante 36 horas.

3.5 Análisis microbiológico.

Una fracción representativa de la muestra a analizar se suspendió en agua destilada estéril a razón de 1 g de muestra por 10 mL de agua destilada. La suspensión se agitó en Zaranda (P Select Rotabit) a 150 rpm durante 1 h. Luego se realizaron diluciones seriadas de la suspensión en agua destilada estéril para la estimación de los diferentes grupos microbianos mediante el método del número más probable, utilizándose un volumen de suspensión en el ensayo de 10 µL. Para la enumeración de levaduras, bacterias y mohos se utilizó Agar Extracto de Malta (Biocen), Agar Nutriente (Biocen) y Agar Czapek Dox (Oxoid), respectivamente. El crecimiento de bacterias se chequeó a las 24 h de incubación (Mytron) a 30 °C, en tanto el de levaduras se efectuó a las 48 h y el de los mohos a los 7 días de incubación a la misma temperatura.

3.6 Determinaciones analíticas.

3.6.1 Procedimiento general.

Una vez culminada la fermentación, se preparó una muestra compósito integrada por las muestras pertenecientes a una misma variante experimental. Entonces, de la muestra compósito se tomaron dos porciones representativas, una para la separación de la fracción líquida, en tanto la otra se secó en estufa (Sartorius AG, Alemania) a 105 °C hasta peso constante (muestra sólida).

3.6.2 Preparación y análisis de la fracción líquida.

La porción correspondiente de la muestra compósito se filtró al vacío (Sartorius AG) a través de un paño de algodón para la obtención de la fracción líquida. A esta fracción se le determinó directamente:

- pH
- Contenido de sólidos totales (secado a 105 °C hasta peso constante).

Posteriormente, se centrifugó (Clay Adams, inc) a 6000 rpm durante 15 min y se desecharon los sólidos. A la fracción líquida libre de sólidos suspendidos se le determinó:

- Sólidos solubles (secado a 105 °C hasta peso constante)
- Carbohidratos (Método del Fenol – Sulfúrico).
- Azúcares reductores (Método de Somogyi – Nelson).
- Sustancias pécticas (Método del carbazol).
- Alcohol (Método de colorimetría y microdifusión).
- Taninos (Método de Folin-Denis).
- Acidez total (método volumétrico)

La fracción líquida se sometió a precipitación acetónica con acetona helada (75 % [v/v]) y entonces se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min. El sedimento se lavó dos veces con etanol absoluto helado y finalmente se disolvió en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0) (Serrat y col., 2002) para la determinación de:

- Proteína (Método de Lowry).
- Actividad Enzimática PG (Serrat, 2003)

3.6.3 Determinaciones colorimétricas

Tabla 6 Técnicas colorimétricas utilizadas.

Compuestos a determinar	Métodos (denominación)	Referencia del método
Azúcares reductores	Somogyi- Nelson	Somogyi, 1952; Nelson, 1957
Carbohidratos totales	Fenol- sulfúrico	Dubois y col., 1956
Proteínas totales	Lowry	Lowry y col., 1951
Sustancias pécticas	Ensayo de carbazol	Bitter y Muir, 1962
Taninos	Folin-Denis	APHA, 2004
Alcohol	Microdifusión y colorimetría	Conway, 1947

En la Tabla 6 se presentan las técnicas colorimétricas utilizadas para la determinación de los compuestos que se refieren. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec III (**Pharmacia LKB**). Todas las determinaciones se ejecutaron según el método de curva de calibración.

3.7 Determinación de la actividad enzimática PG

Se empleó como sustrato ácido poligalacturónico (PGA) (Sigma) 0.5 % (m/v) en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5.0. La mezcla de reacción consistió de 400 μ L de sustrato y 100 μ L de una dilución adecuada del enzima en el mismo tampón del sustrato. La reacción enzimática se desarrolló a 37 °C durante 10 min. La actividad de endoPG se estimó del incremento del poder reductor en el sustrato, determinado según el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1957). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol/min de extremos reductores (como ácido galacturónico) bajo las condiciones de ensayo.

3.8 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) multifactorial y en caso de existir diferencias significativas se efectuó la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cinética del consumo de carbohidratos totales solubles por *Kluyveromyces marxianus*.

Con el objetivo de establecer el tiempo de fermentación para los estudios que siguen, se siguió la cinética de consumo de azúcares bajo condiciones de limitación de oxígeno en el extracto líquido de pulpa y mucílago de café, empleando para ello la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como puede apreciarse, existe una disminución prácticamente lineal del contenido de azúcares en el medio. De estos datos se estimó la velocidad específica de crecimiento, la cual resultó ser de $0,077 \text{ h}^{-1}$. Este valor es similar a los reportados por Serrat y col. (2004) para esta misma cepa cultivada en melazas de remolacha y por Hensing y col. (1994) en estudios con otras estirpes de *K. marxianus*.

Como se ilustra en la Figura 4, *Kluyveromyces marxianus* ha fermentado el 89,6 % de los azúcares presentes en el medio a las 38 horas de cultivo, no apreciándose a tiempos mayores cambios significativos en la concentración residual de azúcares (dato no mostrado), por lo que se decidió fijar el tiempo de fermentación en 36 horas. El porcentaje de azúcares fermentables observado resulta un atractivo indicador sobre la idoneidad de la mezcla pulpa - mucílago de café para ser utilizada como sustrato por esta cepa cuando es cultivada bajo condiciones de limitación de oxígeno.

4.2.- Transformaciones operadas en la composición microbiológica del residual durante la fermentación bajo condiciones de limitación de oxígeno (fermentación alcohólica).

Las cepas de levadura utilizadas en este estudio difirieron sustancialmente en cuanto a su capacidad de sedimentación: la *K. marxianus* es una cepa de sedimentación rápida no floculante, en tanto *H. jadinii* es una cepa floculante, que forma gránulos de diámetro superior a 1 mm cuando se cultiva en medio líquido con agitación. Esto sugiere la posible existencia de una morfología celular filamentosa, bien sea mediada por la formación de pseudohifas o hifas verdaderas.

La población de mohos durante la fermentación alcohólica no superó los valores de 10^4 ufc/g . El carácter aerobio estricto y más lento crecimiento de los mohos incide esencialmente en esto (Serrat, 1998).

Para los controles sin inocular se observa muy poca variación en los conteos de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica (Fig. 5-A). Las levaduras crecen un poco mejor, favorecidas por el bajo pH del medio, con excepción de la variante con bisulfito y nutrientes, donde existe una fuerte inhibición del crecimiento en levaduras.

Si asumimos que la población dominante de levaduras corresponderá a las cepas objeto de este estudio (*K. marxianus* y *H. jadinii*), entonces podemos afirmar que estas

levaduras muestran inhibición de su crecimiento en presencia de bisulfito, siendo más marcado el efecto en *H. jadinii*, en particular cuando no se adicionan nutrientes (Figs. 5-B y 5-C). Esto podría explicarse si tenemos en cuenta que *K. marxianus* se aisló de un medio de enriquecimiento que contenía bisulfito a 160 mg/L (Serrat, 1998), por lo que es de suponer la existencia de una resistencia natural a este componente en esta cepa.

La adición de nutrientes favorece de forma evidente a *K. marxianus*, no siendo así en *H. jadinii* (Figs. 5-B y 5-C). La alta velocidad de crecimiento de la primera puede erigirse en una ventaja frente a la competencia que ejercen las bacterias por los mismos nutrientes.

En cuanto al conteo de bacterias se presenta un comportamiento similar al descrito para las levaduras, observándose un escaso o nulo crecimiento ante la adición de bisulfito. En cambio, para las variantes sin bisulfito se aprecia un activo crecimiento bacteriano (alcanzando casi las 10^9 ufc/g), el cual resulta mejor para aquellas donde se inocula *H. jadinii* (Figs. 5-B y 5-C). Cuando se inocula *K. marxianus*, en la variante sin bisulfito y sin nutrientes (Fig. 5-B), el crecimiento bacteriano es muy pobre, lo cual pudiera estar causado por la limitación de nutrientes que impone la levadura a la población bacteriana.

Estos resultados indican que el empleo de *K. marxianus* CCEBI 2011 resulta ventajoso, por cuanto es la cepa que mejor crece y, a la vez, limita el crecimiento de la microflora natural del residual. Por otro lado, *K. marxianus* es considerado un microorganismo GRAS (*Generally regarded as safe*), cualidad ésta de suma importancia si el uso de la de la cepa está dirigido hacia la obtención de productos grado alimentario, evitándose así los largos y rigurosos estudios toxicológicos que debe realizarse a todo alimento no convencional para conseguir su aprobación.

Los resultados obtenidos aquí, concuerdan con lo reportado por Serrat (2003). En el citado trabajo se utilizaron con éxito diferentes variantes de medios selectivos para el aislamiento de levaduras pectinolíticas en residuales del café, empleándose diferentes condiciones restrictivas para limitar el crecimiento de microorganismos no deseados, como fueron pHs bajos (para restringir el crecimiento bacteriano) y extracto de pulpa de café (para favorecer el crecimiento de microorganismos tolerantes a altas concentraciones de compuestos fenólicos). Los cultivos limitados de oxígeno estuvieron dirigidos a beneficiar el crecimiento de levaduras con respecto a los mohos, lo cual ha sido confirmado por los resultados antes descritos.

Otro hecho significativo que se desprende de este estudio es la elevada carga microbiana que presentan los residuales pulpa de café y mucílago, procedentes de las despulpadoras ecológicas, aún cuando se trate de residuales frescos.

4.3-. Fermentación Alcohólica.

4.3.1. Influencia de la adición de bisulfito y nutrientes sobre la producción de alcohol y PG.

Debido al alto contenido de azúcares fermentables que presentan los residuales del beneficio húmedo del café resulta atractivo su transformación en alcohol por levaduras. Si además, partimos del hecho de emplear estirpes de levadura productoras de enzimas pécticas (PG), entonces estamos ante la posibilidad de incrementar considerablemente el valor agregado de los productos del proceso fermentativo, mediante la producción concomitante de alcohol y PG.

Como se puede observar en la Figura 6, en todas las variantes se alcanzan acumulados de alcohol muy superiores a los existentes en el residual fresco (tiempo cero), estando en el orden de los 8-9 g/L. Esto indica que en la microflora natural existente en estos residuales ocurre preferentemente la fermentación alcohólica, lo cual coincide con lo descrito por otros autores para la fermentación natural del café durante el proceso de desmucilaginado (Jones y Jones, 1984).

La producción de alcohol en la cepa *K. marxianus* alcanza valores notables en las variantes donde no se adiciona bisulfito, llegando a los 13,2 g/L (76,3 % de rendimiento) y 12,3 g/L, correspondiendo el primer valor a la variante con adición de nutrientes. Estos acumulados de alcohol no difieren significativamente entre ellos ($p < 0,01$). Como se conoce, el bisulfito puede derivar la fermentación alcohólica hacia la acumulación de glicerol, en detrimento de la producción de alcohol (González y col., 1994). En todos los casos, la producción de alcohol en *K. marxianus* resultó significativamente superior ($p < 0,05$) con respecto a *H. jadinii* y al control sin inocular, no existiendo diferencias significativas entre estos dos últimos.

Para la producción de alcohol existen diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre cepas y también para adición de nutrientes. De igual modo, el factor 'desinfección del medio' también muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sus dos niveles. Existe una interacción significativa ($p < 0,01$) entre los factores cepa y nutrientes, la cual podría explicarse en virtud de los cambios operados en la composición microbiológica del residual, discutidos con anterioridad. La adición de bisulfito perjudica en todos los casos la producción de alcohol.

La menor producción de alcohol en *H. jadinii* concuerda con una mayor formación de ácido en esta cepa, respecto a *K. marxianus* y al control sin inocular (Fig. 7). La acumulación de ácido, expresado como ácido acético, alcanza valores superiores a los 9 g/L, lo que sugiere la existencia de una ruta fermentativa alternativa, conducente a la formación de ácido, en esta cepa. Las variantes con adición de bisulfito en esta cepa presentan los mayores niveles de acidez total, no presentando diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto a la adición o no de nutrientes. Otro hecho que puede incidir en la acumulación de ácido es la acción fermentativa de las bacterias, en combinación con la propia actividad metabólica de la levadura. Esto último podría acentuarse en el caso de que *H. jadinii* presente una baja tolerancia a etanol.

Con respecto a la producción de PG (Fig. 8), *K. marxianus* es significativamente superior ($p < 0,01$) a *H. jadinii* y al control. Estos dos últimos no difieren entre ellos significativamente ($p > 0,05$). Los mejores resultados corresponden a las variantes donde *K. marxianus* CCEBI 2011 fermenta al material tratado con bisulfito, en particular cuando se adicionan nutrientes, donde se alcanza un acumulado de PG de $15,4 \pm 1,6$ U/mL. Este valor es muy similar a aquel reportado por Serrat y col. (2004) para esta cepa cultivada en fermentador (inóculo puro) en medio rico (extracto de levadura-glucosa), lo que realza el significado del resultado aquí obtenido.

La adición de bisulfito favorece significativamente la producción de PG, lo cual pudiera estar explicarse como una consecuencia de la atenuación o inhibición de la microflora natural, cuya actividad proteolítica podría inactivar la PG secretada al medio por *K. marxianus*.

Se observan diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) para los factores cepa y desinfección, así como para las interacciones cepa \times desinfección y cepa \times adición de nutrientes (esta última, $p < 0,05$). Las interacciones observadas pueden ser consecuencia de la fortaleza del factor 'cepa'. Es un hecho demostrado que *K. marxianus* CCEBI 2011 es una de las estirpes de levadura para la cual se han reportado mayores valores de actividad PG (Serrat y col., 2002b; Serrat y col., 2004). La adición de nutrientes no influye significativamente en la producción de PG.

La factibilidad de la producción simultánea de alcohol y PG a partir de residuales del beneficio húmedo del café por *K. marxianus* CCEBI 2011 concuerda con los resultados reportados por Serrat y col. 2004 para medios convencionales. Esto resulta de gran interés si se pretende valorizar estos residuales agroindustriales que tan negativo impacto ambiental ocasionan a los ecosistemas montañosos (Bermúdez y col. 1999). Sin embargo, un hecho a tener en cuenta es que la adición de bisulfito influye de modo diferente sobre la producción de alcohol y PG, lo cual sugiere optimizar la concentración de este agente desinfectante en el medio de cultivo.

4.3.2 Cambios operados en la composición química de la fracción líquida.

El pH de la fracción líquida no sufre cambios durante la fermentación bajo limitación de oxígeno, manteniéndose en el orden de $4,1 \pm 0,1$. Este medio presenta un considerable efecto tampón dado por el elevado contenido de sustancias pécticas que presenta.

En todas las variantes se aprecia una marcada disminución del contenido de azúcares reductores totales (Fig. 9-A) que llega a ser del orden del 96 %, 92 % y 94 % para el control, *K. marxianus* y *H. jadinii*, respectivamente. Este resultado es sumamente interesante, por cuanto indica la favorable composición de azúcares de estos residuales para ser utilizados por vía fermentativa por las cepas estudiadas. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que estas cepas se aislaron de residuales del beneficio húmedo del café, lo que justifica su capacidad para asimilar los azúcares presentes en estos materiales.

La existencia de una mayor concentración de azúcares reductores residuales en las variantes donde se inoculó *K. marxianus* con respecto a las demás (Fig. 9-B), pudiera explicarse teniendo en cuenta la elevada actividad pectinolítica de esta cepa. Los altos niveles de PG acumulados por esta cepa favorecen un mayor grado de hidrólisis de la pectina soluble presente, con el consiguiente incremento del poder reductor. Al mismo tiempo, la extracción de pectina y otros azúcares de la fase sólida (pulpa) a la fase líquida también es facilitada por la hidrólisis de la pectina, al reducirse marcadamente la viscosidad del medio.

La presencia de azúcares fácilmente fermentables constituye una de las principales limitaciones para el uso de la pulpa de café como sustrato para el cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus* (Martínez-Carrera y col., 1993). Estos azúcares constituyen la cusa fundamental de contaminaciones indeseables por bacterias y mohos, las cuales llegan a colapsar el crecimiento del *Pleurotus*. De este modo, la fermentación con levaduras objeto de este estudio se presenta como una interesante alternativa para el pre-tratamiento de este sustrato, que podría, incluso, llegar a reemplazar la costosa y engorrosa etapa de pasteurización.

La concentración de sólidos totales y sólidos solubles disminuye significativamente ($p < 0,01$) durante el proceso fermentativo, incluso en el control sin inocular con levaduras, siendo más marcada la reducción en el contenido de sólidos solubles (Figs. 10 y 11). Este hecho está muy estrechamente asociado al consumo de azúcares durante la fermentación y su conversión a sustancias volátiles, tales como alcohol y ácidos grasos volátiles.

Con respecto al contenido de sustancias pécticas en la fase líquida, este muestra un marcado incremento al cabo de las 36 horas de fermentación (Fig. 12). Los mayores acumulados, estadísticamente significativos ($p < 0,05$), corresponden a las variantes donde se inoculó *K. marxianus*, en correspondencia con la ya referida muy superior actividad pectinolítica en esta cepa. Los mejores comportamientos se observan en las variantes donde se adicionó bisulfito, coincidiendo con lo ya señalado acerca de la producción de PG. Se obtienen acumulados de sustancias pécticas del orden de 14 mg/mL en estas variantes, lo cual resulta unas 14 veces superior al contenido de pectina en el material fresco. Este resultado resulta muy atractivo, si consideramos las múltiples y novedosas aplicaciones de los hidrolizados de pectina en la formulación de alimentos funcionales y bioestimulantes de uso agrícola (Cabrera, 1999; Lang y Dörnenburg, 2000).

En cuanto al contenido de taninos en la fase líquida, en general se aprecia una disminución significativa de estos con respecto a la muestra inicial sin fermentar, excepto para la variante control con adición de bisulfito y sin adición de nutrientes (Fig. 13). Este resultado concuerda con el pobre crecimiento microbiano, en particular para bacterias, observado bajo estas condiciones (Fig. 5). La variabilidad observada en este componente para las diferentes variantes puede ser causada por la convergencia fenómenos opuestos, tales como: (1) la extracción de taninos de la fase sólida facilitada por pectinasas, lo cual concuerda con el mayor acumulado de taninos en las variantes

con sulfito donde se inocula *K. marxianus* y (2) la degradación de los taninos por las fenoxidasas microbianas, incluidas las producidas por levaduras.

Un comportamiento similar a lo descrito para taninos, en cuanto a la variabilidad y disminución durante la fermentación, es observado para el contenido de proteínas solubles (Fig. 14), donde se combinan efectos proteolíticos (degradativos) con la secreción de proteínas, tales como la enzima PG. Las variantes inoculadas con levaduras pectinolíticas muestran mejores acumulados de proteína soluble que las variantes sin inocular. Esto, más que por efecto de secreción de proteínas, podría estar motivado por la existencia de una menor población bacteriana (inhibida además), en la cual la actividad proteolítica tiene un efecto más marcado.

V. CONCLUSIONES.

- 1.- En los residuales del beneficio húmedo del café, procesado por tecnología de bajo consumo de agua, la cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 fermenta el 89,6 % de los azúcares presentes en el medio.
- 2.- La población de mohos es fuertemente inhibida durante la fermentación alcohólica, no superando las 10^4 ufc/g.
- 3.- La población de bacterias y levaduras presentes en el residual, así como las levaduras inoculadas, *K. marxianus* y *H. jadinii*, son inhibidas en presencia de bisulfito
- 4.- *Kluyveromyces marxianus* presentó mejor comportamiento en la producción de alcohol y PG que *Hansenula jadinii*.
- 5.- En *Kluyveromyces marxianus* la adición de bisulfito afecta negativamente la producción de alcohol pero favorece la de PG, en tanto la adición de nutrientes no presenta una influencia significativa.
- 6.- Los residuales del café constituyen un sustrato factible de ser aprovechado por fermentación alcohólica, en presencia de levaduras pectínolíticas, para la obtención de alcohol, PG y pectina.

7.- VI. RECOMENDACIONES.

- Continuar la investigación de la fracción sólida obtenida de la fermentación alcohólica con las levaduras *K. marxianus* y *Hansenula jadinii*.
- Estudiar la fermentación en estado sólido de este material, como vía para incrementar su valor nutritivo.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Antier, P.; Minjares, A.; Roussos, S.; Raimbault, M. and Viniegra G, G. (1993). Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger*, C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 15 (3), 2-20.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Environment Federation (2004) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20^a edn. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Aquiahualt, M.A. (1992), **Isolation, identification and biochemistry of filamentous fungi for coffee pulp detoxification by solid state fermentation**. U.A.M. – ORSTOM, México.
- Aranda, E. (1991). El vermicompostaje: una alternativa para la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. En: **Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera**, 2. Manizales (Colombia), 4-7 Noviembre. Resúmenes, 10 p.
- Barnby FM, Morpeth FF, Pyle DL (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enzyme Microb. Technol.** 12, 891-897.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1983) Yeasts: Characteristics and identification, 1^a edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bermúdez, R. C.; García, N.; Gross, P. y Serrano, M., (2001a), Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. **Micología Aplicada Internacional**, 13(1), 25-29.
- Bermúdez, R. C.; N. García; Gros, P. and Serrano, M., (2002), Influencia del manganeso y calcio en el cultivo de *Pleurotus sp* **En: IV Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products**, Cuernavale (México), 20-23 February.
- Bermúdez, R. C.; N. García; Gros, P.; Verdecia, M. J.; Cardenas, J. R., (2001b), Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café en Cuba. Facultad de Ciencias Naturales. Univ Oriente .
- Bermúdez, R. C.; Traba, J. A.; Verdecia, M: J. y Gross, P., (1994), Producción de *Pleurotas sp*. Cvs florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. **Micología Neotropical Aplicada** 7: 47-50.
- Bermúdez, RC; Cárdenas, JR; **Serrat, M**; García, N; Deroncelé, V; Gross, P; Orberá, T (1999) Caracterización Socio-Técnico-Económica y Ambiental de las Despulpadoras de Café de la Provincia Santiago de Cuba. Informe Técnico, Programa Nacional de Ciencia y Técnica “Desarrollo Sostenible de la Montaña”, Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente, La Habana. Septiembre, 1999. 36 pp.
- Bitter, T. and Muir, H. M. (1962), *Anal. Biochem.* 4, 330.
- Blanco P, Sieiro C, Villa TG (1999) Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.** 175, 1-9.

- Boopathy, R.; (1989), The overall economics of anaerobic digestion on a coffee state. Design calculation and economics assessment, **Indian Coffee** , 53(7): 13-17.
- Bressani, R., (1978), Posibles usos de los subproductos del grano de café. En J. E. Braham y R. Bressani (eds): **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo, Bogotá, p. 31-43.
- Cabezas, M. T; Flores, A. Y Egaña, J.L., (1978), Uso de la pulpa de café en la alimentación de rumiantes. En J. E. Braham y R. Bressani (eds): **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo, Bogotá, p. 45-67.
- Cabrera JC (1999) Obtención de una mezcla de (1 \rightarrow 4)- α -D-oligogalacturonidos bioactivos a partir de subproductos de la industria cítrica. *Tesis Doctoral*, Hormaza JV, Igartuburu JM (tutores), Universidad Agraria de La Habana/ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.
- Calzada, J. F., (1990), **Biogás de subproductos del beneficio húmedo del café**. División de investigación aplicada. Instituto Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI). Guatemala.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.** 3, 1-30.
- Conway, J., (1947), Microdiffusion analysisism volumetric error. Crosby Lockwood, London.
- De Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 65, 497-522.
- Dubois M, Guilles K, Hamilton JK, Robers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** 28, 350-356.
- Escurra, L., (1990), **Proteína Microbiana: su importancia y valor nutritivo en la alimentación animal**. Centro de Información y Documentación Agropecuaria, La Habana, 56p.
- Favela, E.; Huerta, S.; Roussos, S.; Olivares, G.; Nava, G.; Viniegra, G.; Gutiérrez, M., (1989), **Producción de enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo**. Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera. México.
- Fogarty, V. M.; Ward, U. P. (1974). Pectinase and pectic polysaccharides. In HockenHull, D. J. D. (ed). **Progress in industrial microbiology**. London: Churchill Livingstone, Vol. 13,p. 59-119.
- Fogarty, W. M. & Kelly, C. T. (1983)Pectic enzymes. Microbial enzymes and Biothecnology, pp.131-182, W. M. Fogarty (Ed), **Applied Science Publishers**, London, UK .
- Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A (2000) Purification and characterization of acidic endopolygalacturonase encoded by the *PGL1-1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters** 183, 131-135.
- Garcés N, Martínez J (1985) Estudios para la obtención de pectinasa a partir de *Aspergillus niger*. II Cultivo sumergido. En: Desarrollo de enzimas fúngicas para

- la industria, Boletín Técnico, No. 22, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, La Habana, Cuba, pp. 36-43.
- García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L. and Barzana, E., (1987), Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters** 9:411.
 - González G, Ozores, M, Peña, M (1994) Continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology** 49, 209-212.
 - Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellenga C, Baartmans R, van Dijken H (1994) Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42, 516-521.
 - Jonas R (2000) Production of industrially important metabolites by microorganism. Conference plenaria, Congreso “Perspectivas y Limitaciones de la Biotecnología en Países en desarrollo”, San José, Costa Rica, Enero 24-28,.
 - Jones KL, Jones SE (1984) Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. En: Bushell ME (ed) Progress in industrial microbiology, vol. 19. Elsevier, Amsterdam, pp. 411-456.
 - Joshi, V. K. and Sandhu, D. K., and Jaiswal, S., (1995), Effect of addition of SO₂ on solid state fermentation of apple pomace. **Current Science**, Vol. 69, No.3 10.
 - Joshi, V. K. y Sandhu, D. K., (1994), Solid State Fermentation (Pandey, A., ed.) Wiley Eastern, New Delhi, 93-98 p.
 - Lang C, Dörnenburg H (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53, 366-375.
 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275
 - Maldonado MC, Navarro AR (1995) Pectinases production by *Aspergillus niger* using industrial by-products. **Microbiologie-Aliments-Nutrition** 13, 369-373.
 - Marcos-Méndez, M., (1981), Posibilidades reales de utilización o tratamiento de los desechos del beneficiado e industrialización del café en Venezuela. FUDECO. Boletín Informativo. **Suplemento técnico No. 27** Venezuela. 26p.
 - Markovik O, Slezárik A, Labudová I (1985) Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. **FEMS Microbiol. Lett.** 27, 267-271.
 - Martínez-Carrera, D. y col., (1993), Análisis económico y financiero de una planta rural de producción de hongos comestibles Pleurotas en Cuetzalan, Puebla, México. **Micología Neotropical Aplicada**. Vol. 6.
 - Nelson NJ (1957) Colorimetric analysis of sugars. **Methods Enzymol.** 3, 85-86.
 - Pérez S, Mazeau K, Herve du Penhotoat C (2000) The three dimensional structures of the pectic polysaccharides, **Plant Physiol. Biochem.** 38, 37-55.
 - Roussos S, Ángeles-Aquíhuatl M, Trejo-Hernández MR, Gaime-Perraud I, Favela E, Ramakrishna M, Raimbault M, Viniegra-González G (1995) Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42, 756-762.

- Serrat, M (2003) Producción, Purificación y Caracterización de la Poligalacturonasa de una Cepa de Levadura Aislada de Residuales del Beneficio Húmedo del Café. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Bermúdez, RC y González, T (Tutores),. Universidad de Oriente.
- Serrat, M (1998) Potencialidades de las levaduras en el aprovechamiento de los residuales del café. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente, Mayo de 1998. 61.
- **Serrat, M;** Bermúdez, RC; Villa, TG (2002b) Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology** **97**, 193-208
- Serrat, M; Bermúdez, RC; Villa, TG (2004). Polygalacturonase (PG) and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: potential use of PG in foodstuffs. **Applied Biochemistry and Biotechnology** **117**, 49-64.
- Serrat, M; Bermudez, RC; Villa, TG. (2003) Poligalacturonasa de levaduras como un alternativa a las pectinasas fúngicas: consideraciones acerca de su producción y aplicaciones, En: Memorias, II Conferencia Internacional de Química, Junio 3-6 del 2003, Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- **Serrat, M;** Camacho, M; Bermúdez, RC (2002) Potencial biotecnológico de las levaduras presentes en frutos y residuales del beneficio húmedo del café. **Café Cacao** **3** (2), 14 – 16.
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 159, 19-23
- Tapia, I. M.; Herrera-Saldana, R.; Viniestra G. G.; Gutiérrez, M. y Roussos, S., (1990), Pulpa de café fermentada: su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes. En **Valorización de los subproductos del café** (Taller), Quito, 11-15 de Junio.
- Trejo-Hernández, M.R.; Oriol, E.; López, A.; Roussos, S.; Viniestra, G.; Raimbault, M., (1991), Producción de pectinasas de *Aspergillus Niger* por fermentación sólida sobre soporte. **Micology Neotrop. Appl.** 4.
- Whitaker, J. R.(1990). Microbial Pectolytic Enzymes. In: Fogarty y W. M., Kelly, C. T. (ed) Microbial Enzymes and Biotechnology. 2 ed London: Elsevier. Cap. 4, pp. 133-176.
- Zuluaga, J. V., (1989), El beneficio del café y la contaminación ambiental. **Resúmenes del Café**, 14 (18), 18.

Tabla 1. Composición química de la pulpa de café.

	Fresca	Deshidratada	Fermentada naturalmente y deshidratada
Humedad	76,7	12,6	7,9
Materia seca	23,3	87,4	92,1
Extracto etéreo	0,48	2,5	2,6
Fibra cruda	3,4	21,0	28,8
Proteína cruda Nx 6,25	2,1	11,2	10,7
Cenizas	1,5	8,3	8,8
Extracto libre de nitrógeno.	15,8	44,4	49,2

Fuente: Elías, 1978.

Tabla 2. Contenido de algunos compuestos químicos en la pulpa de café (según Elías, 1978)

Compuesto	% base seca
Taninos	1,80 - 8,56
Azúcares reductores totales	6,5
Azúcares reductores	12,4
Azúcares no reductores	2,0
Cafeína	1,3
Acido clorogénico	2,6
Acido cafeico total	1,6

Tabla 3. Contenido de cenizas y minerales en la pulpa de café.

Compuesto	Contenido
Cenizas g %	8,3
Ca, mg %	554
P, mg %	116
Na, mg %	100
K, mg %	1765
Mg, Zn, Cu, Mn, B	Trazas

Fuente: Bressani, 1972

Fig. 1 Esquema del proceso de beneficio del café por vía húmeda.

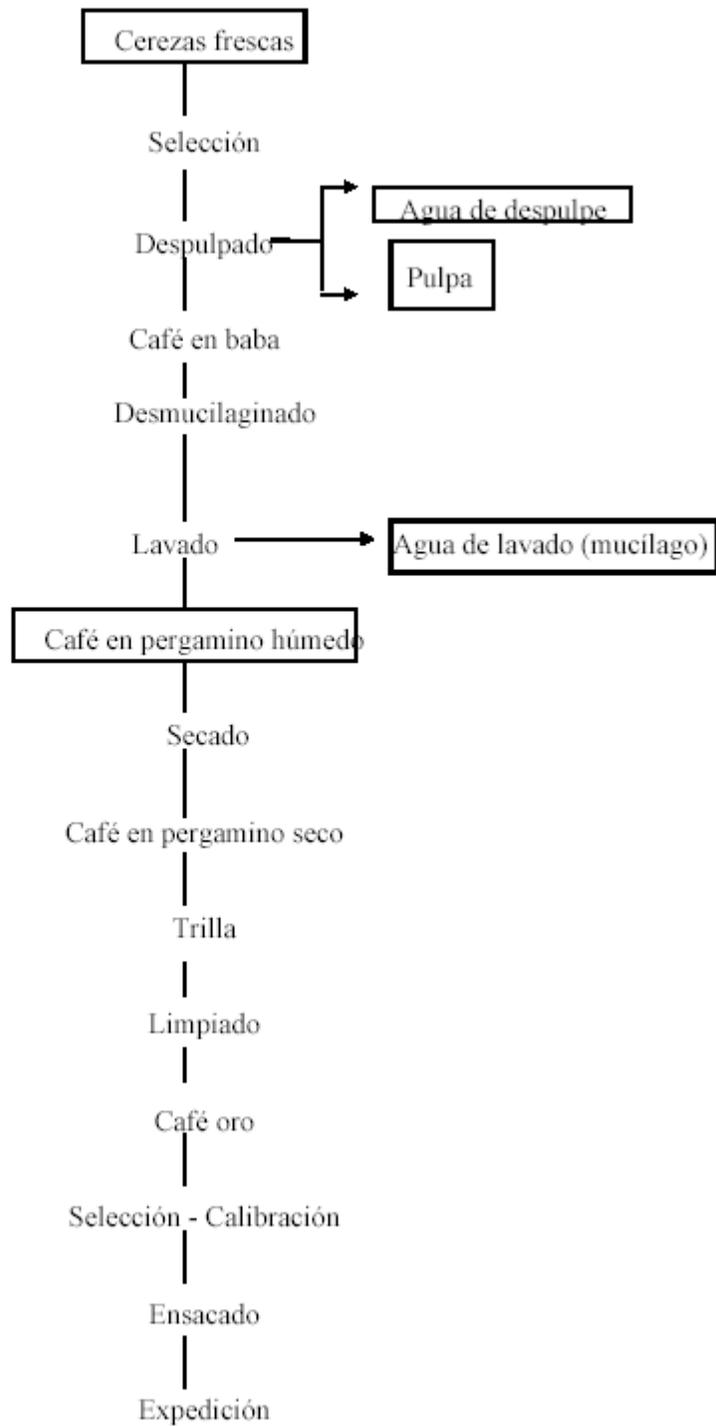


Fig. 2 Alternativas de uso para la pulpa de café (Bermúdez, 1995).

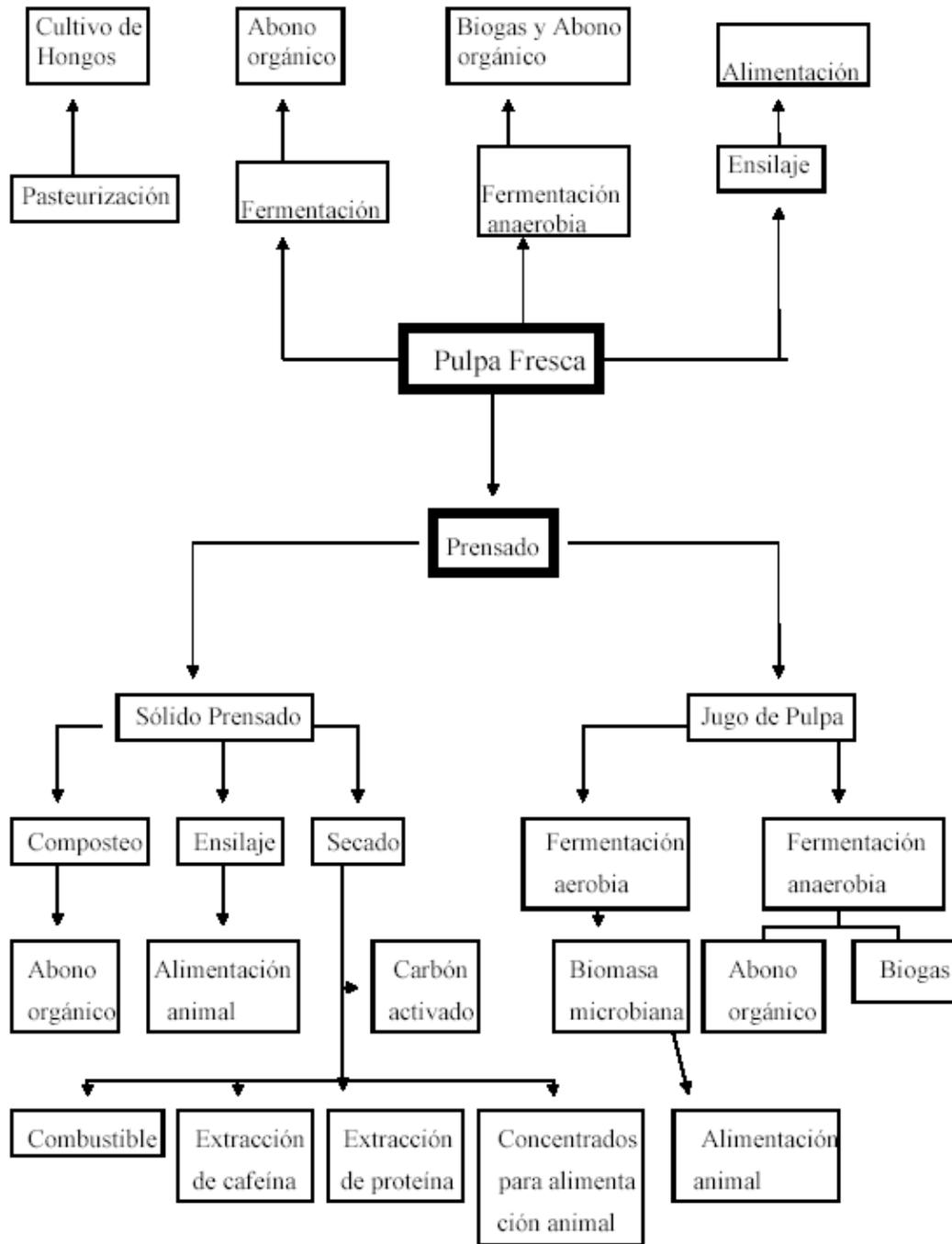
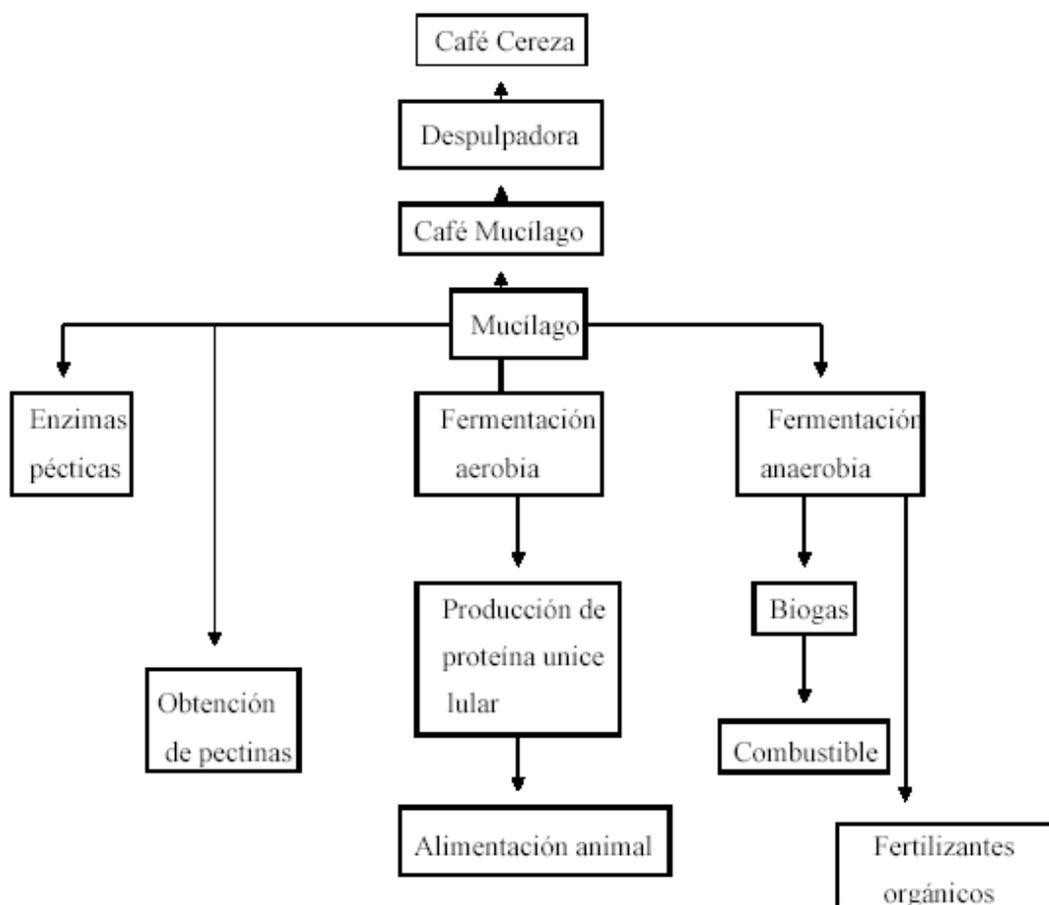


Fig. 3 Alternativas de uso para el mucilago de café (Bermúdez, 1995).



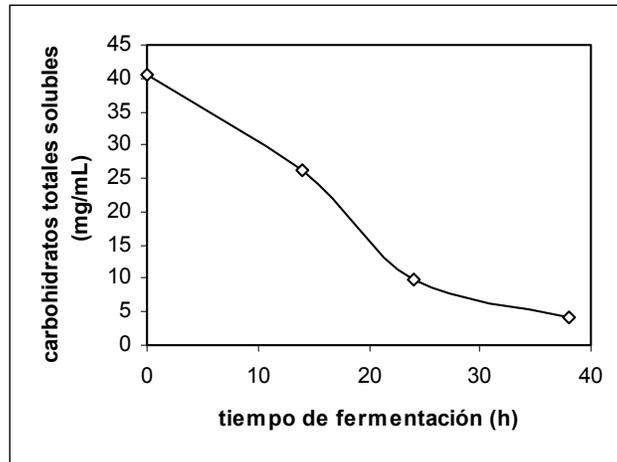


Figura 4. Cinética del consumo de carbohidratos por *K. marxianus* cultivado en extracto de pulpa + mucílago.

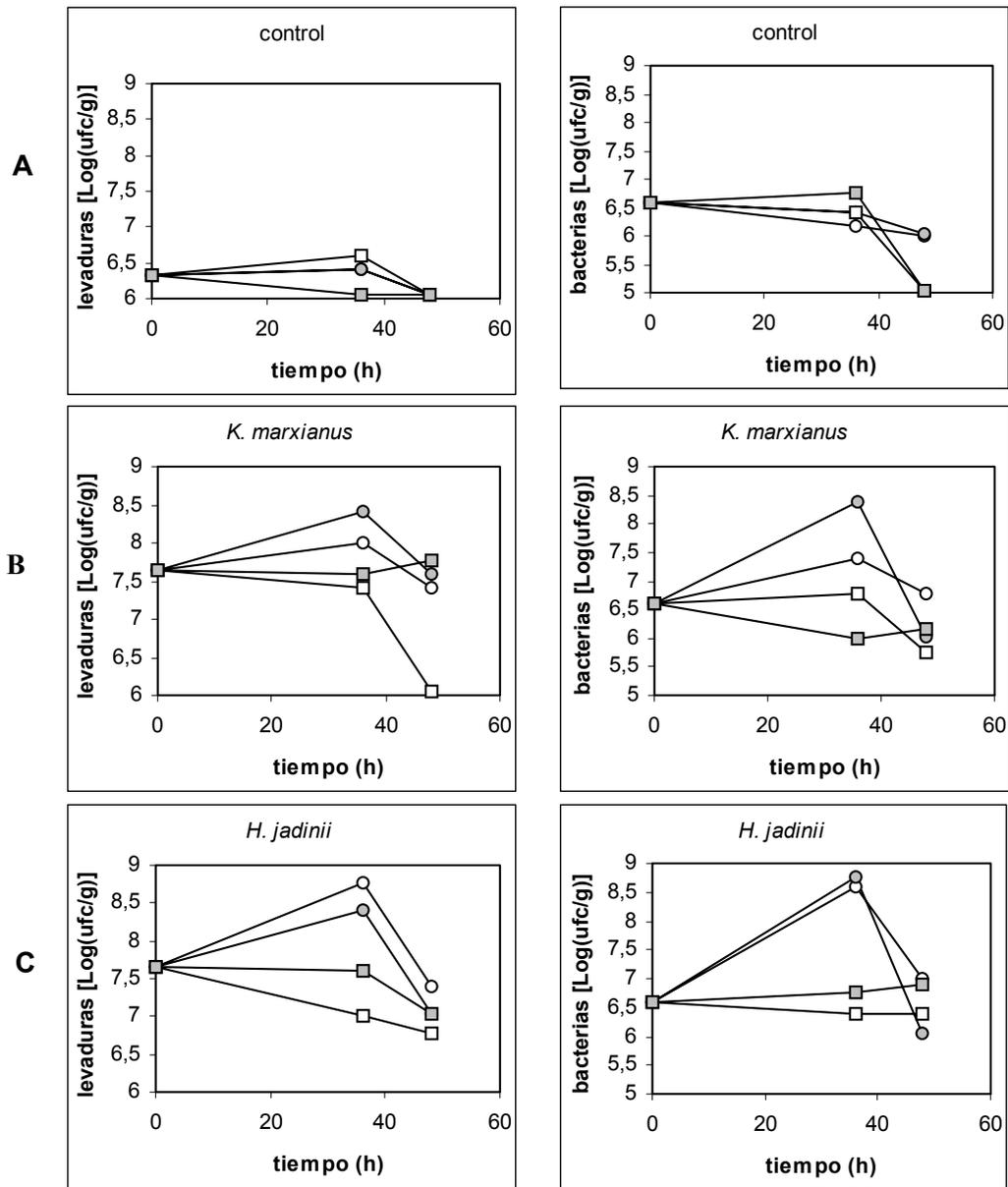


Figura 5. Conteo de levaduras y bacterias en el curso de la fermentación del residual pulpa + mucílago. (○), variantes sin bisulfito; (□), variantes con bisulfito; símbolo vacío, variantes sin adición de nutrientes; símbolo lleno, variantes con adición de nutrientes.

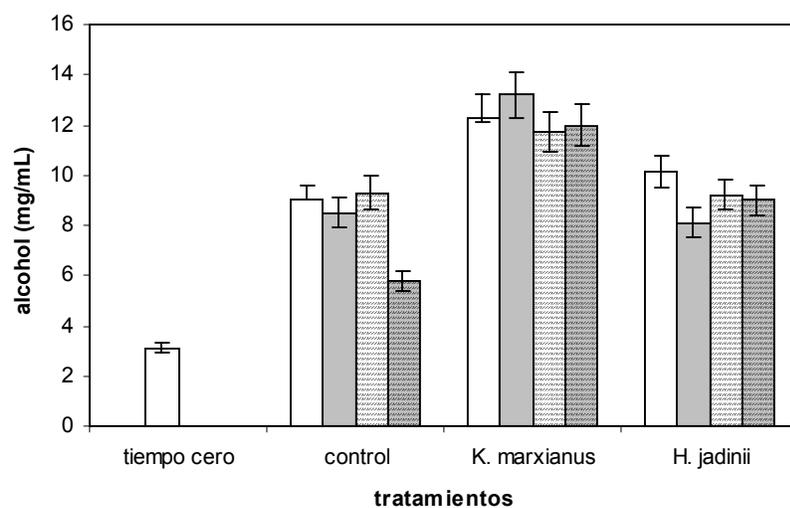


Figura 6. Producción de alcohol. (///), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

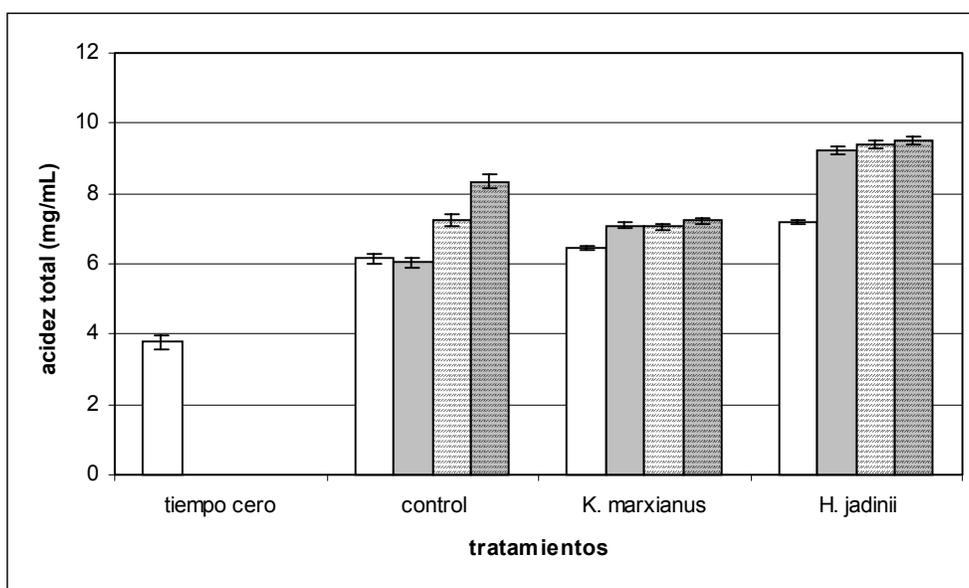


Figura 7. Acidez total acumulada en la fase líquida. (///), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

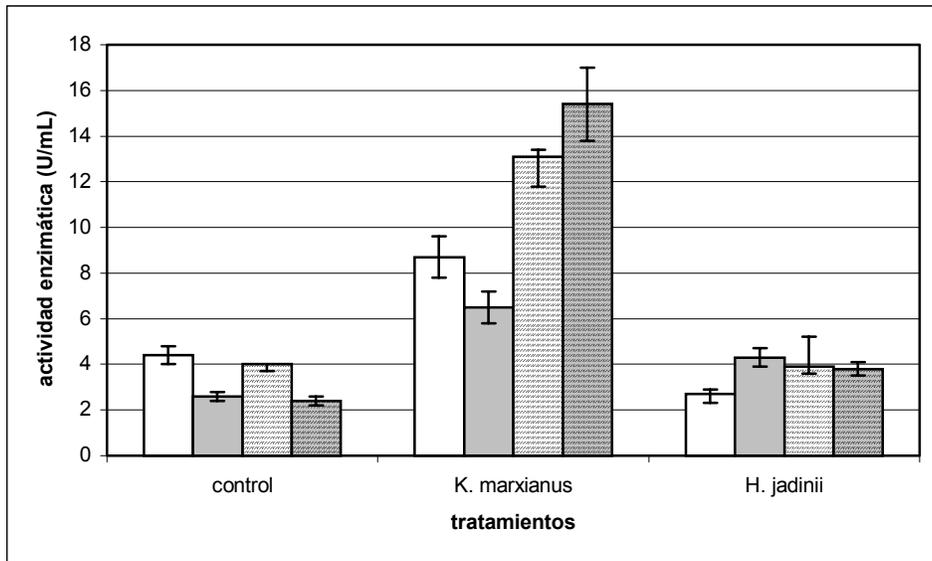


Figura 8. Producción de PG. (//), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

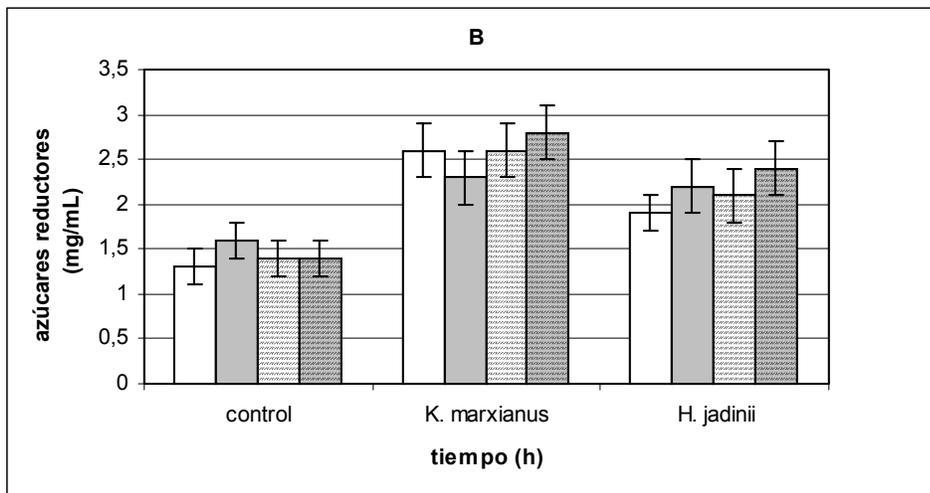
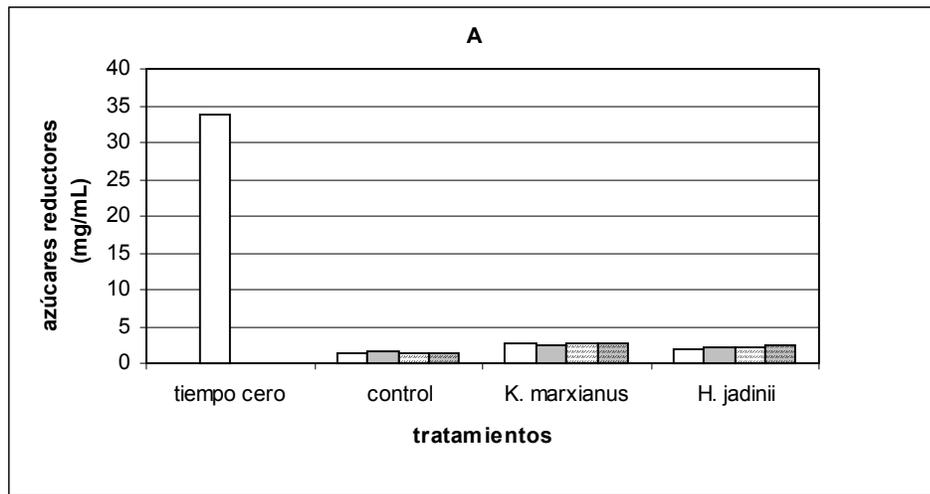


Figura 9. Azúcares reductores totales residuales al finalizar la fermentación. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

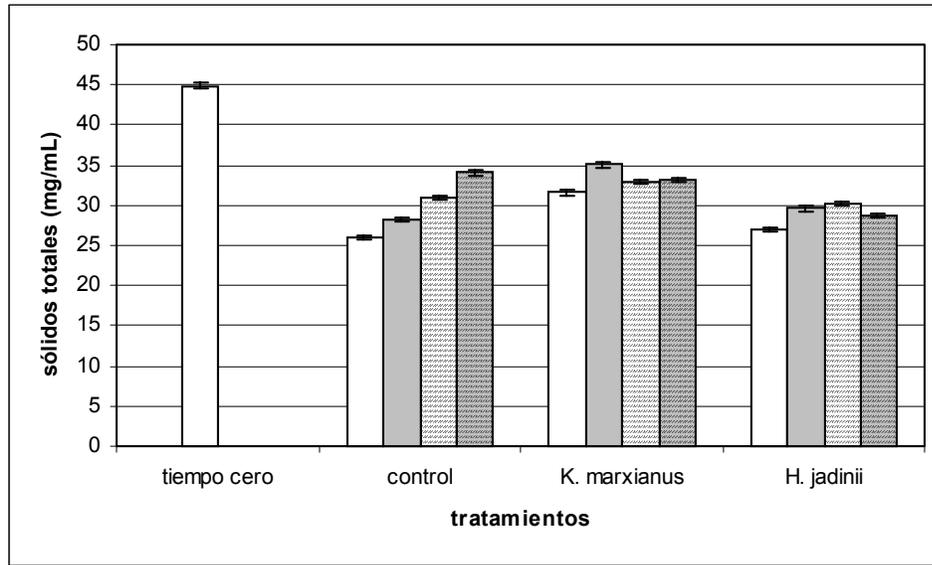


Figura 10. Sólidos totales en la fase líquida. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

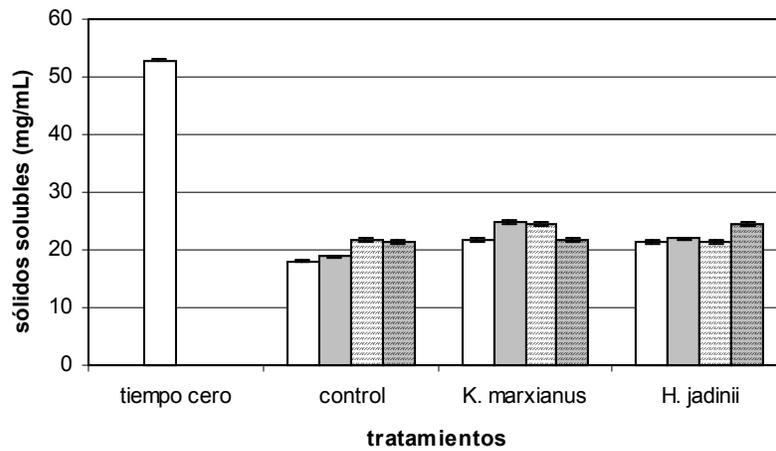


Figura 11. Sólidos solubles en la fase líquida. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

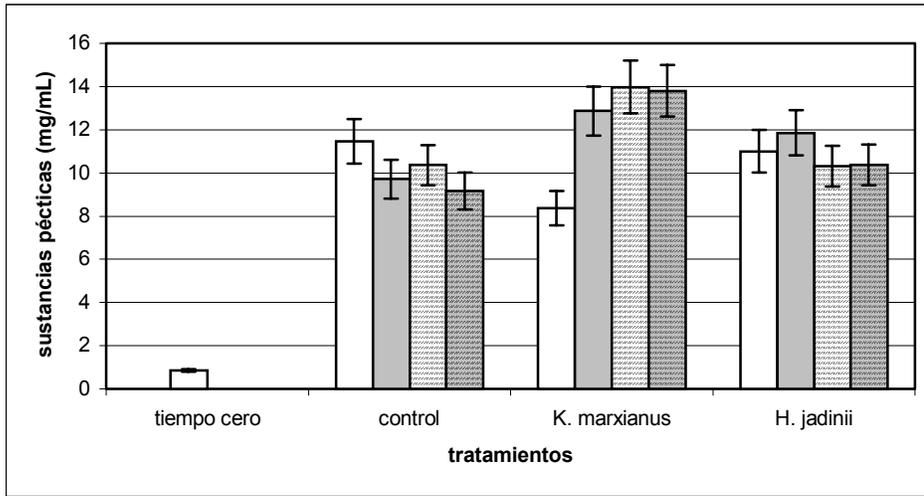


Figura 12. Contenido de sustancias pécticas en la fase líquida. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

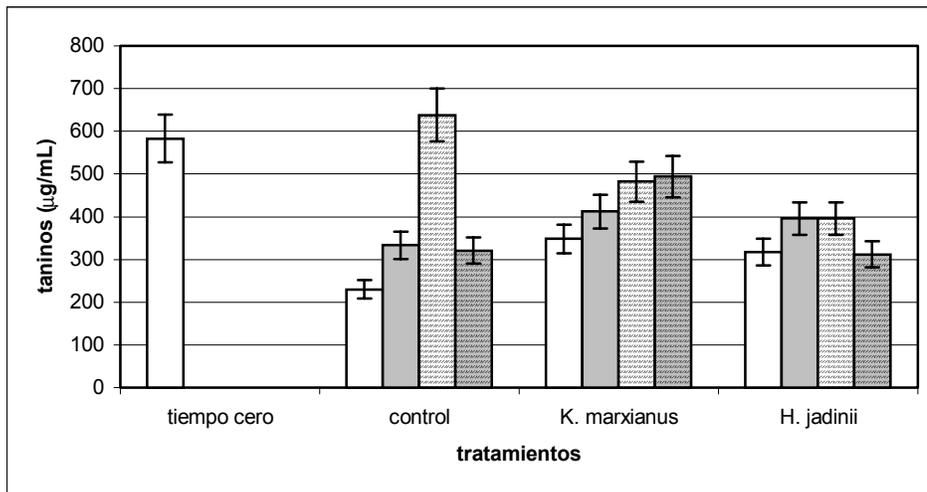


Figura 13. Contenido de taninos en la fase líquida. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.

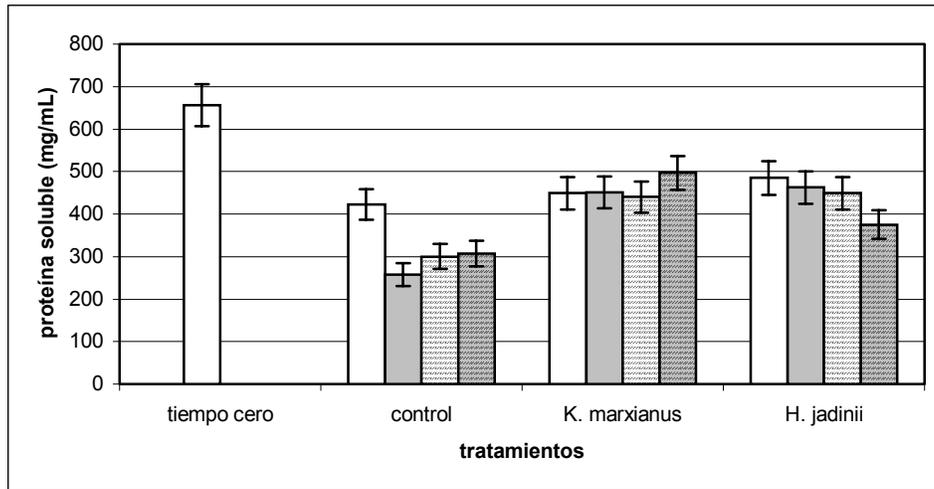


Figura 14. Contenido de proteínas totales solubles en la fase líquida. (▨), variantes con adición de bisulfito; (■) variantes con adición de nutrientes.