

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
CENTRO DE ESTUDIO DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Título: *Potencialidades de las levaduras en el aprovechamiento de los
residuales del café.*

Tesis presentada en opción al título académico de Master en

BIOTECNOLOGIA
MENCION BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Autor: Lic. Manuel de Jesús Serrat Díaz

Tutor: Dra. Rosa Catalina Bermúdez

Consultante: Dr. Francisco Alea Fernández

Mayo 1998

**“Año del Aniversario 40 de las Batallas Decisivas de la Guerra de
Liberación”**

RESUMEN

Se realiza una caracterización de los residuales del beneficio húmedo del café atendiendo a su posible aprovechamiento mediante levaduras, encontrándose que con las tecnologías tradicionales sólo es factible de utilizar la pulpa de café. Igualmente se encontró que el proceso tecnológico y el tiempo de fermentación influyen sobre su composición.

De estos residuales se aísla una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad pectinolítica. La síntesis de enzimas pécticas por esta cepa está asociada al crecimiento y es estimulada por la presencia de pectina en el medio de cultivo desde 0,1- 10g/L, no observándose diferencias significativas en las producciones para las diferentes concentraciones de pectina en el medio, excepto para pectina 5 g/L donde la actividad enzimática resultó significativamente superior.

La enzima péctica de esta cepa fue purificada 40,2 veces por cromatografía de intercambio iónico en Fractogel EMD Sulfonato- 650 (s) mostrando homogeneidad electroforética en PAGE-SDS y una masa molecular de aproximadamente 60 kDa. Se obtuvieron los valores de K_m y V_m , siendo estos 1,9mg/mL y 312,1 nmol/mL.min para la pectina (28,9 % de esterificación) y 0,7 mg/mL y 205,1 nmol/mL.min para el ácido poligalacturónico. La enzima se comporta como una poligalacturonasa tipo *endo* y presenta un rango de pH y temperatura óptimos de 4-4,5 y 55 °C respectivamente. A pH 3 se conserva más del 80 % de la actividad y a 37 °C se mantiene estable durante 60 minutos, inactivándose completamente a pHs superiores a 6,5 y a 60 °C en 10 minutos.

La producción de alcohol en medio convencional por esta cepa muestra una eficiencia superior al 86 %, no influyendo significativamente sobre ésta la presencia de pectina en el medio a una concentración de 10 g/L. La cepa sintetiza activamente pectinasas durante la fermentación alcohólica e hidroliza extensamente la pectina del medio sin consumo aparente de los productos de hidrólisis.

La cepa es capaz de degradar la cafeína en más de un 85 % en un medio mineral cuando la utiliza como única fuente de nitrógeno, y puede utilizar la pectina en presencia de glucosa 5 g/L.

A mis padres
A Odalys y Adriana
A Irasema
A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Antes de cerrar la escritura de estas memorias quiero dejar constancia de mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que han contribuido de alguna manera a la realización exitosa de este trabajo. En primer lugar, a mi tutora, la Dra. Rosa Catalina Bermúdez, por su permanente confianza y apoyo, por sus sabios consejos; a mi consultante, al Dr. Francisco Alea, por sus oportunas observaciones; a la Lic. Isabel Aguilera, por su colaboración en la realización de los análisis y su permanente disposición de ayuda; a la Lic. Teresa Orberá, por su apoyo en la parte taxonómica; a mi colega y amiga, la Lic. Marlene Toledano, del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, por su indispensable ayuda en las técnicas de purificación de proteínas, ocupando en ello parte de su valioso tiempo; al Lic. Madrazo, de la División de Química Física del CIGB, quien amablemente me suministró el intercambiador catiónico; a Inaudis y el fotógrafo Jorge Palacios, de la Fac. de Medicina No.2, por su desinteresada colaboración en las fotografías; muy especialmente, a *Irasema*, por su insustituible labor en la confección de este texto, por sus muchas madrugadas de desvelo compartidas...; a mis compañeros del CEBI; A todos, reitero

MUCHAS GRACIAS

INDICE

	Pág
I. Introducción.	1
II. Revisión bibliográfica.	2
II.1. Aprovechamiento de los residuales del beneficio húmedo del café.	2
II.2. Potencialidades de la levadura en el aprovechamiento de residuales.	3
II.3. Enzimas pécticas.	3
II.3.1. Clasificación	3
II.3.2. Producción de pectinasas por microorganismos.	5
II.3.3. Aplicaciones de las enzimas pectinolíticas. Potencialidades de las enzimas de levaduras.	6
III. Materiales y métodos.	8
III.1. Caracterización de los residuales del proceso de beneficio húmedo del café.	8
III.2. Aislamiento y caracterización de levaduras pectinolíticas.	9
III.3. Producción de pectinasas por la cepa seleccionada.	10
III.3.1. Influencia de la glucosa y de la concentración de pectina en el medio.	10
III.3.2. Cinética de la producción de pectinasas por la cepa seleccionada.	10
III.4. Producción de alcohol por la cepa seleccionada.	10
III.5. Producción, purificación y caracterización de las enzimas pécticas producidas por la cepa seleccionada.	11
III.5.1. Producción y purificación.	11
III.5.2. Caracterización del enzima purificado.	11
III.6. Determinación de actividad PMG total y proteínas totales.	12
III.7. Sustratos empleados en los ensayos de actividad enzimática.	13
III.8. Utilización de la pectina y la cafeína por la cepa seleccionada	13
III.9. Métodos analíticos.	14
III.10. Procesamiento estadístico de los resultados.	15
IV. Resultados y discusión.	16
IV.1. Caracterización de los residuales del proceso de beneficio húmedo del café. Influencia del proceso tecnológico y de la fermentación natural sobre su composición.	16
IV.2. Aislamiento y selección de levaduras pectinolíticas.	18
IV.3. Producción de enzimas pectinolíticas y alcohol por la cepa EP 915.	20
IV.4. Purificación y caracterización del enzima pectinolítico de <i>S. cerevisiae</i> EP 915.	21
IV.5. Utilización de la pectina y la cafeína por la cepa EP 915.	23
IV.6. Breves consideraciones acerca de la potencialidad económica de los resultados alcanzados.	24
V. Conclusiones.	26
VI. Bibliografía	27

I. INTRODUCCION

En Cuba el café constituye uno de sus cultivos tradicionales de mayor importancia, siendo un elemento fundamental en la economía de las zonas montañosas.

La mayoría del café cosechado se beneficia por vía húmeda, al proporcionar ésta un grano de mayor calidad. Como resultado del proceso de beneficio húmedo se generan enormes volúmenes de desechos, que incluyen más de 56 000 toneladas de pulpa y unos 280 000 metros cúbicos de aguas residuales (despulpe y lavado) conteniendo una elevada carga orgánica.

Hasta el presente, la utilización y tratamiento de estos residuos ha sido deficitaria, convirtiéndose en un serio problema de contaminación en las zonas de montaña.

La pulpa, en virtud de su composición y volumen resulta el más interesante de estos residuos, seguida por el mucílago (agua de lavado). Estudios realizados en Cuba y otros países han mostrado las potencialidades de la pulpa de café para el cultivo de hongos comestibles (Martínez-Carrera, 1993; Bermúdez y col, 1994), producción de abono orgánico, alimento animal, biogas, alcohol y enzimas pectinolíticas (Bressani, 1978; Antier, 1993).

El uso de la pulpa en la alimentación animal se ha visto limitado por el alto contenido de compuestos tóxicos (cafeína, polifenoles) que presenta, lo que sugiere la biodegradación previa de estos compuestos por microorganismos.

En tanto la producción de alcohol a partir de pulpa o mezclas de jugo de pulpa y agua de lavado reporta un rendimiento de 1,2 litros de alcohol de 85% v/v por cada 100 kg de pulpa (Marco-Méndez, 1981). Estos rendimientos resultan poco atractivos si se piensa en la producción de alcohol solamente, no así si se combinara con la obtención de otros productos.

Basado en lo anteriormente expuesto consideramos, que debido al rico contenido de azúcares fermentescibles y pectina en pulpa y mucílago, el empleo de levaduras pectinolíticas productoras de alcohol y capaces de degradar la cafeína en un proceso único de producción de bebidas alcohólicas, enzimas pectinolíticas y alimento animal constituiría una buena alternativa para el aprovechamiento de estos residuos. Como primera etapa en el desarrollo de esta hipótesis, nos proponemos en este trabajo los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar la pulpa y mucílago (agua de lavado) con vistas a valorar su posible empleo como sustratos para la fermentación alcohólica y evaluar la influencia del proceso tecnológico y la fermentación sobre la composición de estos residuos.
- 2) Aislar y seleccionar levaduras autóctonas de la pulpa y del proceso fermentativo del café (desmucilaginado) con buena capacidad para la producción de enzimas pécticas y alcohol, así como para la degradación de la cafeína.
- 3) Caracterizar la producción de enzimas pectinolíticas y alcohol por la cepa seleccionada .
- 4) Purificar y caracterizar la(s) enzima(s) pectinolítica(s) producida(s) por la cepa seleccionada.
- 5) Estudiar la capacidad de utilización de la cafeína y la pectina por la cepa.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1.- Aprovechamiento de los residuales del beneficio húmedo del café

El proceso de beneficio húmedo del café (ver Anexos, 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).

Al igual que otros residuales agroindustriales, los del café poseen componentes muy valiosos (véase Anexos, Tablas 1, 2, 3 y 4), 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 vistas 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 (ácido acético, polímeros y otros) (Marco-Méndez, 1981); melazas para la alimentación animal y humana así como para la extracción de pectinas y otros compuestos químicos (Bressani, 1978).

La figura 2 de la sección de Anexos 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 siguientes peculiaridades de este residual: se genera solamente durante una etapa del año, su carácter disperso, sus altos contenidos de agua y posibilidades de contaminación por microorganismos.

En relación con su posibilidad de ser utilizado en la alimentación animal, reviste particular importancia la biodegradación de los compuestos tóxicos presentes (cafeína y polifenoles). Varios investigadores han trabajado en esta dirección, 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 sustrato 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).

En cuanto al mucílago, la figura 3 de los Anexos muestra sus posibilidades de aprovechamiento. Marco-Méndez (1981) reporta la producción de alcohol a partir de los jugos de pulpa y mucílago empleando levaduras del género *Sacchromyces*.

II.2.- Potencialidades de la levaduras en el aprovechamiento de residuales.

Las levaduras, compañeras del hombre desde tiempos remotos, han estado asociadas fundamentalmente a la producción de alimentos y bebidas fermentadas (pan, cerveza, vino, ron). En los tiempos actuales, ante la crisis alimentaria mundial que enfrenta el mundo, donde los animales compiten por los mismos alimentos básicos con el hombre, ha cobrado importancia cardinal el empleo de microorganismos como fuente protéica para alimentación animal y humana.

Las levaduras, en virtud de sus altas velocidades de crecimiento, facilidades de cultivo y 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, lejías sulfíticas, y suero de leche a escala industrial para la producción de proteína unicelular, al tiempo que se aprovechan estos residuales (Ezcurra, 1990).

La utilización de las 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.

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

II.3.- Enzimas pécticas

Las enzimas pécticas se encuentran de manera natural en frutas y vegetales, siendo también producidas por microorganismos fitopatógenos, bacterias, levaduras y hongos. Bajo esta denominación se agrupan aquellas enzimas que tienen a las sustancias pécticas como sustratos naturales. Estas enzimas juegan un importante rol en la naturaleza en la maduración de los frutos, abscisión de hojas y patogénesis de plantas (Pariza y Foster, 1983).

Los polisacáridos pécticos constituidos fundamentalmente por ácido poligalacturónico (pectato) o su metil éster (pectina), son mayormente responsables de la integridad y coherencia de tejidos de plantas (Pilnik y Voragen, 1970; Rombouts y Pilnik, 1980). La degradación enzimática de los polímeros pécticos tiene lugar por la acción desesterificante de la pectinesterasa y por la acción hidrolasa o liasa de las depolimerasas. Las actividades más importantes son las hidrolíticas, de manera que esta acción sobre la pectina conlleva a la pérdida de su integridad estructural. En base a esta actividad se han desarrollado muchas de las aplicaciones industriales de las enzimas pectinolíticas.

II.3.1.- Clasificación.

Las enzimas pécticas se clasifican por su forma de atacar al sustrato, dividiéndose en dos grupos principales: **esterasas** y **depolimerasas**.

Esterasa: describe solamente a la pectinaesterasa (EC 3.1.1.11) que degrada los enlaces metilester del carbono seis de las unidades de ácido metilgalacturónico de la pectina,

reduciendo el contenido de metóxilo de las sustancias pécticas, al tiempo que se produce metanol y ácido galacturónico:

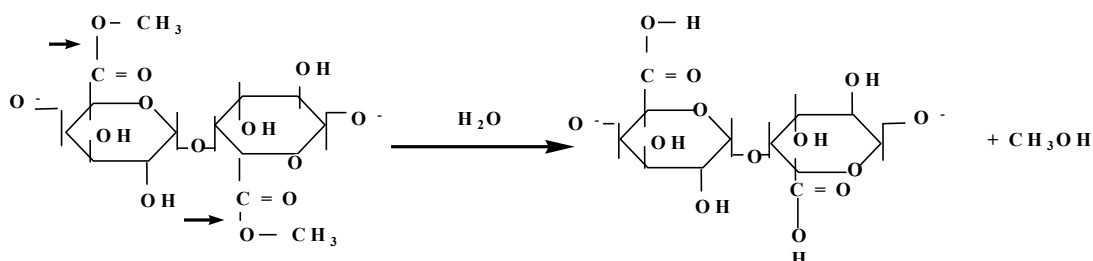


Fig. II.3.1.1 Esquema del modo de acción de las estererasas.

Depolimerasas: atacan las uniones glicosídicas α (1-4) de las sustancias pécticas. Esta despolimerización puede ser a través de un mecanismo de hidrólisis. Aquí actúan las endopoligalacturonasa (E.C. 3.2.1.15) y las exopoligalacturonas (EC 3.2.1.67). Las *exo* atacan el extremo no reductor de las moléculas de pectina y ácidos poligalacturónicos; el resultado de la hidrólisis produce ácidos galacturónicos como grupos reductores. Las *endo* actúan de una forma aleatoria fundamentalmente en el interior de la cadena, provocando la fragmentación de los sustratos (las pectinas y ácidos poligalacturónicos) y por consiguiente causando disminución de la viscosidad en soluciones de sustancias pécticas. Este tipo de enzimas (*endo*) por su acción catalítica es de mayor aplicación en la industria de bebidas (Fogarty & Kelly , 1983).

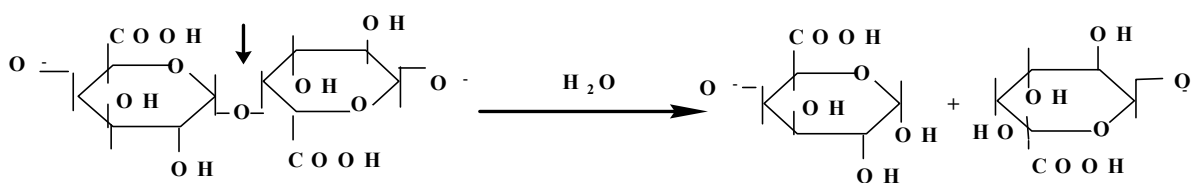
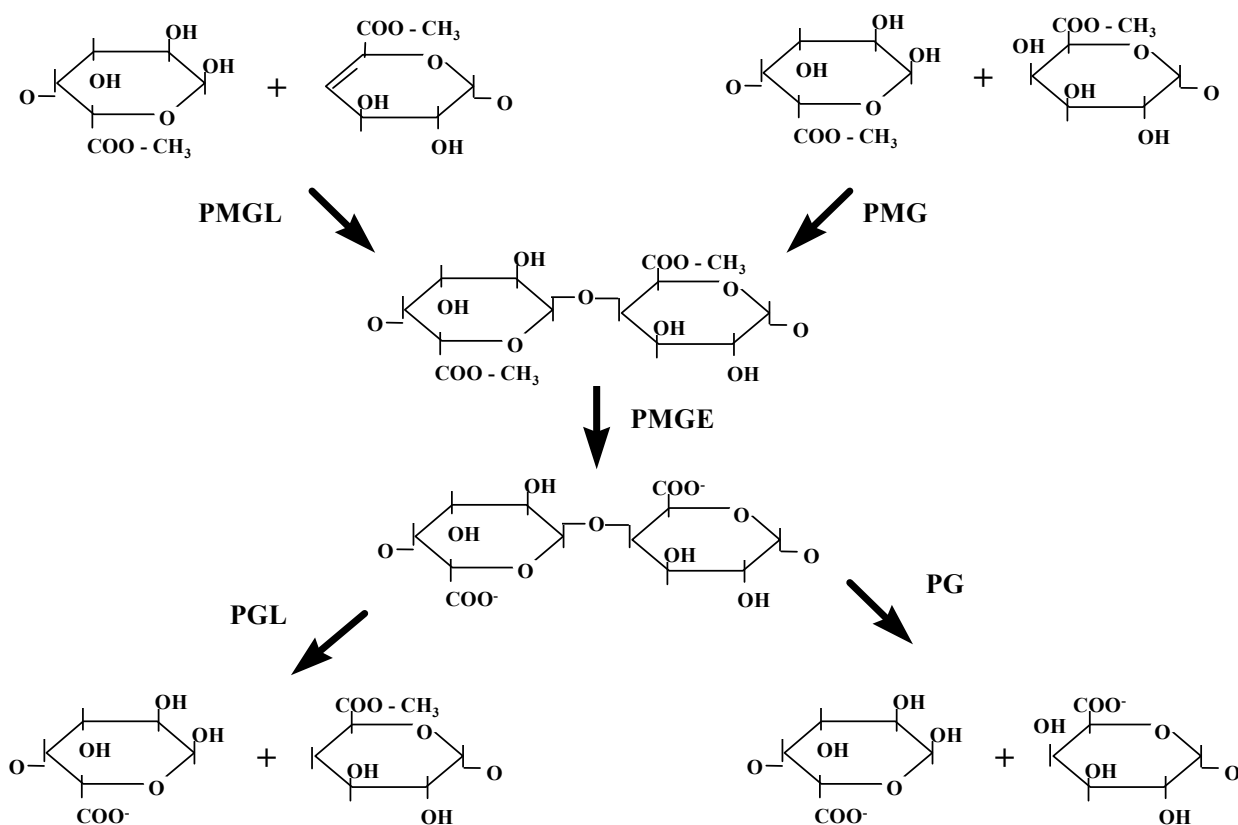


Fig. II.3.1.2. Esquema del modo de acción de las depolimerasas.

Las **liasas** están dentro del grupo de las depolimerasas. Catalizan la formación de un doble enlace entre los carbonos cuatro y cinco por un mecanismo de transeeliminación (β -eliminación). Las liasas que atacan a la pectina se llaman **endo-polimetilgalacturonato liasa** (endo-PMGL) o *endo*-pectinaliasa, **exo-polimetilgalacturonato liasa** (exo-PMGL) o exopectina liasa y a las liasas que actúan sobre los ácidos galacturónicos se le denominan **endo-poligalacturonato liasa** (endo-PGL) o endopectato liasa, **exo-poligalacturonato liasa** (exo-PGL) o exopectato liasa (Fogarty y Kelly, 1983).

En la figura II.2.3. se presenta esquemáticamente la acción de las diferentes actividades pectinolíticas sobre la cadena de pectina.



PMGL: Polimetilgalacturonato liasa (pectinaliasa).

PMG: Polimetilgalacturonasa (pectina hidrolasa).

PMGE: Polimetilgalacturonato esterasa (pectina esterasa).

PGL: Poligalacturonato liasa (pectato liasa).

PG: Poligalacturonasa (pectato hidrolasa).

Fig. II.3.1.3 Esquema del modo de acción de las diferentes enzimas pectinolíticas.

II.3.2.- Producción de pectinasas por microorganismos.

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).

En la Tabla 5 (Anexos) se presentan las fracciones pectinolíticas producidas por diversos hongos y bacterias. Como se observa la enzima PGL es la fracción más comúnmente sintetizadas por las bacterias, seguida de la fracción PG y 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 PMG y PMGL se presentan con una razonable frecuencia para diversos géneros fúngicos (Fogarty y Ward, 1974; Fogarty y Kelly, 1983; Whitaker, 1990).

Las preparaciones de pectinasas comerciales son fundamentalmente de origen fúngico (predominantemente de *Aspegilli* y *Penicillia*) y exhiben altas actividades endo-PG (E.C. 3.2.1.15) y niveles variables de PE (E.C.3.1.1.11) y pectina liasa (Chesson y Codner, 1978).

Recientemente ha sido objeto de mucho interés el estudio de la actividad pectinolítica de bacterias del género *Erwinia sp.*, en particular *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Chatterjee y col, 1995) y *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik y col, 1996), ambas importantes patógenos de plantas y productores de casi todos los tipos de actividades pectinolíticas.

Sin embargo, la actividad pectolítica es una cualidad relativamente rara entre levaduras y está restringida a muy pocas especies de *Candida*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporum* y *Zygopichia* (Luh y Phaff, 1951; Bell y Etchells, 1956; Sánchez y col, 1984; Ravelomanana y col, 1986). El género *Saccharomyces* también muestra actividad pectolítica. Bell y Etchells (1956) reportaron débil actividad pectolítica (PE) en *S. cerevisiae*, mientras que Luh y Phaff (1951) reportaron que cultivos de *S. cerevisiae* no ejercían efecto notable sobre la pectina.

Gómez-Ruiz (1988) ha estudiado la acción clarificante de la endo-PG de *Kluyveromyces fragilis* sobre el jugo de manzana y recientemente Schwan y col (1997) aislaron una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, productora de endo-PG extracelular, de la microflora que fermenta la pulpa de cacao.

II.3.3.- Aplicaciones de las enzimas pectinolíticas: Potencialidades de las enzimas de levaduras.

Las enzimas microbianas que catalizan la degradación de las sustancias pécticas son de gran importancia para las industrias fermentativas (incluida la de fabricación de vinos), de jugos de frutas y otras industrias. Las pectinasas son usadas para la producción de azúcares fermentables de biomasa de plantas (Beldman y col, 1984), para la extracción, clarificación y depectinización de jugos de frutas (incluido el mosto de uvas), maceración de frutas y vegetales y extracción de aceites vegetales (Pilnik y Rombouts, 1979; Brown y Ough, 1981; Saulnier y Brillouet, 1988; Rankine, 1991).

También son empleadas en la elaboración de fibras textiles, p.e. en la desfibración del lino (*Linum usitassimun*), cáñamo (*Cannabis sativa*) y yute (*Carchues sp.*). De igual modo han sido utilizadas en la preservación de maderas, aumentando la permeabilidad de éstas a los preservantes tradicionales (Fogarty y Kelly, 1983).

Reviste también importancia, aunque aún no se aplica a escala industrial, la aplicación de las enzimas pécticas con la finalidad de mejorar la productividad y eficiencia en las fermentaciones naturales, tales como las que tienen lugar durante el beneficiado del café y el cacao. De esta manera se podría ejercer un control más riguroso del proceso mejorando la calidad del producto final (Favela y col, 1989).

Hasta el momento no existen aplicaciones prácticas para las enzimas pécticas de levaduras, por una parte, debido que sus costos de producción son superiores y por otro, a la ausencia de actividad múltiple, característico de los preparados comerciales de origen fúngico.

Sin embargo, García-Garibay y col. (1987) demostraron que era factible producir endo-PG de *Kluyveromyces fragilis*, como un subproducto del proceso de producción industrial de proteína unicelular a partir de suero lácteo y su aplicación eficiente en la clarificación de jugos de manzana (Gómez - Ruiz y col., 1988).

También se ha sugerido que cepas de levaduras vinícolas pectinolíticas (*S. cerevisiae*) podrían mejorar la licuefacción, clarificación y filtrabilidad del mosto de uvas, liberándose más compuestos aromáticos y coloreados atrapados en la piel de la uva, contribuyendo positivamente al bouquet del vino (Pretorius y Van der Westhuizen, 1991).

Por otro lado, el hecho de que algunas levaduras sean capaces de sintetizar constitutivamente enzimas pécticas, según lo encontrado por Luh y Phaff (1954) y Blanco y col. (1994) constituye una ventaja desde el punto de vista productivo de la enzima, ya que puede ser obtenida como un producto colateral de otra producción (p.e. biomasa, vino, cerveza, etc).

Un aspecto que ha cobrado interés en la actualidad es el estudio de los oligogalacturónicos, sustancias con marcada actividad biológica y reguladora en plantas (Reymond y col, 1996; Droillard y col, 1997), siendo estas sustancias productos de alto valor agregado y en cuya producción pudieran intervenir activamente las enzimas pectinolíticas de levaduras. Las endo-PG de levadura tendrían ventajas sobre las fúngicas debido, en primer lugar, a la carencia de actividad tipo *exo*, y en segundo lugar a que se ha encontrado que su actividad disminuye según disminuye el tamaño de la cadena de poligalactorónido, permitiendo de esta forma obtener oligos puros de dos, tres y cuatro unidades monoméricas (Phaff y Luh, 1952; Demain y Phaff, 1957).

III. MATERIALES Y METODOS

III.1.- Caracterización de los residuales del proceso de beneficio húmedo del café.

Muestras: Las muestras analizadas proceden de la despulpadora “Filé”, municipio III Frente, Provincia Santiago de Cuba y corresponden mayormente a la especie *Coffea canephora* var. Robusta. Se clasificaron de la siguiente manera:

a) Muestras sólidas:

- Pulpa fresca obtenida mediante despulpado manual de frutos colectados al azar de la tolva de la despulpadora (PDM).
- Pulpa fermentada naturalmente durante 8 horas (PF8).
- Pulpa fermentada naturalmente durante 8 horas y deshidratada al sol por un período de 48 horas (PF8D).
- Pulpa agotada, obtenida mediante despulpado en seco, seguido de extracción con agua empleándose una relación agua:pulpa 1:1 (PA).

b) Muestras líquidas:

- Agua de despulpe: Se colecta una vez estabilizado el proceso de despulpe en la despulpadora.
- Agua de lavado: Se refiere a la primera agua de lavado.
- Extracto de pulpa: Extracto acuoso procedente del agotamiento de la pulpa.

Todas las muestras fueron almacenadas en recipientes de vidrio (muestras líquidas) y bolsas de nylon (Muestras sólidas) y conservadas en congelación, excepto la PF8D que se conservó a temperatura ambiente.

Procedimiento:

a) Muestras sólidas (ver Anexos, Fig. 4)

El pH y la acidez total se determinaron a extractos acuosos de 5g de muestras en 50 mL de agua destilada. Los componentes minerales se determinaron a partir de las cenizas, disolviéndose estas en HCl (c). Los compuestos solubles en agua (azúcares reductores, carbohidratos, pectina y cafeína) se determinaron en los extractos acuosos obtenidos por extracción continua con agua destilada de las muestras previamente secadas a 105-110 °C y pulverizadas, de acuerdo con Traba y col. (1994); los sólidos solubles se calculan por la diferencia de peso en la muestra antes y después de la extracción. El contenido de nitrógeno total se determinó directamente a las muestras secas.

b) Muestras líquidas (ver Anexos, Fig. 5)

El nitrógeno total se determina directamente; los componentes minerales, en las cenizas de igual manera que en las muestras sólidas; pH, acidez total, azúcares reductores, carbohidratos totales solubles y cafeína se determinaron en la muestra libre de sólidos en suspensión, luego de separados éstos por centrifugación a 5000xg durante 30 minutos; los sólidos suspendidos

de esta forma separados, son lavados con agua destilada, centrifugados nuevamente y secados a 105-110 °C para su determinación.

III.2.- Aislamiento y selección de levaduras pectinolíticas

Materiales de partida para el aislamiento:

- Agua de despulpe.
- Agua de despulpe fermentada naturalmente.
- Agua de lavado.

Todas las muestras proceden de la despulpadora “Filé”, municipio III Frente, provincia Santiago de Cuba.

Medios de aislamiento

- Extracto de Malta (Oxoid), pH 3,5; medio líquido y agarizado (agar bacteriológico 2 %).
- Medio “Extracto de pulpa -SO₂”: KH₂PO₄ 1g/L; MgSO₄ · 7 H₂O 0,5g/L; Na₂SO₃ 265 mg/L (equivalente a 160 ppm de SO₂); extracto acuoso de pulpa de café (20 g de pulpa fresca deshidratada se extraen con 100 mL de agua a 80°C durante 2 horas) c.s.p. 1L; pH 4,5.
- Medio “Pectina-cafeína”: galactosa 10 g/L; pectina 10g/L; urea 4 g/L; cafeína 2 g/L; KH₂PO₄ 2 g/L; MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g/L; extracto de levadura 5 g/L; pH 4,0.

Estrategia de aislamiento (ver Anexos, Fig. 6)

Un 5% v/v de las muestras fue inoculado a medio extracto de malta pH 3,5 y cultivado durante 48 horas en zaranda a 140 r.p.m. y 30 °C de temperatura. Seguidamente fueron propagadas por duplicado a medio Extracto de pulpa -SO₂, pH 4,5, inoculándose a razón del 1% v/v. Una serie de cultivos se incubó bajo condiciones anaerobias, cubriéndose los mismos con una fina capa de parafina líquida estéril, en tanto la otra se continuó incubando bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura , todos durante 48 horas.

Los cultivos anaeróbicos fueron entonces sembrados por dilución en placas con agar extracto de malta, pH 3,5 , para obtener colonias aisladas.

Los cultivos aeróbicos fueron propagados esta vez a la misma razón de inóculo (1% v/v) al medio pectina-cafeína y se incubaron durante 48 horas bajo las mismas condiciones. Finalmente se sembraron por dilución en placas de agar extracto de malta, pH 3,5, para obtener colonias aisladas.

Conservación: Las cepas aisladas se conservaron en cuñas de agar extracto de malta a 4 °C.

Detección de levaduras pectinolíticas:

Se escogieron 30 colonias (28 levaduriformes y dos colonias filamentosas) en virtud de sus diferencias en cuanto a morfología de la colonia en placas de agar extracto de malta, material

de procedencia y condiciones de aislamiento. Se sembraron en placas conteniendo extracto de levadura 2,3 g/L; peptona 4,7 g/L; galactosa 5 g/L; ácido poligalacturónico (PGA) 5 g/L (Kodak) y agar bacteriológico 20 g/L. Aquellas colonias que exhiben actividad pectinolítica fueron detectadas por la formación de un halo claro, luego que el medio fue tratado con HCl 6 mol/L (Zink y Chatterjee, 1985), seleccionándose la de mayor halo para estudios posteriores.

Identificación: Se realizó según Lodder y Kreger (1952).

III.3.- Producción de pectinasas por la cepa seleccionada.

III.3.1. Influencia de la glucosa y de la concentración de pectina en el medio.

Se formularon seis medios conteniendo todos extracto de levadura 2,3 g/L; peptona 4,7 g/L; pH 5,6 y la fuente de carbono (glucosa/galactosa) a 10 g/L. La fuente de carbono y la concentración de pectina (Pectina de manzana, ENSUFARMA, Cuba) quedó de la siguiente manera:

Medio	Fuente de carbono	Concentración de Pectina g/L
A	Glucosa	-
B	Galactosa	-
C	Galactosa	0,1
D	Galactosa	1
E	Galactosa	5
F	Galactosa	10

Los cultivos se efectuaron por triplicado en erlenmeyers de 25 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo. Se inoculó a razón del 1% v/v con un cultivo de 24 horas en medio YPG (Oxoid) y se incubó en zaranda a 240 r.p.m. y 30 °C de temperatura durante 72 horas. Pasado este tiempo los cultivos fueron centrifugados a 5000xg durante 20 minutos para separar la biomasa y al crudo enzimático libre de células se le determinó la actividad polimetilgalacturonasa total (PMG total).

III.3.2.- Cinética de la producción de pectinasas por la cepa seleccionada.

Se empleó el medio B ya descrito en III.3.1 y se inoculó a razón del 5% v/v con un cultivo de 24 horas en medio YPG. La fermentación se llevó a cabo en erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL del medio de cultivo, incubándose en zaranda a 240 r.p.m. y 30 °C. Cada 12 horas se tomaron asepticamente 10 mL de cultivo para las determinaciones de biomasa, actividad PGM total y azúcares reductores.

III.4.- Producción de alcohol por la cepa seleccionada. Influencia de la pectina en el medio de cultivo.

Medio: Glucosa 100g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,2 g/L; KH_2PO_4 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; CaCl_2 0,15 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; pH 5,0.

A uno de los medios se le adiciona pectina para una concentración de 10 g/L y al otro no. Se lleva en paralelo un control del medio con pectina sin inocular. Los medios se esterilizan a 110 °C durante 15 minutos.

Los medios se inoculan a razón del 5% v/v con un cultivo de 24 horas en YPG del microorganismo seleccionado. La fermentación se efectúa en frascos de 120 mL conteniendo 50 mL del medio de cultivo, en reposo, a la temperatura de 30 °C durante 96 horas.

Concluida la fermentación los cultivos se centrifugan a 5000xg durante 20 minutos separándose la biomasa. El medio fermentado libre de células se utiliza para la determinación de azúcares reductores, alcohol, acidez total y actividad PMG total.

Se calculan el *rendimiento producto/ sustrato* y la *eficiencia*.

III.5.-Producción, purificación y caracterización de las enzimas pécticas producidas por la cepa seleccionada.

III.5.1.- Producción y purificación (ver flujo de purificación en Anexos, Fig. 7)

La cepa conservada en cuñas de extracto de malta se propaga durante 24 horas en medio YPG, inoculándose luego a razón del 1% v/v al medio de producción, siendo su composición la ya descrita para el medio E (epígrafe III.3.1). La producción se efectúa en erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio, incubándose el cultivo a la temperatura de 30 °C, en zaranda a 240 r.p.m. durante 90 horas. Pasado este tiempo el cultivo se centrifuga a 5000xg durante 20 minutos para separar la biomasa. El crudo enzimático libre de células se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 65 % m/v (aproximadamente 90 % de saturación). Se deja reposar 1 hora y se centrifuga a 5000 xg, 15 minutos. El precipitado se lava con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 65 % m/v y se vuelve a centrifugar. Finalmente se resuspende en buffer acetato 50 mmol/L, pH 5,0 y se dializa contra el mismo buffer repetidamente durante 12 horas. El dializado es aplicado a una columna de Fractogel EMD Sulfonato-650 (s) (Merck), quedando retenida a la matriz toda la actividad PMG. Se eluye con gradiente continuo de 0-300 mmol/L de NaCl en el mismo buffer a un flujo de 12 mL/h y se registra de forma continua la concentración de proteína en el eluato a 280nm en UVICORD S (LKB). Se colectan los picos y se ensayan para la actividad PMG.

III.5.2.- Caracterización del enzima purificado:

- *Determinación del cambio de viscosidad contra por ciento de enlaces hidrolizados:* Se utiliza una mezcla de reacción conteniendo sustrato 95% v/v, enzima 5% v/v. El ensayo se desarrolla a 37 °C durante 60 minutos, tomándose muestras (10 mL) cada 10 minutos para las determinaciones de viscosidad y grupos reductores liberados. Las muestras son inactivadas con 3 mL de NaOH 0,1 mol/L. La viscosidad de las muestras inactivadas se mide en un viscosímetro Cannon-Fenske No. 4, asumiendo el tiempo de caída (en

segundos) como unidades arbitrarias de la viscosidad del fluido. Como sustrato se utilizó pectina al 1 % en buffer acetato 50 mmol/L, pH 5,0.

Cálculo del % enlaces hidrolizados:

$$\% \text{ enlaces hidrolizados} = \frac{R_t - R_o}{PRM - R_o} \times 100$$

donde: R_o : concentración de reductores en a mezcla de reacción a $t = 0$

R_t : concentración de reductores a tiempo t

PRM: máxima concentración posible de reductores en la mezcla de reacción (calculada). Para este caso $PRM = 4,469 \text{ g/L}$.

- *Efecto del pH sobre la actividad:* Se utiliza como sustrato pectina 1% en buffer citrato 100mM en el rango de pH de 3,0-7,0 permaneciendo las demás condiciones igual.
- *Efecto de la concentración y grado de esterificación del sustrato sobre la actividad:*
Sustrato: Pectina de manzana (28,9 % de esterificación) y PGA (no esterificado), ambos en buffer acetato 50 mmol/L, pH 5,0.
Rango de concentraciones (en la mezcla de reacción): 0,2-5 mg/mL (sobre la base del sustrato puro).
Tiempo de reacción: 10 minutos.
Temperatura: 37 °C.
- *Efecto de la temperatura sobre la actividad:* El ensayo se realiza usando como sustrato pectina 1% en buffer acetato 50 mmol/L pH 5,0 en el rango de temperatura de 20-70 °C.
- *Estabilidad térmica:* Se incuba la enzima (en ausencia de sustrato) a las temperaturas de 37 y 60 °C tomándose muestras a las 10, 20, 30, 45, 60 minutos para la determinación de actividad enzimática en las condiciones de ensayo estándar.
- *Electroforesis:* El peso molecular del enzima purificado fue determinado por PAGE-SDS (Weber y Osborn, 1969), usando un gel de poliacrilamida al 12,5 % (m/v) en buffer Tris-Glicina (pH 8,4), teñido con Coomassie Brillante Azul 0,1 % y desteñido con ácido acético al 7,5 % m/v. Se usaron como patrones de peso molecular BSA (67 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa) y Lisozima (14,6 kDa) (todos los patrones de la BDH Chemicals Ltd.)

III.6. - Determinación de actividad PMG total y proteínas totales.

Determinación de actividad PMG total: La actividad PMG fue medida determinando los grupos reductores liberados del sustrato (pectina de manzana, ENSUFARMA, Cuba) al 1% en buffer acetato 50 mmol/L, pH 5,0, producto a la hidrólisis enzimática. Los grupos reductores son estimados por el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (Miller, 1959), utilizando glucosa

como estándar. El ensayo se desarrolla a 37 °C durante 30 minutos utilizando una relación enzima/sustrato de 1/5 (Ross, 1992). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1nmol de extremos reductores por minuto a 37 °C y pH 5,0.

Determinación de proteínas totales: Se desarrolla según Lowry y col. (1951) usando BSA (BDH Chemicals Ltd.) como estándar.

III.7.- Sustratos empleados en los ensayos de actividad enzimática (características).

Pectina de Manzana (ENSUFARMA, Cuba)

Humedad: 16 %

Acido anhidrogalacturónico: 58,6 %, base húmeda
(como pectina (calculado): 59,9 %)

Grado de esterificación: 28,9 % (bajo)

Poder reductor: 5,5 % (como ácido anhidrogalacturónico), base húmeda

Acido poligalacturónico (PGA) (Kodak)

Acido anhidrogalacturónico: 89,3 %, base húmeda.

III. 8.- Utilización de la pectina y la cafeína por la cepa seleccionada.

Medio de cultivo: Se utiliza el medio mineral recomendado por Maiorella y col (1981) para la fermentación alcohólica como medio basal, sustituyendo la fuente de carbono por combinaciones de pectina y glucosa y la fuente de nitrógeno por combinaciones de cafeína y sulfato de amonio, ajustando todos los medios a una misma concentración de nitrógeno y carbono elemental.

Composición del medio mineral basal

Componentes	g/L
Dihidrógeno fosfato de potasio	1,53
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,55
Cloruro de calcio	0,13
Acido bórico	0,01
Sulfato de cobalto heptahidratado	0,001
Sulfato de cobre pentahidratado	0,004
Sulfato de zinc heptahidratado	0,01
Sulfato de manganeso monohidratado	0,003
Yoduro de potasio	0,001
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	0,002
Sulfato de aluminio	0,003
Biotina	0,000125
Pantotenato de calcio	0,00625
Inositol	0,125
Tiamina	0,005

Piridoxina	0,00625
ácido p-aminobenzoico	0,001
ácido nicotínico	0,005

Las vitaminas y los elementos trazas se prepararon como soluciones stock 100X, esterilizándose la solución de vitaminas por filtración a través de filtros de 0,22 μm (Millipore)

Combinaciones Pectina/ Galactosa/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / cafeína utilizadas:

Componentes	Medios			
	I	II	III	IV
Glucosa (g/L)	20	5	-	20
Pectina (g/L)	-	15	20	-
Cafeína (g/L)	3,6	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	-	5,2	5,2	5,2

Condiciones de la fermentación: La fermentación se desarrolla en frascos erlenmeyers de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo. Como inóculo se utiliza un cultivo de 24 horas ($A_{620} = 5,0$) en YPG, lavándose previamente las células con agua destilada estéril y resuspendiéndose luego en ella, para la misma A_{620} , inoculándose a razón del 1 % v/v. Se incuba en zaranda a 240r.p.m. y temperatura de 30 °C.

Se sigue el crecimiento microbiano por mediciones de la absorbancia a 620 nm hasta alcanzarse la fase estacionaria, entonces se determina la concentración de reductores a todos los medios y de cafeína al medio **I**.

III.9.- Métodos analíticos.

- *Materia seca (Humedad):* Secado en horno a 105-110 °C, FAO (1981).
- *Sólidos totales y suspendidos:* Según Standard Methods (17ª Ed., 1989).
- *Cenizas:* Calcinación a 550-600 °C (AOAC, 1980).
- *Acidez total:* Método volumétrico utilizando fenolftaleína como indicador (se expresa como ácido acético).
- *Nitrógeno total:* Método de Kjeldahl estándar (AOAC, 1965).
- *Azúcares reductores:* Método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (Miller, 1959).
- *Carbohidratos totales solubles:* Método del fenol sulfúrico (Dubois y col, 1956).
- *Cafeína:* Extracción con cloroformo de medio fuertemente alcalino y cuantificación espectrofotométrica a 275,9 nm (Shufen, 1990).
- *Pectina:* Precipitación con etanol al 65 % v/v en medio ácido y posterior determinación por valoración ácido-base hasta pH 7,5 (Kertez, 1951).
- *Fósforo:* Método del metavanadato. Standard Methods (17ª. Ed., 1989).
- *Sodio y Potasio:* Fotometría de llama. Standard Methods (17ª. Ed., 1989).
- *Calcio y Magnesio:* Valoración complejométrica. Standard Methods (17ª. Ed., 1989).

- *Biomasa*: Mediciones turbidimétricas a 620 nm utilizando una curva patrón estandarizada mediante determinación gravimétrica de la biomasa (secado a 105-110°C).
- *Alcohol etílico*: Método de microdifusión y colorimetría (Conway, 1947).

III.10 Procesamiento estadístico de los resultados (cuando lo requieren).

Se utiliza un análisis de varianza de clasificación simple y el test de rangos múltiples de Duncan para comparación de medias, en todos los casos para un nivel de significación del 5%. Los cálculos fueron realizados con ayuda del paquete estadístico STAT (Sigaroa, A; Universidad de La Habana, 1989).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1.- Caracterización de los residuales del proceso de beneficio húmedo del café. Influencia del proceso tecnológico y de la fermentación natural sobre su composición.

Tabla IV.1.1 Composición de las muestras líquidas.

Componentes	Agua de despulpe	Agua de lavado ^a	Extracto de pulpa ^b
Sólidos totales (g/L)	1,68	22,15 ± 0,24	49,4 ± 1,3
Sólidos suspendidos (g/L)	-	17,7	12,7
Sólidos solubles (g/L)	-	-	36,7
Nitrógeno total (mg/L)	-	7,3	8,2
Azúcares reductores (g/L)	-	1,65	2,54
Carbohidratos totales solubles (g/L)	0,16	6,22	2,86
pH	4,1	4,2	4,4
Acidez total (g/L)	0,36 ± 0,03	1,17 ± 0,02	1,41
Cenizas (%) ^c	-	5,3 ± 0,7	3,9 ± 1,1
Fósforo (mg/L)	-	10,4	12,6
Sodio (mg/L)	-	13,1	78,8
Potasio (mg/L)	-	21,2	108,2

Leyenda:

(^a): Se refiere a la primera agua de lavado.

(^b): Por extracción acuosa de la pulpa obtenida mediante despulpado en seco, usando la proporción agua: pulpa 1:1.

(^c): Gramos de cenizas en 100 g de sólidos totales.

Como se observa en la Tabla IV.1.1 la composición de sólidos totales en el agua de despulpe es muy pequeña, lo que descarta cualquier posibilidad de aprovecharla (no así de tratarla adecuadamente, toda vez que por su volumen y naturaleza de sus componentes se convierte en un peligroso residual), al mismo tiempo que ratifica que nuestra tecnología de beneficio húmedo es sumamente gastadora de agua. Si se considera que por cada kg de café cereza despulpado se consumen, como promedio, 3 L de agua, entonces el volumen de sólidos arrastrados representa alrededor del 5 % de los generados en este proceso (99 g/kg de frutos, (Bressani y col, 1972)). Investigadores colombianos (Zuluaga y col., 1993) estimaron en alrededor de un 50 % los sólidos arrastrados en el agua de despulpe, lo que tal vez sugiera que nuestra tecnología sea aún más consumidora de agua que lo que se estima.

Si observamos la composición de sólidos en el extracto de pulpa (que representa el caso ideal de un consumo de agua de 1L/kg de café cereza) se aprecia que su contenido de sólidos es 29

veces superior a los presentes en agua de despulpe, lo que indica que el consumo de agua es muy superior a la cifra estimada de 3L/kg.

En cambio, el agua del primer lavado de los granos fermentados presenta una composición mucho más interesante desde el punto de vista de su aprovechamiento. Este residual presenta un elevado contenido de sólidos en suspensión (17,15 g/L), correspondiendo estos mayoritariamente al hidrogel de pectina que conforma el mucílago. Si comparamos el contenido de carbohidratos del agua de lavado con el reportado por Nadal (1959) (Anexos, Tabla 4) para el mucílago, es de apreciar una disminución considerable, lo que puede explicarse en virtud del proceso fermentativo que ha tenido lugar y a la dilución durante el lavado. El contenido de carbohidratos totales solubles alrededor de 6 g/L y la acidez en 1,4 g/L evidencian lo anteriormente planteado.

A tenor con estos resultados ninguno de estos residuales líquidos, ni aún el extracto de pulpa, resultan atractivos para llevar a cabo un proceso de fermentación alcohólica, a menos que se introduzcan tecnologías concentradoras como las sugeridas por Ramajo (comunicación personal) y que implican consumos de agua de 1 L/ kg de café en baba, y que permitiría aprovechar el agua de lavado.

Los contenidos de nitrógeno y fósforo se encuentran muy por debajo de las necesidades de un medio de cultivo para levaduras en los tres residuales líquidos analizados.

Pasando a los residuales sólidos (Tabla IV.1.2), se observa una buena correspondencia con lo reportado por Elías (1978) y Traba y col. (1994), para la pulpa fresca, deshidratada y fermentada (Tablas II.1.1 y II.1.2), en cuanto a la composición bromatológica y compuestos orgánicos. El contenido de minerales, salvo el caso del fósforo que se encuentra en las muestras objeto de estudio en una proporción muy superior, se corresponde muy bien con lo reportado por Bressani y col. (1972).

Es de notar una disminución significativa ($p < 0.05$) en el contenido de carbohidratos y azúcares reductores entre la pulpa aislada manualmente y la fermentada y fermentada - deshidratada, evidenciando la influencia de los procesos fermentativo y tecnológico (arrastre por el agua de despulpe) sobre el contenido de estos importantes componentes. El balance de carbohidratos, nitrógeno, fósforo y minerales, en estos tres residuales los hacen muy atractivos con vistas a su valorización mediante el empleo de levaduras. Los contenidos de cenizas, pectina y cafeína se encuentra en los rangos reportados por Bressani (1972).

Si observamos las pérdidas en materia seca, sólidos solubles, azúcares reductores y carbohidratos en la pulpa agotada (Tabla IV.1.2) con relación a la despulpada manualmente, es de notar una adecuada correspondencia con la composición del extracto de pulpa, lo que corrobora que el agua del proceso desempeña un activo papel en el arrastre de estos valiosos componentes, convirtiéndose en un peligroso residual con muy pocas posibilidades de aprovechamiento.

Tabla IV.1.2 Composición de las muestras sólidas.

Componentes	PDM X ± S	PF8 X ± S	PF8D X ± S	PDS X ± S
Humedad (%)	78,7 ± 1,9	81,0 ± 0,8	9,7 ± 0,04	80,7 ± 0,96
Materia seca (%)	21,3 ± 0,52	19,0 ± 0,18	90,3 ± 0,36	19,3 ± 0,23
Sólidos solubles (%) ^a	35,7	23,3	32,0	23,3
Nitrógeno total (%) ^a	1,85 ± 0,08	1,73 ± 0,10	1,50 ± 0,07	1,45 ± 0,08
Azúcares reductores (%) ^a	8,52 ± 0,11	3,43 ± 0,10	2,97 ± 0,38	1,93
Carbohidratos totales solubles (%) ^a	13,0 ± 0,83	11,0 ± 0,67	9,65 ± 0,12	7,98 ± 0,05
Pectina (%) ^a	-	3,7	-	-
Cafeína (%) ^a	0,31 ± 0,003	-	-	-
pH	4,4	4,3	4,8	4,5
Acidez total (%) ^a	9,7 ± 0,3	10,3 ± 0,2	7,4 ± 0,3	8,0 ± 0,2
Cenizas (%) ^a	9,0 ± 0,3	7,5 ± 0,8	9,3	5,8 ± 0,04
Fósforo (mg %) ^b	949	-	797	-
Sodio (mg %) ^b	13,5	-	19,5	-
Potasio (mg %) ^b	1604	-	1650	-
Calcio (mg %) ^b	139	-	158	-
Magnesio (mg %) ^b	118	-	101	-

Leyenda:

PDM: Pulpa fresca, obtenida mediante despulpe manual.

PF8: Pulpa colectada durante el proceso de despulpe y dejada fermentar espontáneamente 8 horas.

PF8D: La PF8 deshidratada al sol durante 48 horas.

PDS: Pulpa obtenida mediante despulpe en seco, seguido de extracción con agua en la proporción 1:1.

(^a): Gramos del componente en 100 g de materia seca.

(^b): Miligramos del elemento en 100 g de materia seca.

Todo lo anterior apunta, que conforme se vayan reemplazando estas viejas tecnologías por otras de muy escaso consumo específico de agua (p.e. BECOSULB, Roa-Mejía y col, 1997), la posibilidad de aprovechamiento de los subproductos del beneficio húmedo del café se hará superior.

IV.2. Aislamiento y selección de levaduras pectinolíticas

La estrategia de aislamiento utilizada (ver Anexos, Fig. 6) se basó en un enriquecimiento secuencial, combinando el empleo de un medio selectivo para levaduras (extracto de malta, pH 3,5) con otros medios ricos en pectina y compuestos tóxicos como la cafeína, polifenoles y

SO₂, de modo que se favoreciera el crecimiento de levaduras resistentes a estos compuestos antifisiológicos y potencialmente pectinolíticas. La resistencia a SO₂ es una cualidad muy importante en levaduras productoras de alcohol, por cuanto permite el empleo de este compuesto como inhibidor del crecimiento de levaduras no deseables y bacterias.

Los resultados del aislamiento se muestran en la Tabla IV.2.1.

Tabla IV.2.1 Resumen de los resultados alcanzados con la estrategia de aislamiento utilizada.

Medio de enriquecimiento	Material de partida	Características de los aislados	Número de colonias seleccionadas
EP - SO ₂ - 4,5	Agua de despulpe	Colonias de levadura, de tamaño pequeño y mediano, dos tipos morfológicos predominantes: ambos de forma circular, bordes enteros mayoritariamente, uno con elevación abultada y color blanco y otro con elevación predominante y color amarillento.	4
	Agua de lavado	Colonias de gran tamaño, color blanco amarillento, aspecto cremoso, aplanada, bordes redondos.	5
	Agua de despulpe fermentada	Colonias de diferentes tamaños, blancas y amarillentas, protuberante y aplanada.	7
MPC - 4	Agua de despulpe	Colonias de tamaño mediano, blancas, protuberantes. Colonias filamentosas.	2
	Agua de lavado	Predominio de colonias filamentosas, en menor cantidad colonias levaduriformes blancas, de pequeño tamaño.	5
	Agua de despulpe fermentada	Predominio de colonias medianas, color blanco y redondeadas.	7

La identificación taxonómica de estos aislados arrojó la presencia predominante de levaduras del género *Saccharomyces* (27 %), seguido por *Endomycopsis* y *Lypomyces* (18 %) y en menor proporción los géneros *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Nadsonia* y *Hanseniaspora* (9 %). El predominio de levaduras en el mucílago fermentado, en particular del género *Saccharomyces* ha sido reportado también por Jones y Jones (1984).

De las 30 colonias evaluadas para actividad pectinolítica, sólo 3 resultaron positivas; dos colonias filamentosas y una levaduriforme, esta última mostrando una gran actividad. Dicha colonia fue identificada como *Saccharomyces cerevisiae* y procede del agua de despulpe fermentada, siendo aislada en el medio extracto de pulpa en cultivo anaeróbico.

El hecho de encontrar solo una cepa con actividad pectinolítica entre 28 colonias de levaduras evaluadas, confirma lo reportado por Luh y Phaff (1951), Sánchez y col. (1984) y otros autores de que esta es una propiedad relativamente rara entre levaduras.

La cepa seleccionada fue ensayada también sobre medio con pectina de manzana, utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio como revelador (Antier, 1993) y mostró igualmente actividad pectinolítica sobre ese sustrato, aunque en una medida considerablemente menor. Estos resultados se muestran en la Tabla IV.2.2.

Tabla IV.2.2. Halo de hidrólisis a las 72 horas.

SUSTRATO	DIAMETRO (mm)	ACTIVIDAD RELATIVA %
PGA	38	100
Pectina	30	62

Actividad Relativa (%) = $(D_{\text{pectina}})^2 / (D_{\text{PGA}})^2 * 100$, donde D: diámetro (mm)

En lo adelante este trabajo se centrará en el estudio de esta cepa pectinolítica la cual será denominada EP 915.

IV.3. Producción de enzimas pectinolíticas y alcohol por la cepa EP 915.

La síntesis de enzimas pécticas por la cepa *S. cerevisiae* EP 915 parece ser constitutiva, ya que el microorganismo es capaz de producirlas en presencia de glucosa y galactosa como fuentes de carbono (Anexos, Fig. 8). Se obtuvo también, que los niveles de producción se incrementan significativamente ($p < 0,05$) en presencia de pectina desde concentraciones de 0,1 hasta 10 g/L, no existiendo diferencias significativas entre ellos, excepto para la concentración de 5 g/L donde la producción de pectinasas alcanza un máximo significativo. Blanco y col. (1994) encontraron en la cepa *S. cerevisiae* CECT 1389 síntesis constitutiva de enzimas pécticas y que ésta era estimulada considerablemente por la presencia de PGA al 0,01 %, pero que a niveles superiores de concentración de PGA disminuía la actividad enzimática en el medio.

Como se observa en la Fig. 9 la síntesis de enzimas pécticas está asociada al crecimiento, alcanzando su máximo valor al llegar a la fase estacionaria, produciéndose luego una disminución de la actividad, al parecer debido al incremento del pH en el medio de cultivo que llega a ser de 6,9 a las 84 horas.

En la Tabla IV.3.1. se resumen los resultados de la fermentación alcohólica. Como se muestra no existen diferencias significativas en cuanto a la producción de alcohol, acidez total y actividad PMG total entre los medios con y sin pectina.

Los niveles de eficiencia alcanzados en la fermentación, superiores al 85 %, son muy buenos para una cepa no mejorada; Prescott (1962) plantea como buena una eficiencia del 90 % para cepas industriales. El hecho de comportarse la cepa de una forma indiferente ante una concentración de pectina en el medio de 10 g/L sugiere una cierta osmotolerancia en ella. Los valores de acidez total en el orden de 4 g/L se consideran aceptables para una levadura vinícola o cervecera (Palacio Llamas, 1956).

Como puede apreciarse la síntesis de enzimas pécticas bajo las condiciones de la fermentación alcohólica se comporta de modo similar que bajo condiciones aeróbicas (Fig. 8). La elevada concentración de azúcares reductores en el medio con pectina, comparado a su homólogo sin ella, indica que el polisacárido es hidrolizado en gran medida y que los productos de hidrólisis son muy poco o nada utilizados por el microorganismo.

Tabla IV.3.1 Resumen de la fermentación alcohólica.

	Medio sin Pectina	Medio con Pectina
Reductores (g/L) ^a	1,3 ± 0,15	11,2 ± 0,47
Alcohol (g/L)	44,7	44,0
Acidez total (g/L) ^b	4,06	3,95
PMG total (U/mL)	1607	1451
Y _{P/S₀} (%)	44,7	44,0
Eficiencia (%)	87,5	86,1

Leyenda:

(^a): como glucosa.

(^b): como ácido acético.

Y_{P/S₀}: Rendimiento producto/sustrato tomando por base la concentración inicial del sustrato.

Al comparar la turbidez (A₆₂₀) del medio con pectina fermentado con el control sin inocular se aprecia una reducción en la turbidez del 24 %, lo que habla a favor de la posible utilización de esta cepa en procesos de vinificación.

En otra experiencia realizada bajo condiciones similares se encontró que la producción de biomasa durante la fermentación es del orden de 1,2 g/L para un rendimiento biomasa/sustrato del 1,2 %, lo que corrobora las buenas cualidades de la cepa para la producción de alcohol.

IV.4 Purificación y caracterización del enzima pectinolítico de *S.cerevisiae* EP 915

El crudo enzimático fue ensayado para actividad liasa y esterasa por los métodos de Alaña y col (1989) y Albershein (1966) respectivamente, resultando negativos ambos ensayos, por lo

que la cepa sólo muestra actividad extracelular del tipo poligalacturonasa. Esto coincide con lo reportado en otras levaduras (Gómez-Ruiz, 1988; Blanco, 1994).

Los resultados de la purificación se muestran en la Tabla IV.4.1

Tabla IV.4.1. Resumen de la purificación.

Etapa de purificación	Volumen (mL)	Proteínas Totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Recobrado (%)	Purificación (veces)
Enzima crudo	45	24,5	27288	1114	100	1
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ y diálisis	3,5	3,41	12032	3528	44,1	3,2
EMD - Sulfonato - 650 (intercambiador catiónico)	10	0,142	6365	44824	23,3	40,2

No se observó actividad enzimática en el sobrenadante de la precipitación con (NH₄)₂SO₄. Al aplicar el dializado a la matriz de intercambio iónico toda la actividad enzimática queda retenida, y al aplicar el gradiente de fuerza iónica, solamente eluye un pico con actividad pectinolítica. El cromatograma se muestra en la Fig. 10 (Anexos).

La electroforesis PAGE-SDS (Fig. 11) muestra una sola banda exhibiendo un peso molecular de \approx 60 kDa, indicando la presencia de solamente una enzima pécica. Esto coincide con lo encontrado por Blanco y col. (1994) aunque ellos reportan un peso molecular de 39 kDa.

El grado de purificación alcanzado (40,2 veces) es corroborado por la homogeneidad electroforética observada.

Obsérvese en la Fig. 12 la rápida caída de la viscosidad respecto al porcentaje de enlaces hidrolizados; a los 40 minutos, cuando sólo un 10 % de los enlaces han sido hidrolizados, la viscosidad muestra una reducción superior al 45 %. Ese comportamiento es característico de las poligalacturonasas de levadura (Gómez-Ruiz y col, 1988; Luh y Phaff, 1954) sugiriendo un mecanismo de hidrólisis interno (Fogarty y Kelly, 1983), denotando que estamos en presencia de una endo- PG.

Las figuras 13 y 14 muestran los perfiles de **actividad vs pH** y **actividad vs temperatura** respectivamente. Como se observa la enzima presenta un pH óptimo de 4,5 y buena estabilidad en el rango de 3-5 para caer bruscamente a pHs superiores; Blanco y col. (1994) encontraron para una endo PG de *S. cerevisiae*, que la actividad caía bruscamente para valores de pH inferiores a 4. La temperatura óptima resultó ser de 55 °C, lo que es característico de las enzimas extracelulares de microorganismos mesofílicos.

La enzima conserva el 100 % de su actividad durante 60 minutos a 37 °C, en tanto que se inactiva completamente a 60 °C en 10 minutos (Fig 15).

Los valores de Km y Vm para dos sustratos diferentes: pectina y PGA fueron estimados mediante ploteos de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934), cuyos resultados se muestran en la Tabla IV.4.2 (ver también Anexos, Figs. 16 y 17).

Tabla IV.4.2 Parámetros cinéticos de la *endo* PG de *S.cerevisiae* EP 915.

Sustrato	Km (mg/mL)	Vm (nmol/mL · min)
Pectina	1,9	312,1
PGA	0,7	205,1

Los valores de Km de 1,9 y 0,7 mg/mL para pectina y PGA respectivamente muestran una mayor afinidad del enzima por el sustrato no esterificado. Estos valores son similares a los reportados para Pgasas de *Cryptococcus albidus* (Federici, 1985), *S. fragilis* (Limm y col., 1980) y *G.lactis* (Pardo y col., 1991). Los valores de Vm resultaron ser de 312,1 y 205,1 nmol/mL · min para pectina y PGA. Estos valores son superiores en un orden y medio a los reportados para *S.cerevisiae* CECT1389 (Blanco y col, 1994) y resultan inusuales en PG de levaduras.

IV.5. Utilización de la pectina y la cafeína por la cepa EP 915.

El análisis de los cultivos en fase estacionaria arroja los siguientes resultados (Tabla. IV.5.1).

Tabla IV.5.1. Análisis general de los cultivos en medio mineral a las 60 horas (fase estacionaria).

	Cultivos		
	I	II	IV
Biomasa (máx) (g/L)	0,26	2,86	5,75
Reductores (g/L)	28,2	7,8	0,1
Cafeína (g/L)	0,53	-	-

Leyenda:

(I): Cultivo con cafeína como única fuente de nitrógeno.

(II): Cultivo con glucosa 5 g/L y pectina 15 g/L como fuentes de carbono.

(IV): Cultivo con glucosa 20 g/L como fuente de carbono y (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno.

De los resultados mostrados aquí y en la figura 18 se aprecia que la cepa puede crecer (aunque limitadamente) usando la cafeína como única fuente de nitrógeno. Durante la fermentación, el microorganismo degrada el 85,3 % de la cafeína inicial liberando al medio compuestos con carácter reductor frente al DNS (obsérvese el elevado poder reductor del medio) y al reactivo de Fehling. Para levaduras ha sido establecida una ruta de biodegradación de la cafeína que implica la liberación de formaldehído (Terasawa y Murata, 1994), en un proceso de demetilación oxidativo promovido por una oxigenasa (Fig. IV.5.1). Al parecer la acumulación

de estos compuestos resulta tóxica para la levadura. Meyrial (1996) reporta que concentraciones de acetaldehído de 0.3 g/L inhiben el crecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*.

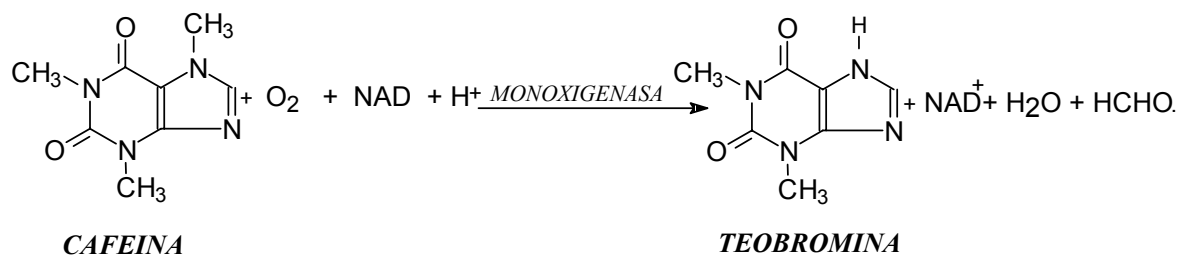


Fig. IV.5.1 Biodegradación de la cafeína asistida por monoxigenasa (Terasawa y Murata, 1994).

En cuanto a la utilización de la pectina se observa que la cepa es incapaz de crecer en presencia de pectina como única fuente de carbono y energía; en cambio, cuando se le adiciona glucosa 5 g/L al medio, la levadura es capaz de crecer utilizando no sólo la glucosa sino también a expensas de los productos de la hidrólisis de la pectina. Suponiendo un mismo rendimiento biomasa/ sustrato para la glucosa en los medios II y IV, entonces debía esperarse una concentración de biomasa de aproximadamente 1,44 g/L, obteniéndose el doble prácticamente, lo que sólo puede explicarse en virtud del consumo de los productos de hidrólisis de la pectina. Sin embargo, cuando aún existe en el medio una concentración de reductores de 7,8 g/L el crecimiento cesa. Esto podría explicarse sobre la base de lo expuesto por Demain y Phaff (1954) de que las poligalacturonasa de levaduras son incapaces de atacar el ácido digalacturónico, acumulándose este en el medio.

IV.6. Breves consideraciones acerca de la potencialidad económica de los resultados alcanzados.

La producción de alcohol a partir de los residuales del beneficio húmedo del café (pulpa y mucílago) ha sido un aspecto pobremente tratado en la literatura y, además de cuestionable viabilidad económica considerando los rendimientos máximos posibles y el carácter temporal y disperso de la deposición de estos desechos.

El hecho de abordar la utilización de los mencionados residuales en un proceso integral cuyo resultado no sea un único producto (alcohol), sino toda una gama que incluya bebidas alcohólicas -y no alcohol propiamente dicho-, enzimas pectinolíticas y un suplemento para la alimentación animal detoxificado y enriquecido proteicamente ofrece, en cambio, un panorama mucho más atractivo.

Además, la fermentación alcohólica por tratarse de un proceso anaeróbico y por ende mucho menos exotérmico que su contraparte aeróbico, resulta más fácil de abordar tecnológicamente, mediante el empleo de sistemas simples y de bajo costo como los de fermentación en estado sólido.

Por otro lado, *S. cerevisiae* es considerado microorganismo GRAS (Generally regarded as safe) evitándose los largos y rigurosos estudios toxicológicos que debe realizarse a todo alimento no convencional para conseguir su aprobación. En estos aspectos, tecnológicos y toxicológicos, aventaja a los hongos filamentosos.

En este trabajo se ha logrado aislar una cepa de *S. cerevisiae* autóctona de residuales del beneficio húmedo del café, con buena capacidad de producir enzimas pécticas y alcohol y cuyas potencialidades para el aprovechamiento de estos desechos ya han sido consideradas anteriormente. Producto a que esta cepa es capaz de sintetizar constitutivamente enzimas pectinolíticas sus posibilidades de aplicación son mucho más amplias y podrían extenderse a su utilización en procesos industriales ya establecidos como son la producción de alcohol y proteína unicelular a partir de mieles finales, con la incorporación de un nuevo producto de alto valor agregado y con demanda en el mercado interno: las enzimas pécticas.

V. CONCLUSIONES

- 1) En las condiciones del proceso tecnológico actual la pulpa de café constituye el único residual factible de ser aprovechado por fermentación alcohólica, influyendo sobre su composición el consumo de agua en el proceso y el tiempo de fermentación.
- 2) La producción de enzimas pécticas por la cepa *S. cerevisiae* EP 915 está asociada al crecimiento y es estimulada por la presencia de pectina en medio, aún a concentraciones tan bajas como 0,1 g/L.
- 3) La producción de alcohol por la cepa seleccionada no se ve afectada por concentraciones de pectina en el medio de hasta 10 g/L.
- 4) La enzima péctica producida por *S. cerevisiae* EP 915 es del tipo endo-PMG y se muestra hiperactiva frente a pectina de bajo grado de esterificación y PGA, presentando un rango de pH óptimo de 4-4,5 y una temperatura óptima de 55 °C.
- 5) *S. cerevisiae* EP 915 es capaz de utilizar la pectina en presencia de glucosa a 5 g/L. y de biodegradar extensivamente la cafeína cuando esta se encuentra en el medio como única fuente de nitrógeno.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alaña, A.; Gabilondo, A.; Hernando, F.; Moragues, M.D.; Domínguez, J.B.; Llama, M.J. y Sierra, J.L., (1989), Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* Strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 55:1612-1616.
- Albersheim, P. (1966), Pectin lyase from the fungi. **Methods Enzymol.** 8, 628-631.
- 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 Microbiology Technology.** Vol. 15, (3), pp. 2-20.
- A.O.A.C., (1965), **Official Methods of Analysis Assoc Offic Agric Chem**, Washington D.C.
- A.O.A.C., (1980), **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 13th edu. Washington D.C.
- Aquihualt, 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 nueva 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, p10.
- Bell, T. A.; Etchells, J.L., (1956). Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeast, **Appl Microbiol** 4:196-202.
- Beldman, G.; Rombouts, F. M.; Voragen, A. G. J.; Pilnik, W., (1984), Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. **Enzyme Microb Technol** 6:503-507.
- Bermúdez, R. C.; Traba, J. A.; Verdecia, M.J. y Gross, P., (1994), Producción de *Pleurotus sp.* en Florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. **Micología Neotropical Aplicada** 7:47-50.
- Bermúdez, R. C., (1995), **Aprovechamiento Biotecnológico de Residuos Industriales.** (Apuntes). ESPOCH, Riobamba, Ecuador. p. 90.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Díaz, A. and Villa, T. G., (1924), Production an partial characterization of a endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*, **Can. J. Microbiol.** 40:974-977.
- Boopathy, R., (1989), The overall economics of anaerobic digestion on a coffee state. Design calculation and economics assesment, **Indian Coffee**, 53(7): 13-17.
- Bressani, R.; Estrada, E.; Jarquín, R., (1972), Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba** 22:299-304.
- 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.
- Brown, M. R.; Ough, C. S., (1981), a comparison of activity and effects of two commercial pectic enzyme preparations on white grape must and wines. **Am J Vitic Enol** 32:272-276.

- 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.
- Cabezas, M. T; Flores, A. y Egaña, J.I., (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.
- Chatterjee, A.; Cui, Y.; Liu Y.; Dumenyo, C.K.; Chatterjee, A.K., (1995), Inactivation of rsm A leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Appl Environ Microbiol.** 61 (5): 1959-67.
- Chesson, A.; Codner, R. C., (1978), Maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. **J. Appl. Bacteriol.** 44:347-364.
- Conway, J., (1947), Microdiffusion analysisism volumetric error. Crosby Lockwood, London.
- Demain, A. L. y Phaff, H. J., (1957), Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. **Wallerstein Labs Commun.** 20 (69)119-140.
- Droillard, M. J.; Guclu, J.; Le Caer, J. P.; Mathieu, Y; Guern, J.; Lauriere, C., (1997), Identification of calveticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. **Planta.** 202 (3):341-8.
- Dubois, M.; Guilles, K.; Hamilton, J. K. ; Robers, P.A. y Smith, F., (1956), Colorimetric methods for determination al sugar and related susbtances. **Anal Chem** 28, p.350-356.
- Elias, L.G., (1978), Composición química de la pulpa de café y otros subproductos” en **pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. J.E. Braham y R. Bressani (Eds). Instituto Internacional de Investigaciones para el desarrollo, Bogotá, Colombia, p.19-29.
- Escurra, L., (1990), **Proteína microbiana: su importancia y valor nutritivo en la alimentación animal**. Centro de Información y Documentación Agropecuaria, La Habana, 56 p.
- 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.
- F.A.O., (1981), **Food and Nutrition Paper No.19** Rome, Italy.
- Federici, F., (1985), Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *Albidus*. **Antoine van Leeuwenhoek**, 51:139-150.
- 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 .
- Fogarty, V. M.; Ward, U. P. (1974). Pectinase and pectic polyssacharides. In HockenHull, D. J. D. (ed). **Progress in industrial microbiology**. London: Churchill Livingstone, Vol. 13,p. 59-119.
- García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L. and Barzana, E., (1987^a), Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters** 9:411.

- Gómez-Ruiz, L.; García-Garibay, M. and Barzana, E.,(1988), Utilization of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. **Journal of Food Science**. 53(4):1236-1240.
- Jones, K.L. y Jones, S.E., (1984), Fermentations involved in the production of cocoa ,coffee and tea. En **Progress in Industrial Microbiology** (Eds by M.E.Bushell), Vol 19, Elsevier, 1984.
- Joshi, V. K. and Sandhu, D. K., (1994), **Solid State Fermentation** (ed. Pandey, Ashok). Wiley Eastern, New delhi, p.93-98.
- Joshi, V. K.; 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 Agosto.
- Lim, J.; Yamasaki, Y. Y Ozawa, J., (1980), Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. **Agric Biol Chem** 44: 473-480.
- Lineweaver, H. y Burk, D., (1934), Determination for enzyme dissociation constantes. **J. Am. Chem. Soc.** 56:658-666.
- Lodder, J.; Kreger ,(1952), **The yeast: A taxonomy Study** International Publishers, Inc. New York.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J., (1956), Protein measurement with folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193, 265-75.
- Luh, B. S.;Phaff, H. J., (1951I, Studies are polygalacturonase of certain yeast. **Arch Biochem Biophys**.33:213-227.
- Luh, B. S.;Phaff, H. J., (1954), Propertis of yeast polygalacturonase. **Arch Biochem Biophys** 48:23-37.
- Maiorella, B.; Wilke, C.R. y Blanch, H.W., (1981), Alcohol production of recovery, in **advances in Biochemical Engineering** Vol.20, ed by A.Fiechter y col, p.43 (Springer-Verlag, Berlín).
- Martínez-Carrera, D. y col., (1993), Análisis económico y financiero de una planta rural de producción de hongos comestibles *Pleurotus* en Cuetzalan, Puebla, México. **Micología Neotropical Aplicada**. Vol. 6.
- 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 26 p.
- Miller, G.L., (1959), Use of D.N.S. Acid reagent for determinations of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. Vol.31, No.3, Marzo.
- Meyrial, Y., (1996), Bioconversión des glucides majeures derives des lignocelluloses en ethanol. Relation entre les flux de protons traversant la membrane plasmique et la tolerance a l'ethanol de *Pichia stipitis*. **Tesis doctoral**, Universidad Claude Bernard-Lyon I, Francia.
- Nadal, G.M., (1959), Coffee mucilage, its chemical composition. **Coffee and Tea Ind** 82 (No.8): 17-18.
- Palacio Llamas, H., (1956), **Fabricación de alcohol**. 1ra ed. Salvat Editores S.A. Barcelona.
- Pariza, M. W. and Foster, E. M., (1983), Determining the safety of enzymes used in food processing. **Journal Food Protection**. 46,453-468.
- Pardo, C.; Lapeña, M.A. y Gacto, M., (1991),Purification and caracterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis* .**Can. J. Microbiol** 37:974-977.

- Phaff, H. J. y Luh, B. S., (1952), The preparation of pure di-and trigalacturonic acids. **Arch. Biochem and Biophys** 36:231-232.
- Pilnik, W.; Voragen, A.G.V. (1970), Pectic substances and other uronides. In Hulme A. C. (ed): **Biochemistry of fruits and their products**, Vol.1, Academic Press, London. P.53-88.
- Pilnik, W.; Rombouts, F.M., (1979), Pectic Enzymes. In Blanshard I.M.V.; Mitchell, J.R.(eds): **Polysaccharides in food**. Butterworths, Boston,p.109-126.
- Prescott, S.C.; Dunn, C.G., (1962), **Microbiología Industrial de las Fermentaciones**. 3ra Ed. Aguilar, S.A. de Ediciones, Madrid.
- Pretorius y Van der Westhuizen,t. J. ,(1991), The impact of yeast genetics and recombinant DNA Technology on the wine industry: a review. **S. Afr J. Enol.Vitic**. 12:3-31.
- Rankine, B., (1991), Some thoughts on enzymes in wine-making. **Aust Graegr Winwmark** 334:13.
- Ravelomanana, R.; Guiraud, J.P.; Galzy, P., (1986), Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa beans. **Syst Appl Microbiol** 8:230-233.
- Reymond, P.; Konz, B; Paul-Pletzerk, K.; Grimm, R.; Eckerskorn, C.; Farmer, E. E., (1996), Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. **Plant Cell** 8(12): 2265-76.
- Roa-Mejía, G.; Oliveros-Tascón, C.E.; Sanz-Uribe, J.R.; Alvarez-Gallo, J.; Ramirez-Gómez, C.A.; Alvarez-Hernández, J.R., (1997) **Desarrollo de la técnica BELCOSULB para el beneficio ecológico del café**. Chinchiná, Cenicafé 8p.(Avances técnicos No.164).
- Rombouts, F. M.; Pilnik, W., (1980) **Pectic enzymes**. In Rose A.H.(ed.)Economics Press, NewYork, p.227-282.
- Ross, J. M., Saura, D., Coll, L. y Laencina, J. (1992). Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pecticas y actividades enzimáticas pectolíticas. **Alimentación, Equipos y Tecnologías**, p. 149-154. Marzo.
- Sánchez, J.;Guiraud, J. P.; Galzy, P., (1984), A study of the galacturonase activity of several yeast atrains isolated from cocoa. **Appl Microl Biotechnol** 20:262-267.
- Saulnier, L.; Brilloet, J. M., (1988), Structural studies of pectc substances from the pulp of grape berries. **Carbohydr Res** 182: 62-78.
- Schwan, R.F.' Cooper, R.M.; Wheals, A.E., (1997), Endopolygalacturanase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. **Enzyme and Microbial technology** 21:4, 234-244.
- Shevchik V.E.; Condermine, G.; Hugouvieux-Cottepattat, N; Robert-Baudouy, J., (1996), characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Mol. Microbiol** 19(3): 455-66.
- Shufen, Li.; Berger, J.; Hartland, S., (1990), U.V. spectrometric determination of theobromine and caffeine in coccoa beans. **Analytica Chimica Acta**, 232.
- Standard Methods for the examination of Water andWastewater,1989, 17th. Edn; M.A.H. Franson (M. Ed.). **American Public Health Association**, USA.
- Tapia, I. M.; Herrera-Saldana, R.; Viniegra G. G.;Gutierrez, 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.
- Terasawa, N.; Murata, M., (1994), Isolation of a fungus to decolorize coffee. **Biosc Biotech biochem** 58(11), 2093-95.

- Traba, J. A.; Marañón, A.; Bermúdez, R. C.; Verdecia, M. J.; Santana, M de A.; Fernández, M., (1994), Caracterización de los residuales sólidos del café, especie *Coffea arabica* L., **Ciencia** 45, 375-380.
- Trejo - Hernández, M.R.; Oriol, E.; López, A.; Roussos, S.; Vininegra, G.; Raimbault, M., (1991), Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. **Micology Neotrophy Appl.** 4.
- Weber, K. y Osborn, M., (1969), The reliability of molecular weight determination by Dodecyl sulfato-polyacrylamida gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry** 244, 4406-4412.
- 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.
- Zink, R.T. y Chatterjee, A. K.,(1985), Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes or *Erwinia carotovora*_subsp. *Carotovora*. **Appl Environ Microbiol** 49:714-717.
- Zuluaga, J. V., (1989), El beneficiado húmedo del café y la contaminación ambiental. **Resúmenes del Café**, 14 (18), 18.
- Zuluaga, J.; Zambrano, D.; Franco, M., (1993), **Biodigestión anaerobia de las aguas residuales del proceso de beneficio húmedo del café**. Centro Nacional de Investigaciones del café, Colombia.

ANEXO

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. 4 Flujo de caracterización: Muestras sólidas.

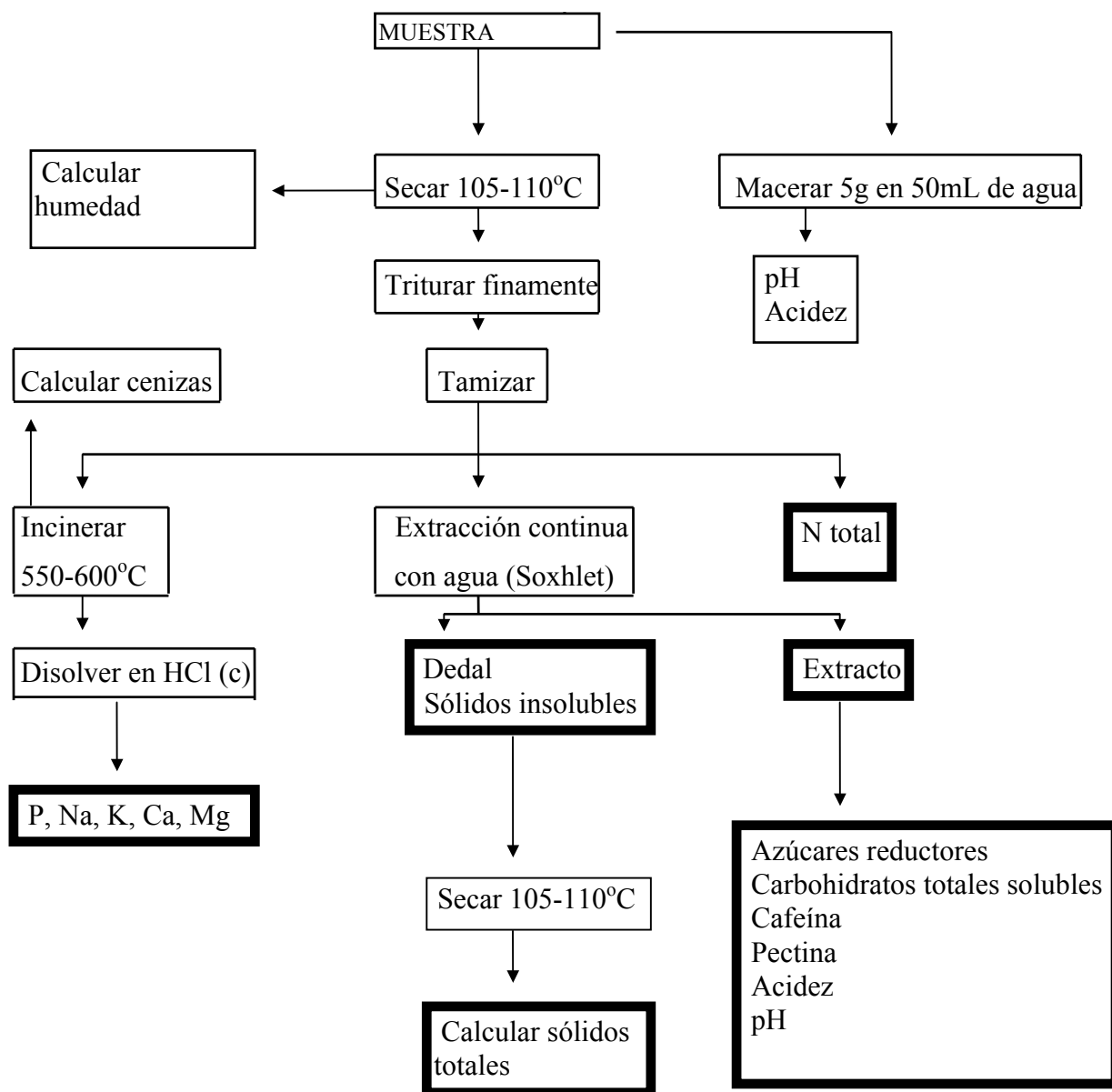


Fig. 5 Flujo de caracterización: Muestras líquidas.

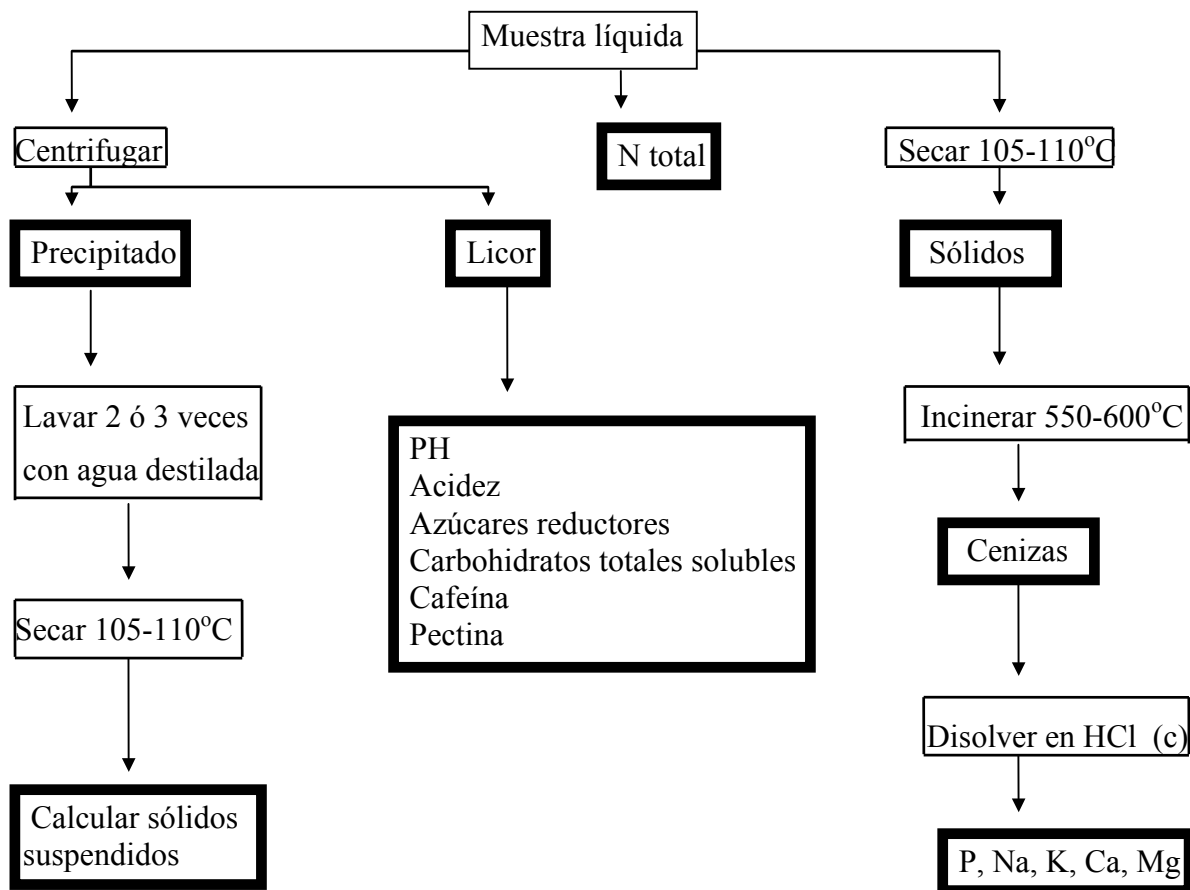
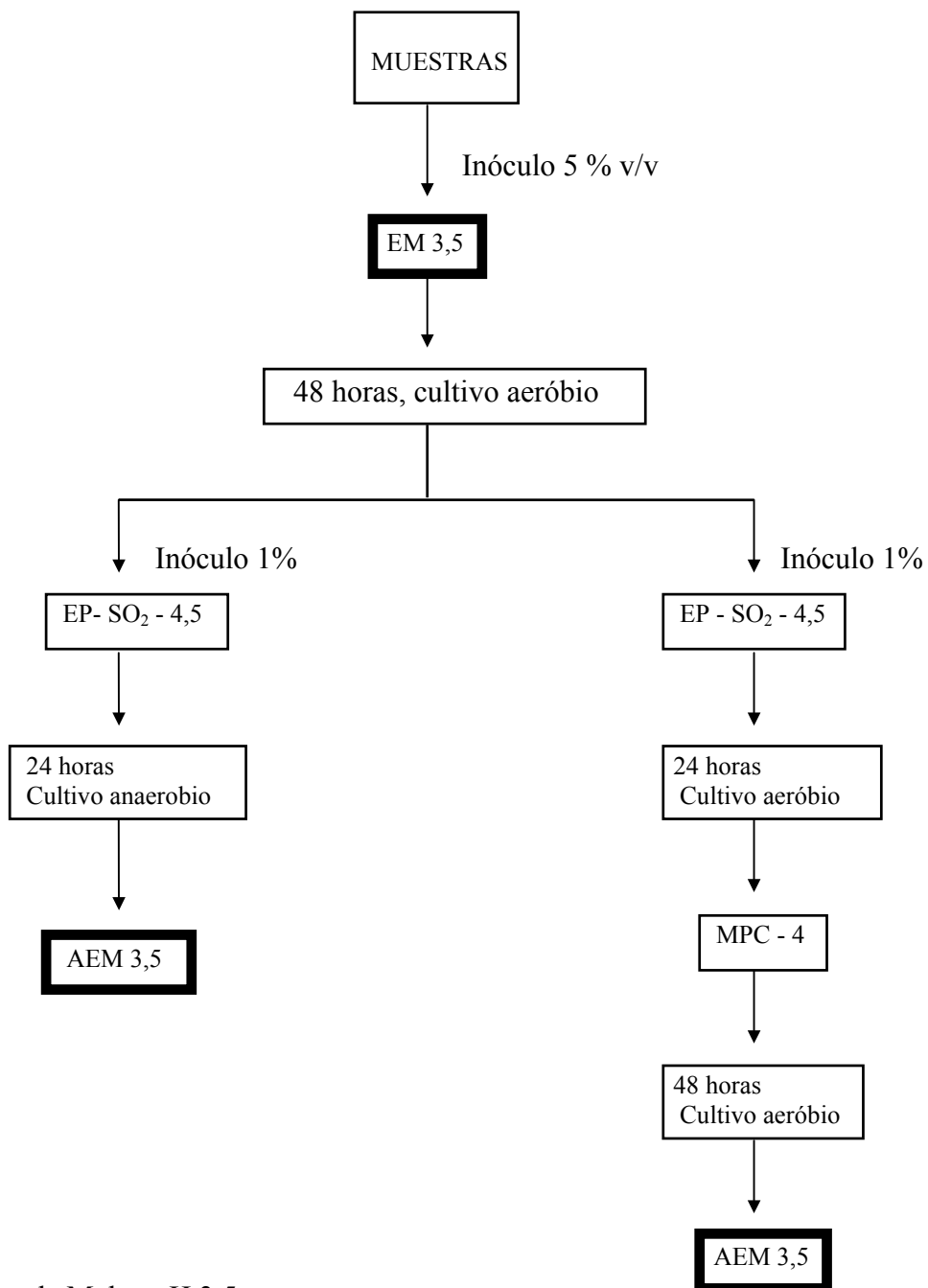


Fig. 6 Estrategia de aislamiento de levaduras pectinolíticas utilizada.

Materiales de partida

- Agua de despulpe
- Agua de despulpe fermentada natural
- Agua de lavado



Leyenda:

EM 3,5: Extracto de Malta, pH 3,5.

AEM 3,5: Agar Extracto de Malta, pH 3,5.

EP - SO₂ - 4,5: Medio Extracto de Pulpa - SO₂, pH 4,5.

MPC - 4: Medio Pectina - Cafeína, pH 4

Fig. 7 Flujo de purificación de la endopoligalacturonasa de *S. cerevisiae* EP 915.

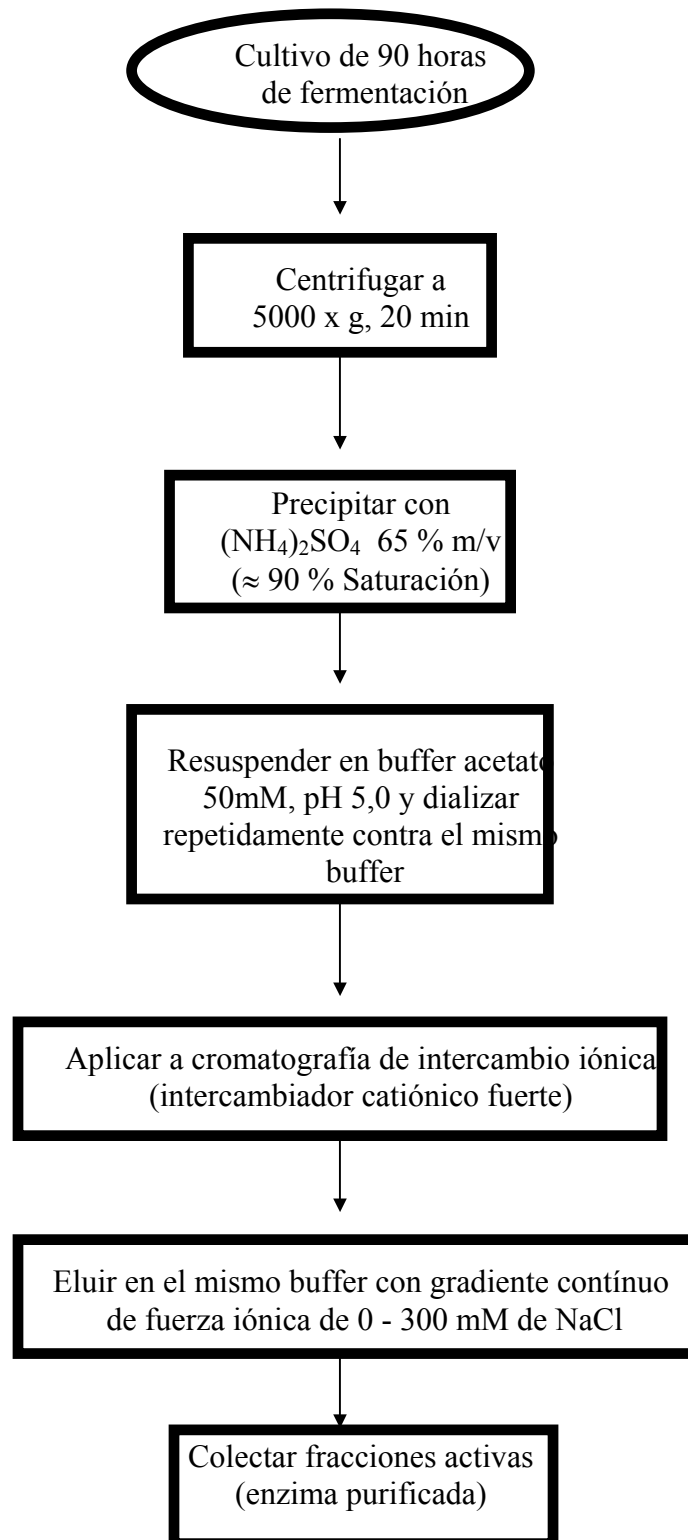


Fig. 1 Esquema del proceso de beneficio del café por vía húmeda.

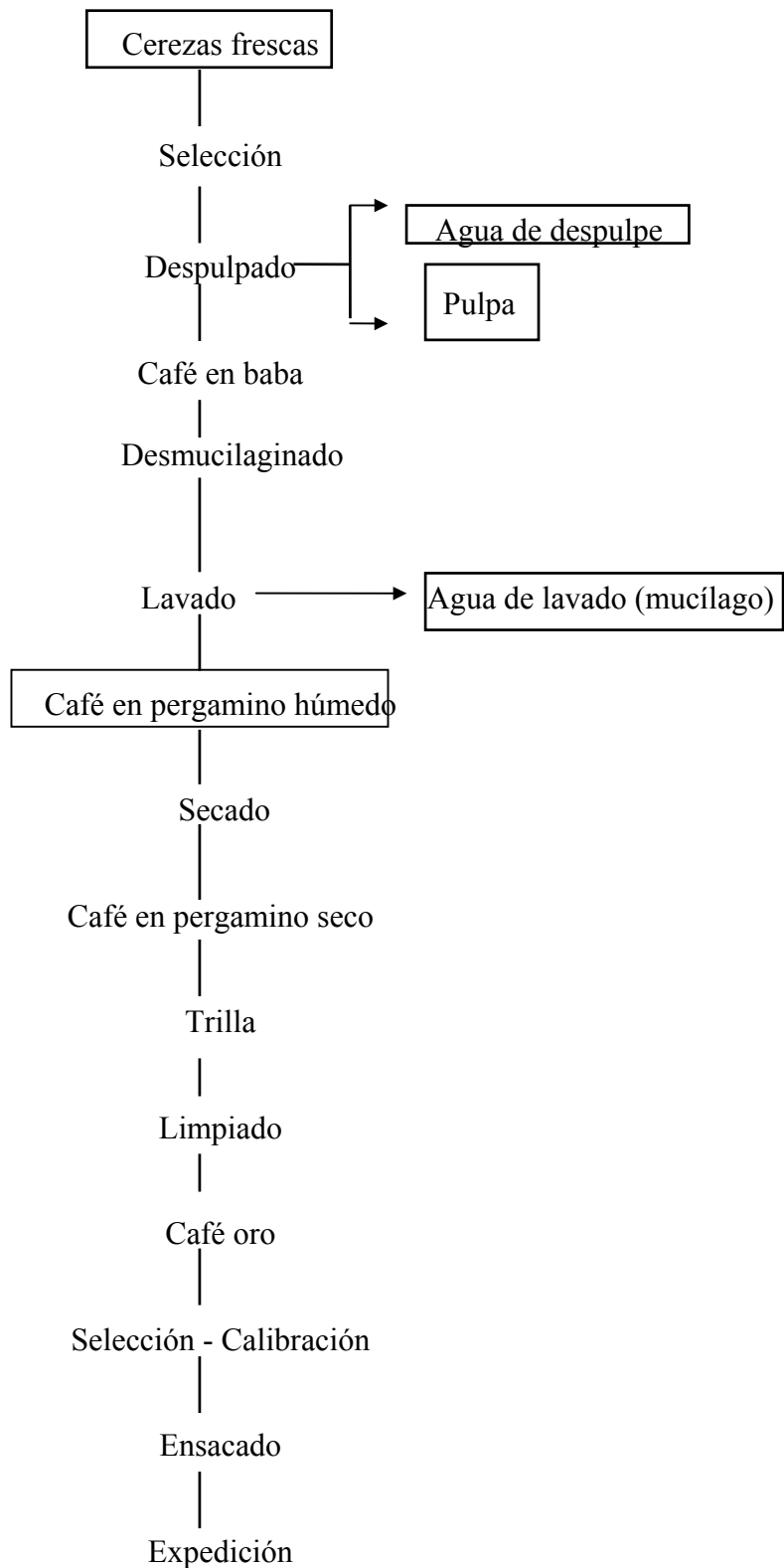


Fig. 2 Alternativas de uso para la pulpa de café (Bermúdez, 1995).

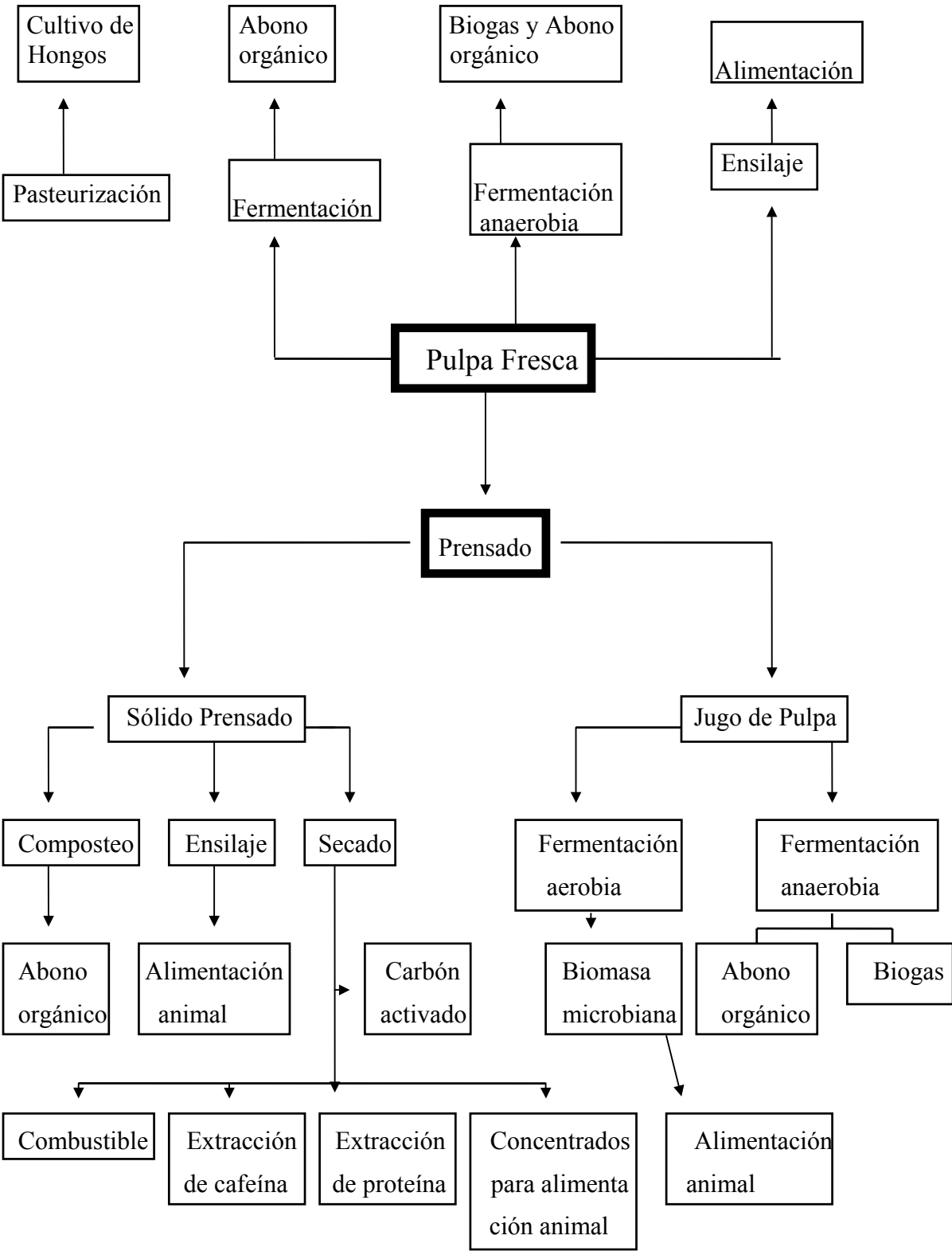


Fig. 3 Alternativas de uso para el mucílago de café (Bermúdez, 1995).

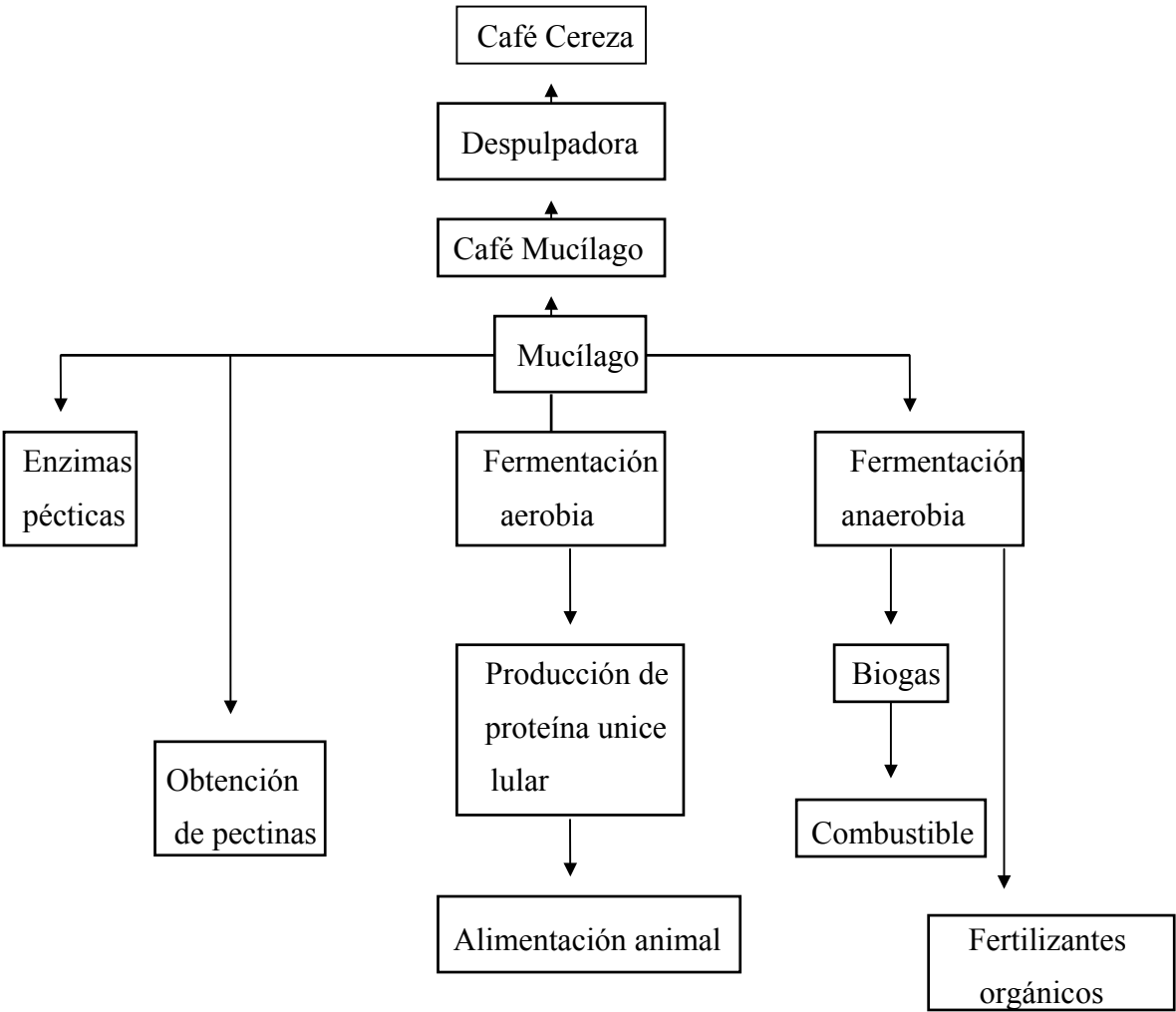
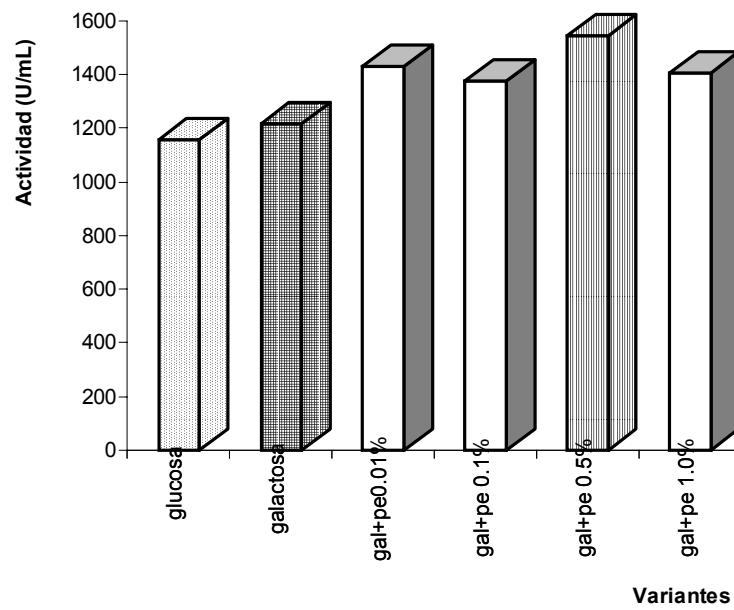


Tabla 5. Fracciones pectinolíticas producidas por diversos hongos y bacterias.

MICROORGANISMO	PG	PMG	PGL	PMGL	PMGE
Bacterias					
<i>Bacillus sp.</i>			+		
<i>Bacillus polymyxa</i>			+		
<i>Bacillus subtilis</i>			+		
<i>Pseudomonas sp.</i>			+		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+		
<i>Pseudomonas marginalis</i>	+		+		+
<i>Xanthomonas sp.</i>			+		+
<i>Xanthomonas campestris</i>			+		+
<i>Erwinia aroidea</i>	+		+		
<i>Erwinia carotovora</i>	+		+		
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>				+	
<i>Crostridium multifermentans</i>			+		
Hongos					
<i>Aspergillu niger</i>	+	+		+	+
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>				+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+		+	
<i>Aspergillus saito</i>	+				
<i>Fusarium oxysporum</i>			+		+
<i>Fusarium solani</i>			+	+	
<i>Penicillium italicum</i>				+	
<i>Penicillium expansum</i>	+				
<i>Penicillium digitatum</i>				+	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+				+
<i>Alternaria brassicae</i>		+	+	+	
<i>Rhizoctonia solani</i>	+			+	+
<i>Trichoderma koningii</i>	+				
<i>Tricoderma pseudokoningii</i>	+				

Fuente: Fogarty e Ward, 1974 p 88 - 89.



Leyenda:

gal: galactosa

pe: pectina

Fig. 8 Producción de enzimas pécticas por la cepa *S. cerevisiae* EP 915. Influencia de la fuente de carbono y la concentración de pectina.

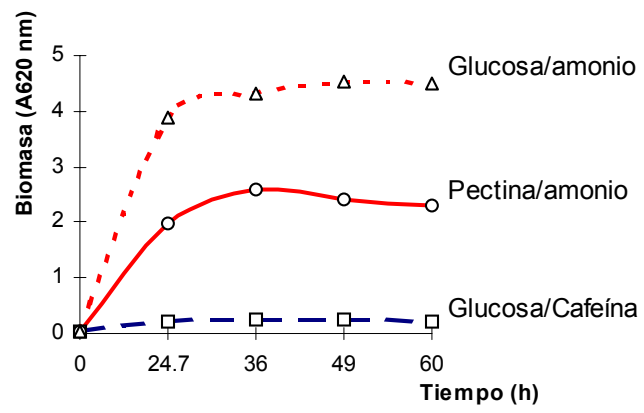


Fig.18 Crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* EP 915 en medio mineral.

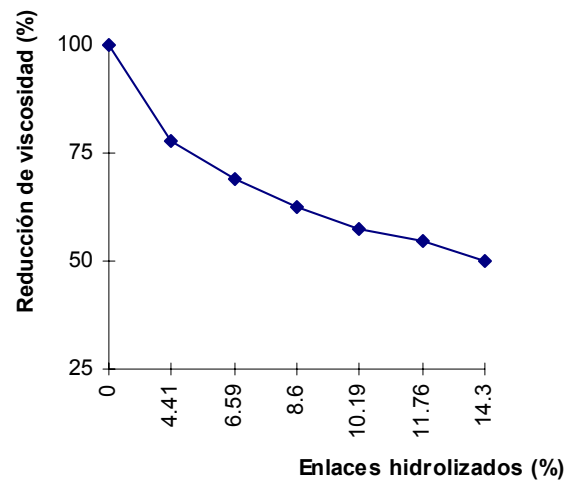


Fig. 12 Reducción de la viscosidad del sustrato vs % de enlaces hidrolizados por la endopoligalacturonasa de *S. cerevisiae* EP 915.

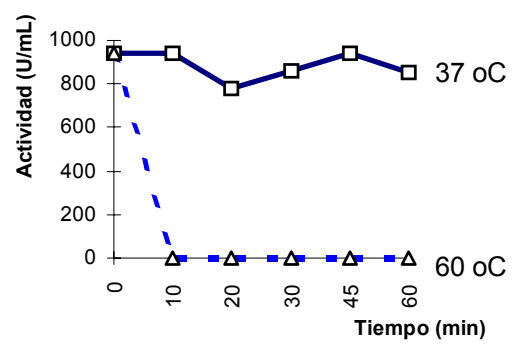


Fig. 15 Estabilidad térmica a 37 y 60 °C de la endo-PG de la cepa *S. cerevisiae* EP 915.

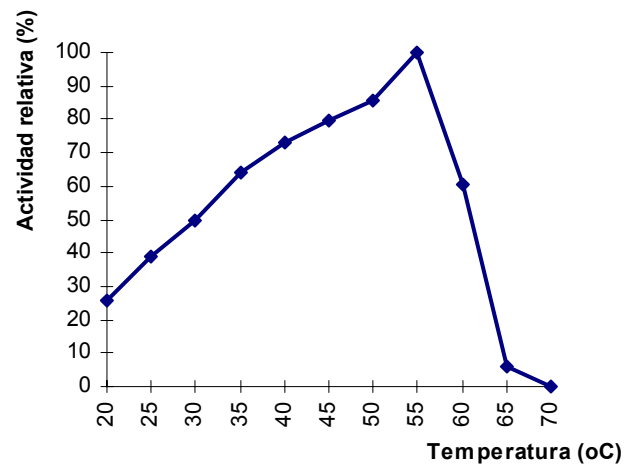


Fig. 14 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

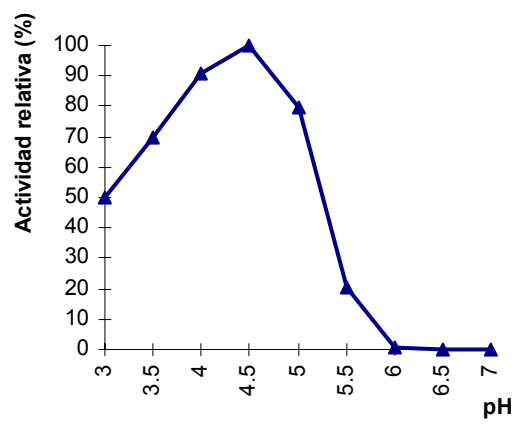


Fig. 13 Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

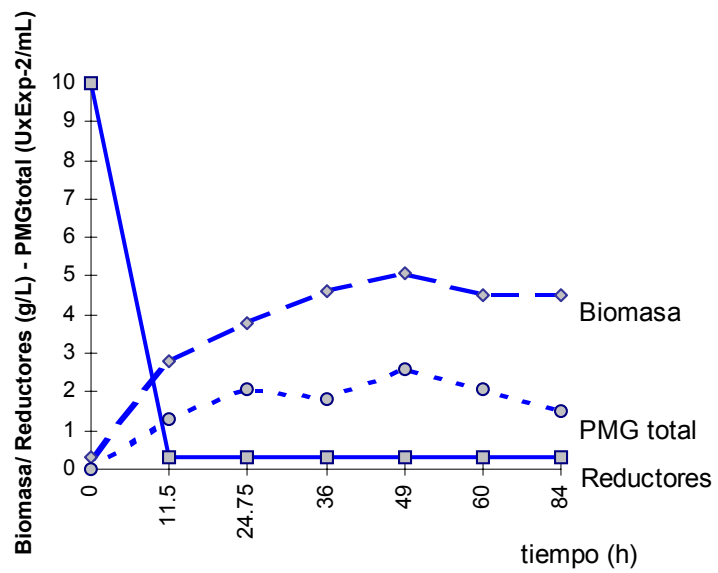
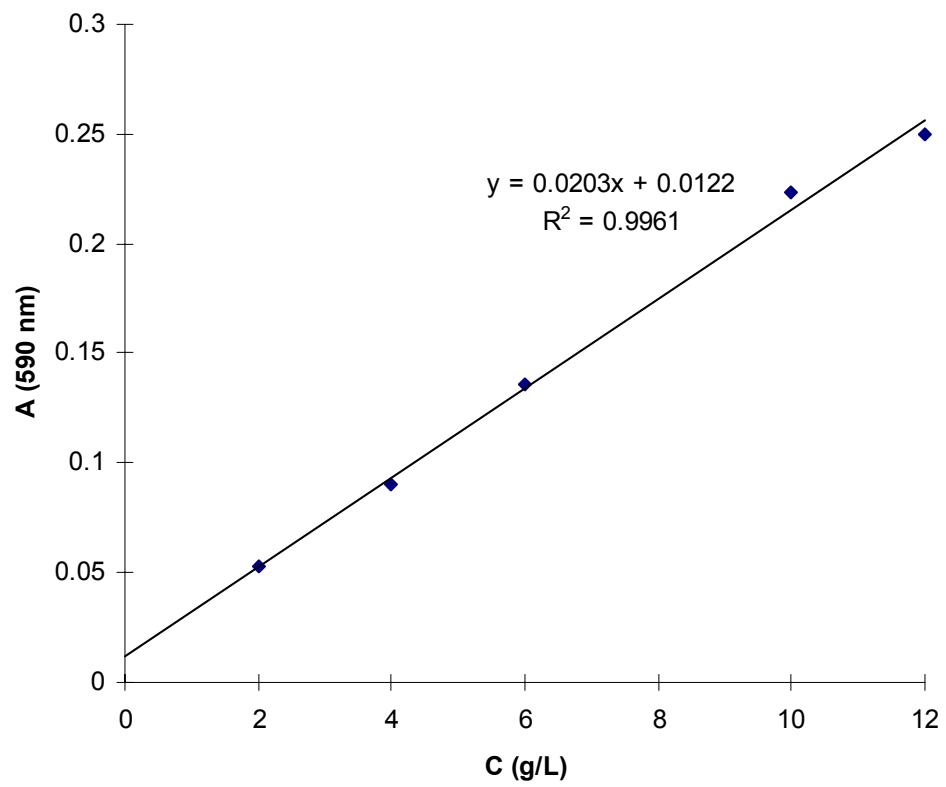
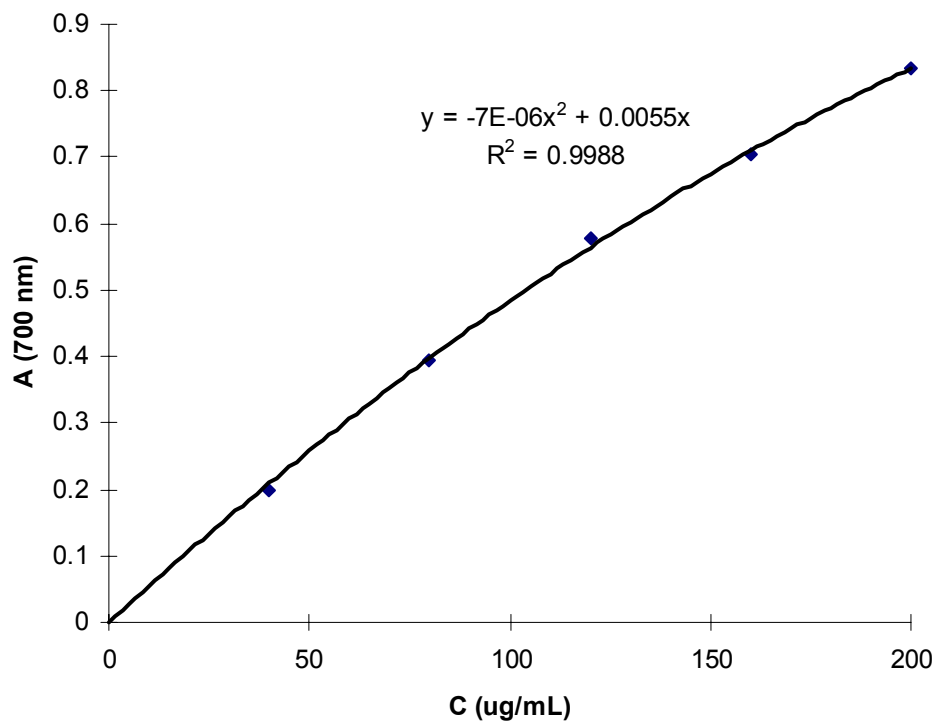


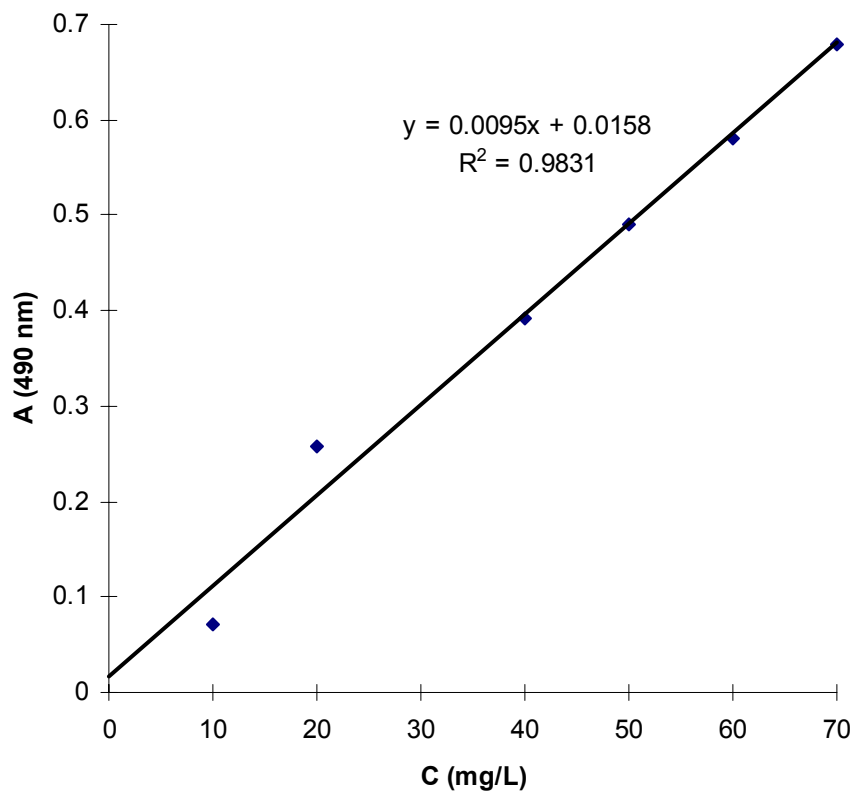
Fig. 9 Cinética de la producción de enzimas pécticas por la cepa *S. cerevisiae* EP 915.



Curva patrón de alcohol. Método de microdifusión y colorimetría.



Curva patrón de proteínas totales solubles. Método de Lowry.



Curva patrón de carbohidratos totales solubles. Método del fenol - sulfúrico

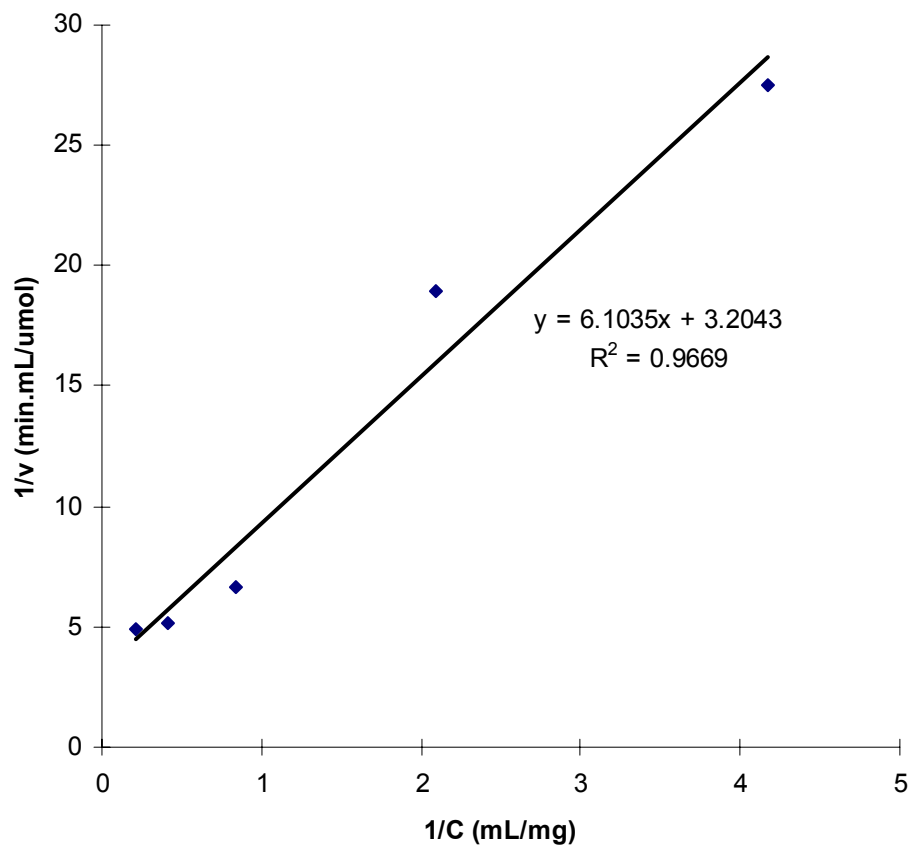


Fig. 16 Ploteo de Lineweaver-Burk. Sustrato: Pectina.

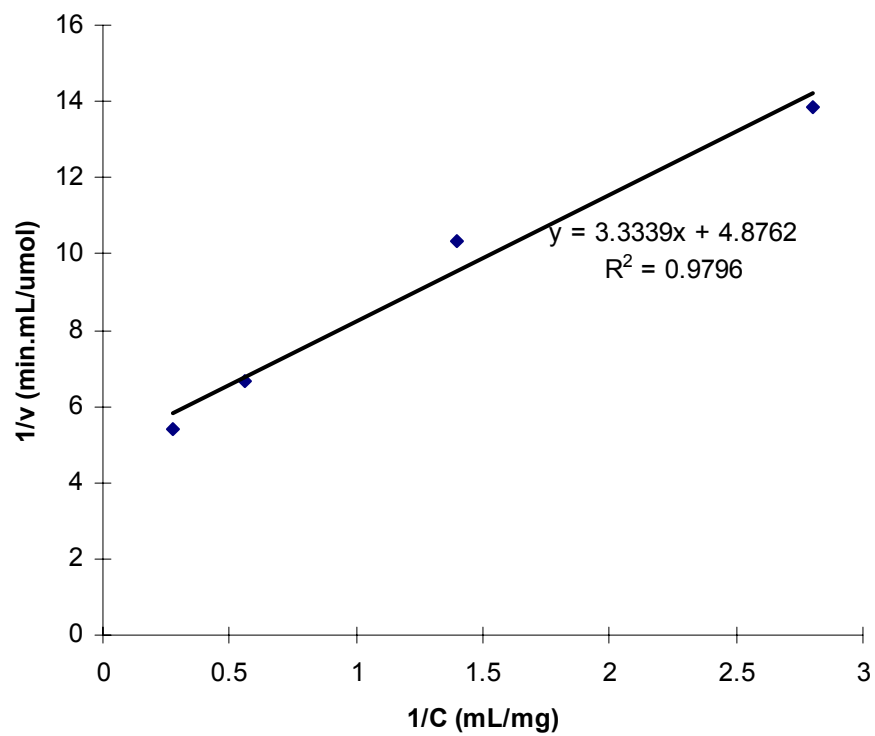
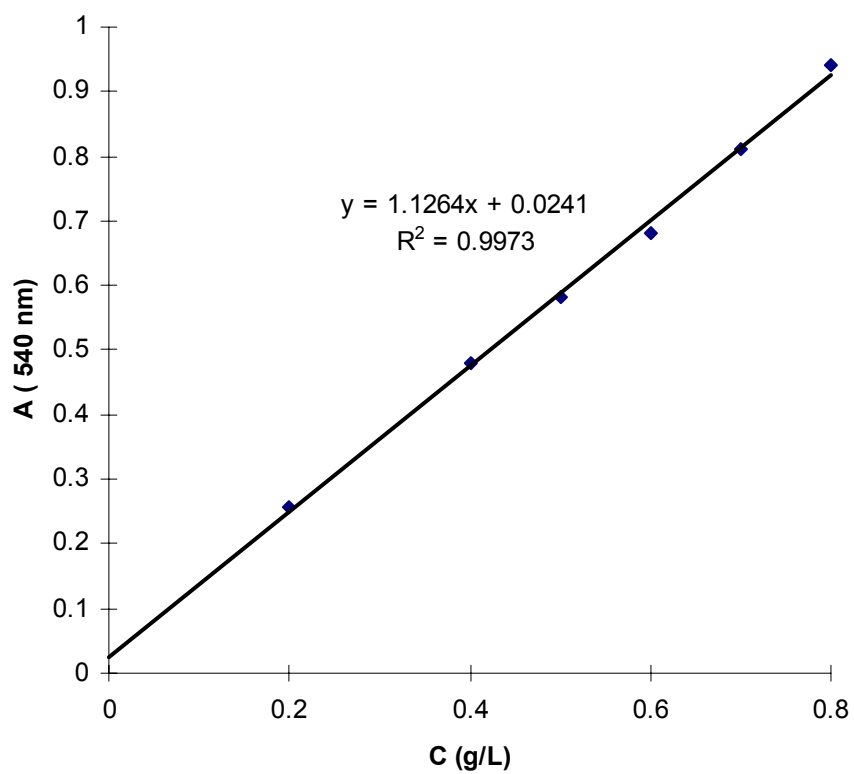
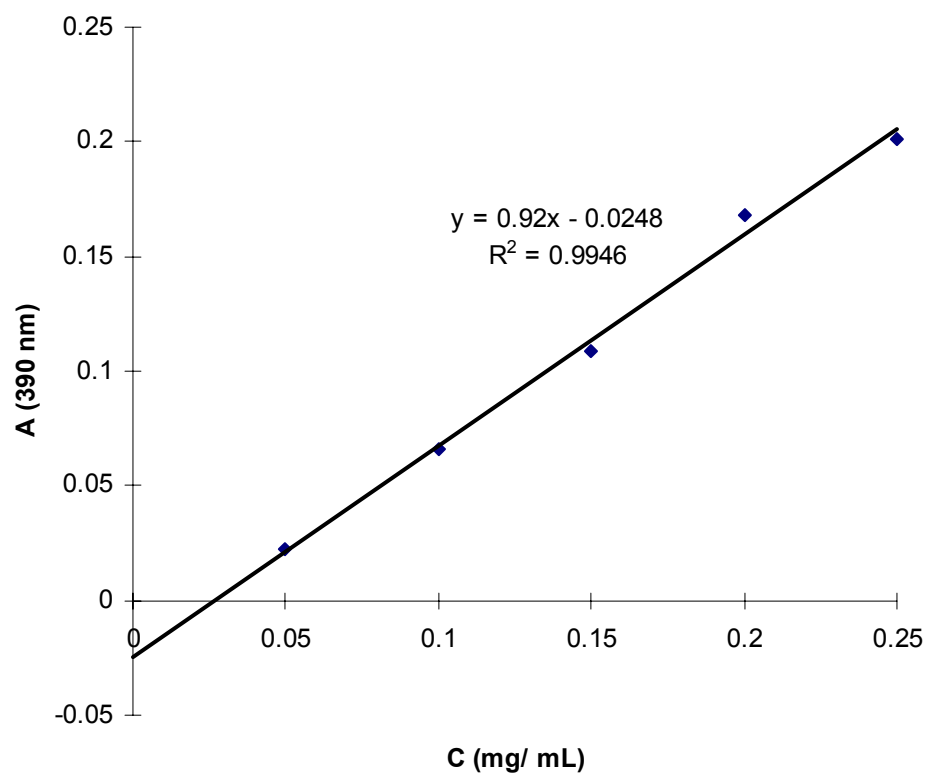


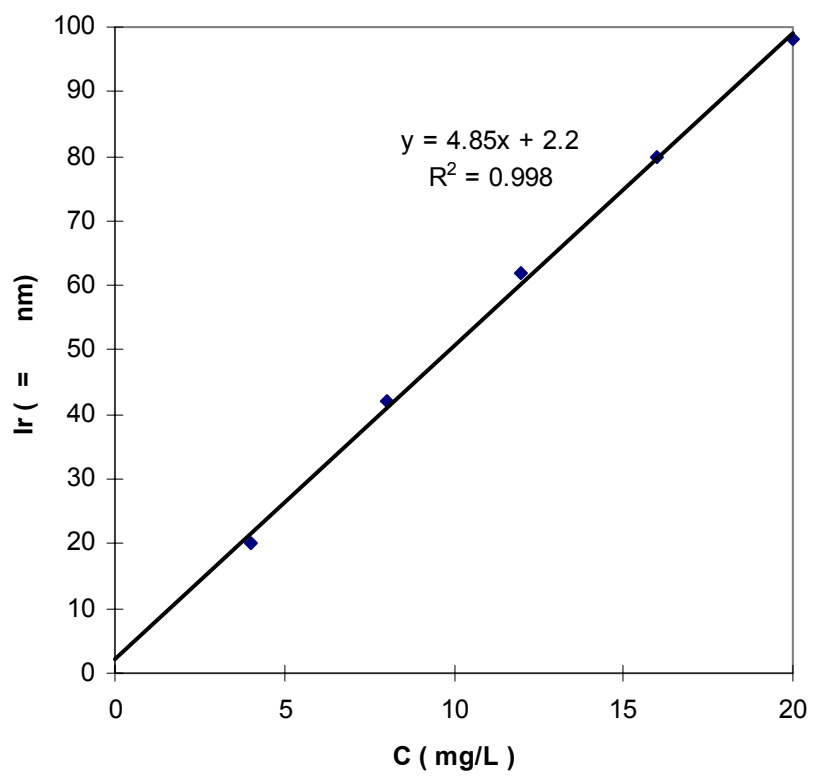
Fig. 17 Ploteo de Lineweaver-Burk. Sustrato: PGA.



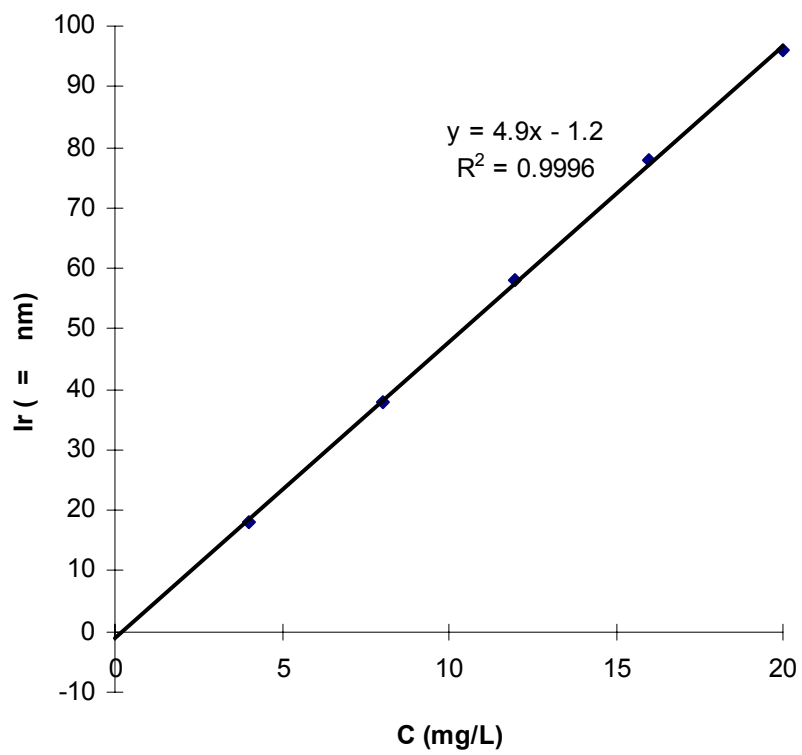
Curva patrón de azúcares reductores. Método de Miller.



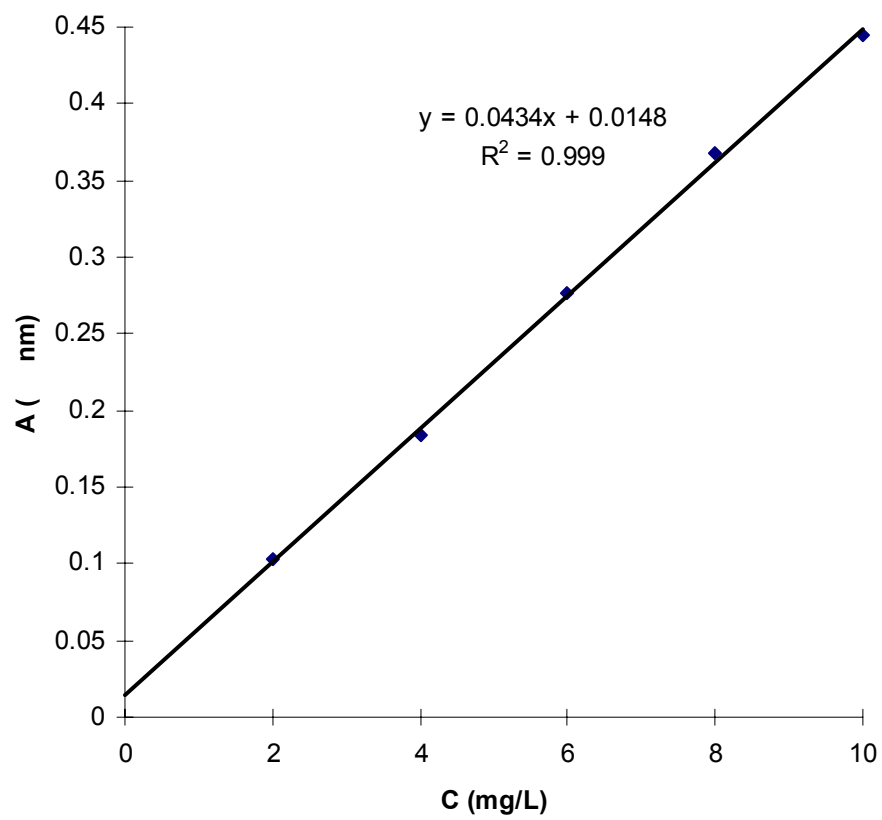
Curva patrón de fósforo. Método del metavanadato.



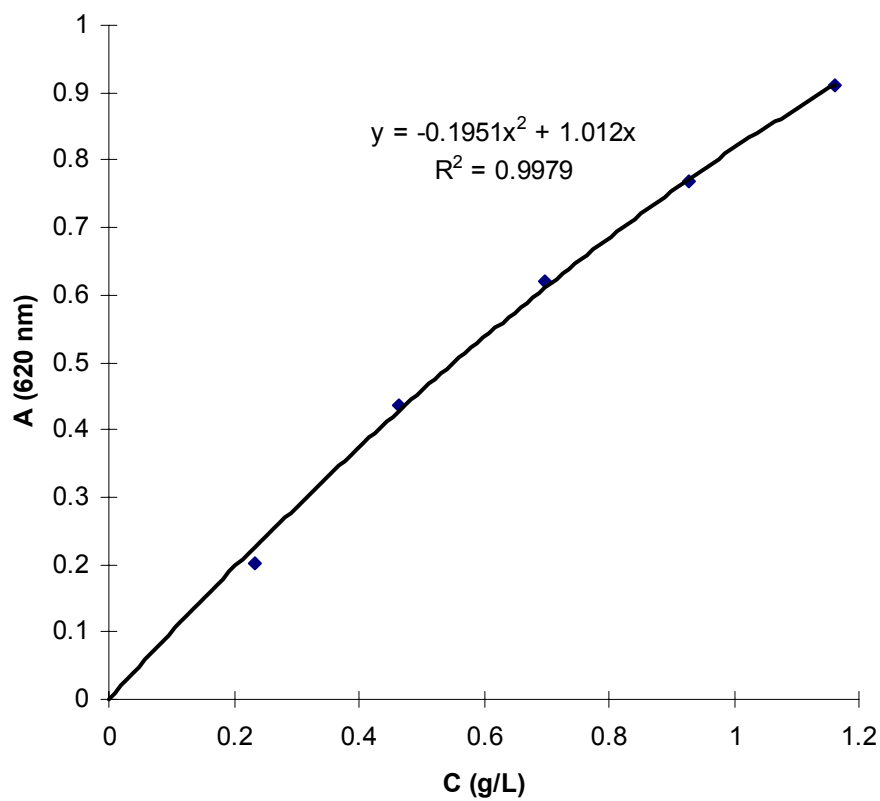
Curva patrón de sodio. Método: fotometría de llama.



Curva patrón de potasio. Método: fotometría de llama.



Curva patrón de cafeína.



Curva patrón de biomasa. Método turbidimétrico. Patrón: levadura cultivada en YPG; cultivo de 24 horas.

Tabla 4. Composición química del mucílago del fruto del café (Nadal,, 1959).

Componente	% base húmeda
Azúcares totales	4,1
Agua	84,2
Cenizas	0,70
Proteína	8,9
Acido péctico	0,91